



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

DOCTORADO EN MEDICINA

**Estudio de la delección espontánea de los exones 45–55
en el gen *DMD* y su aplicación como modelo de terapia
génica. Análisis de factores condicionantes del
fenotipo y estudio del modelo celular**

TESIS DOCTORAL

JAVIER POYATOS GARCÍA

DIRIGIDA POR

Dr. Juan Jesús Vílchez Padilla

Dra. Teresa Sevilla Mantecón

Dr. Rafael Pascual Vázquez Manrique

Octubre 2022

“Los sueños hay que pelearlos para que sean menos sueños y más realidad”

José “Pepe” Mujica

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: Vílchez Padilla, Juan Jesús N.I.F. 25902867-Z, Departamento/Instituto: Laboratorio de Patología Neuromuscular Centro: Instituto de Investigación Sanitaria La Fe

2.- Apellidos y nombre: Sevilla Mantecón, Teresa N.I.F. 09727641-K, Departamento/Instituto: Laboratorio de Patología Neuromuscular y Ataxias Centro: Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

3.- Apellidos y nombre: Vázquez Manrique, Rafael Pascual N.I.F. 22563351-Y, Departamento/Instituto: Laboratorio de Biomedicina Molecular, Celular y Genómica Centro: Instituto de Investigación Sanitaria La Fe

Directores/as y tutor/a, respectivamente, de la tesis doctoral: "Estudio de la delección espontánea de los exones 45-55 en el gen DMD y su aplicación como modelo de terapia génica. Análisis de factores condicionantes del fenotipo y estudio del modelo celular"

de D. Javier Poyatos García,

estudiante del Programa de Doctorado 3139 Medicina (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe favorable para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 10 de octubre 2022

Fdo.: Dr. Juan Jesús Vílchez



Director

Fdo.: Dra. Teresa Sevilla



Directora

Fdo.: Dr. Rafael Vázquez



Director

ESCUELA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores. Al **Dr. Juan Vílchez**, por darme la oportunidad de desarrollar esta tesis en el laboratorio de Patología Neuromuscular. Gracias, por haberme iniciado en el apasionante mundo del músculo, por confiar en mí y, sobre todo, por tu infinita paciencia. Al **Dr. Rafa Vázquez**, por haberme acogido y descubrirme los secretos de CRISPR-Cas9, a pesar de no tener a veces tiempo ni de respirar. Tu pasión por la ciencia y tu lucha por mejorar las condiciones de nuestro gremio es fascinante e inspiradora. A la **Dra. Tere Sevilla**, por su apoyo y comprensión, por haber estado siempre dispuesta a escucharme y aconsejarme.

Me gustaría agradecer a todos los que han contribuido en esta tesis doctoral. Al laboratorio de genética del Hospital Sant Pau, en especial a Pía Gallano, Lidia y Benjamín por haber hecho posible este proyecto. A Pilar y la Unidad de Genómica del CIPF por la secuenciación. A Nuria por las biopsias musculares y la evaluación clínica de los pacientes. A Inma Pitarch por la evaluación de los pacientes pediátricos. A María Damià por la evaluación cognitiva y a Luis Martínez por la evaluación cardiaca. A Alessandro, por las innumerables horas que he bajado a tu despacho y siempre has estado dispuesto a ayudarme. A Marisol y el registro de pacientes de *Duchenne Parent Project*. Gracias al resto de facultativos de los distintos centros españoles por proporcionar los datos clínicos. Queda patente que este trabajo es el resultado de una enorme cooperación.

A todos mis compañeros del grupo de Patología Neuromuscular. A parte de colaborar en este trabajo, habéis sido un gran apoyo todo este tiempo, aguantando mis momentos de mal humor y estando dispuestos a escuchar mis dramas. Especialmente a Inma, por ser mi madre del laboratorio y principalmente, por decir siempre las verdades, aunque escuezan. A Roger por sacar tu humor afilado en cualquier situación y las rutitas por la montaña. A Marta y Lorena, la sangre nueva del laboratorio, gracias por vuestra ayuda, no bajando los brazos incluso en los momentos de más estrés.

A mis amigos del IIS La Fe, comenzamos como compañeros de trabajo, pero os habéis convertido en verdaderos amigos. A las vecinas Jessi, Laura y Raquel, por todas las risas que nos hemos pegado juntos, con vosotras los días se hacen más cortos. A Elisa, por compartir dramas juntos y cervecitas fuera del laboratorio. Y como no, a Álvaro, aunque nuestra amistad viene de antes, juntos hemos compartido los peores momentos del tortuoso camino de la tesis, resumido con tardes en la biblio y fines de semana escribiendo...afortunadamente ya vemos la luz.

A mis amigos del mundo científico. A María, por ser una amiga de verdad y dar lo mejor de ti siempre. Eres la amiga que todo el mundo necesita, has sido un apoyo enorme durante este tiempo y sabes que te admiro un montón: ves siempre el lado positivo de

cualquier situación, por difícil que sea; por conseguir siempre lo que te propones (ahora no va a ser menos). Eres un ejemplo, y ten seguro que volveremos a disfrutar como nunca.

A Águeda, por compartir transportina, dramas y arreglar el mundo al lado de mil cervezas. A Javi Vera, por ser tan buen anfitrión, por las noches en Somera, las pedratas y descubrirme los mejores sitios de Bilbao.

A todo Follapo, que iniciamos juntos esta aventura en la Uni. Qué bonito es veros crecer en lo personal y profesional.

A Virginia Arechavala, por acogerme en el laboratorio y hacer que mi estancia fuera uno de mis mejores recuerdos de esta etapa. A parte de una enorme científica eres una gran persona. A Patri, Eurne, Gabi y Andrea que, desde el primer momento me hicisteis sentir uno más del equipo. Gracias también a el resto de los compañeros de Biocruces Bizkaia.

A mis amigos fuera de este ámbito y especialmente a Marc, Edgar y los que tenemos grabado las coordenadas 40° 09'59.3" N – 2° 08'42.1" W. Aunque no seáis consientes, me habéis ayudado enormemente estos años, alejando mi mente del laboratorio, con mil risas y momentos inolvidables. Tampoco me puedo olvidar de Marina y Ricky, juntos hemos vivido grandes momentos y la mejor prueba de ello es la pequeña Albita.

A mi familia. Puede parecer un tópico, pero me siento realmente afortunado. A mis padres y mi hermana por el apoyo durante todos estos años y estar siempre que los he necesitado. A mi familia en general por inculcarme la cultura del esfuerzo y la humildad. Especialmente a mis abuelos, que, aunque desgraciadamente no todos habéis podido acompañarme hasta el final de este camino, vuestras lecciones me han servido a madurar y valorar cosas que hoy en día damos por sentado; sois mis verdaderos ídolos.

A Vicky, por ser la persona que da sentido a mi vida. Muchas gracias por estar siempre a mi lado, por difícil que sea la situación que se nos ponga por delante. Contigo he crecido enormemente como persona, eres la luz que ilumina el camino en mis días más oscuros. Simplemente, te quiero.

Me gustaría agradecer encarecidamente a la Fundación Isabel Gemio. Gracias por vuestro enorme esfuerzo para recaudar fondos y por vuestra contribución directa en este proyecto, ya que sin vuestro apoyo no se hubiera podido llevar a cabo. Espero que este trabajo contribuya en la búsqueda de terapias para la distrofia muscular de Duchenne.

Y por último me gustaría agradecer a los pacientes y familiares, porque con vuestra participación desinteresada contribuís a ampliar el conocimiento de vuestra enfermedad. Gracias de todo corazón, ya que sin vuestra colaboración nada de esto sería posible.

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
----------------------------	------

INTRODUCCIÓN

1. DISTROFINOPATÍAS.....	3
1.1. Gen <i>DMD</i>	3
1.2. Proteína distrofina y complejo de proteínas asociadas a la distrofina	5
1.2.1. Distrofina	5
1.2.2. Complejo de proteínas asociadas a la distrofina.....	6
1.3. Patogenia de las distrofinopatías	8
1.3.1. Mutaciones en el gen <i>DMD</i> y su impacto sobre la distrofina	8
1.3.2. Repercusión sobre la fibra muscular.....	11
1.3.3. Factores modificadores del fenotipo en <i>trans</i>	14
1.4. Aspectos clínicos de las distrofinopatías.....	18
1.4.1. Distrofia muscular de Duchenne.....	18
1.4.2. Distrofia muscular de Becker	19
1.4.3. Formas clínicas de distrofinopatía parciales o presentación aislada.....	20
1.5. Aproximaciones terapéuticas de las distrofinopatías.....	20
1.5.1. Transferencia génica	21
1.5.2. Terapia con células madre.....	22
1.5.3. Atalureno	23
1.5.4. Salto de exón	23
1.5.5. Edición génica mediante CRISPR-Cas9.....	24
2. DELECIÓN DE LOS EXONES 45–55 EN EL GEN <i>DMD</i>	27
2.1. Factores modificadores en <i>cis</i>	28
2.1.1. Factores intrónicos	28
2.1.2. Interacción distrofina-nNOS.....	30
2.2. Factores modificadores en <i>trans</i>	31
2.2.1. Mutaciones concurrentes en otros genes	31
HIPÓTESIS.....	35
OBJETIVOS.....	39

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ESTUDIO DE UNA COHORTE DE SUJETOS CON LA del45–55.....	43
1.1. Caracterización clínica de los pacientes	43
1.1.1. Pacientes	43
1.1.2. Aspectos clínicos	43
1.2. Caracterización genética	45
1.2.1. Secuenciación masiva mediante panel de genes dirigido	45
1.2.2. Identificación de los puntos de rotura intrónicos	46
1.2.3. Caracterización de las secuencias intrónicas.....	46
1.2.4. Estudio de efectos fundadores mediante el análisis de haplotipos.....	47
2. ANÁLISIS DE FACTORES MODIFICADORES DEL FENOTIPO.....	48
2.1. Estudio de expresión de distrofina en biopsias musculares	48
2.1.1. Estudios sobre el ARN de biopsias musculares.....	49
2.1.2. Estudios de expresión de proteína en las biopsias musculares	52
2.2. Análisis de factores modificadores en <i>trans</i>	54
2.3. Análisis estadístico	54
3. APROXIMACIÓN AL MODELO CELULAR	56
3.1. Cultivos celulares.....	56
3.1.1. Línea celular HEK293.....	56
3.1.2. Obtención de cultivo de mioblastos primarios humanos	56
3.1.3. Inmortalización de los mioblastos primarios.....	58
3.1.4. Líneas de mioblastos inmortalizados	58
3.1.5. Almacenamiento y congelación-descongelación de células y explantes	59
3.2. Sistema de edición génica CRISPR-Cas9	60
3.2.1. Diseño de los gRNA	60
3.2.2. Generación de un vector de expresión del sistema CRISPR-Cas9.....	60
3.2.3. Pruebas de eficiencia en células HEK293	61
3.2.4. Introducción de la del45–55-D1 en mioblastos DMD y obtención de clones editados.....	63
3.3. Análisis de la eficiencia de corte y de los potenciales <i>off-targets</i> mediante secuenciación masiva	64
3.4. Estudios de expresión de distrofina a nivel de ARN.....	65
3.5. Estudios de proteína en los miotubos de las líneas celulares	66

3.5.1. Inmunofluorescencia.....	66
3.5.2. Ensayo <i>In-cell western</i>	67
3.5.3. Extracción de proteína y <i>western blot</i>	68
3.6. Análisis estadístico	68

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE UNA COHORTE DE SUJETOS CON LA del45–55.....	71
1.1. Caracterización clínica de los pacientes	71
1.2. Caracterización genética	74
1.2.1. Análisis de los puntos de rotura intrónicos.....	74
1.2.2. Análisis de haplotipos	77
2. ANÁLISIS DE FACTORES MODIFICADORES DEL FENOTIPO.....	80
2.1. Factores modificadores en <i>cis</i>	80
2.1.1. Expresión de distrofina	80
2.1.2. Efecto de los puntos de rotura y secuencias intrónicas sobre la severidad clínica 83	
2.2. Análisis de factores modificadores en <i>trans</i>	84
3. APROXIMACIÓN AL MODELO CELULAR	86
3.1. Generación de un modelo celular <i>DMD</i> del45–55 mediante edición génica..	86
3.2. Análisis de la eficiencia de corte y de los potenciales <i>off-targets</i> mediante secuenciación masiva	88
3.3. La expresión de distrofina es recuperada en el clon editado.....	91
3.4. La introducción de la del45–55-D1 rescata los defectos en la diferenciación de mioblastos <i>DMD</i> con ausencia de distrofina	93

DISCUSIÓN

1. ESTUDIO DE UNA COHORTE DE SUJETOS CON LA del45–55.....	97
2. ANÁLISIS DE FACTORES MODIFICADORES DEL FENOTIPO.....	102
3. APROXIMACIÓN AL MODELO CELULAR	106

CONCLUSIONES.....	113
--------------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA.....	117
--------------------------	------------

ANEXOS

ANEXO I. Dictamen del Comité de Ética.....	133
ANEXO II. Tablas adicionales.....	135
ANEXO III. Figuras adicionales.....	155
PUBLICACIONES.....	161

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de los promotores del gen <i>DMD</i> y de las distintas isoformas de la distrofina	4
Figura 2. Distrofina y complejo de proteínas asociadas a la distrofina	8
Figura 3. Inmunofluorescencia de distrofina en músculo de sujetos control, DMB y DMD ..	9
Figura 4. Estructura de la distrofina y correlación de la localización de mutaciones in-frame con los fenotipos.....	11
Figura 5. Representación histológica de secciones de músculo en distintos estados distróficos	12
Figura 6. Variantes de la micro-distrofina.....	22
Figura 7. Sistema CRISPR-Cas9 y su aplicación en DMD	26
Figura 8. Estructura de la distrofina completa y tras la del45–55	27
Figura 9. Ilustración esquemática del flujo de trabajo en la PCR digital	52
Figura 10. Principio de selección celular con el sistema MACS	58
Figura 11. Plásmido PX458 utilizado y ensayo T7EI	62
Figura 12. Representación gráfica de la edad en la evaluación de los sujetos del45–55	72
Figura 13. Prevalencia de las manifestaciones clínicas a lo largo de la edad en la serie del45–55.....	73
Figura 14. Representación esquemática de las diez deleciones con puntos de rotura intrónicos específicos encontrados en la cohorte del45–55	75
Figura 15. Detección de los <i>long non-coding RNAs</i> de los intrones 44 y 55 de <i>DMD</i> ..	76
Figura 16. Análisis de haplotipos en los sujetos con las deleciones compartidas D1–D4	78
Figura 17. Representación gráfica de los dos haplotipos encontrados en la deleción D1	79
Figura 18. Análisis de la proteína distrofina en nueve biopsias musculares de sujetos con del44–55, además de una muestra de un control sano (C) y de distrofia muscular de Duchenne (DMD).....	82
Figura 19. Análisis de expresión de distrofina en nueve muestras de ADNc de músculo de la serie del44–55	82
Figura 20. Análisis de las eficiencias de corte de los gRNAs diseñados mediante el ensayo de la T7EI en células HEK293.....	86
Figura 21. Diseño CRISPR-Cas9 para replicar la del45–55 del grupo D1.....	87
Figura 22. Principales frecuencias alélicas generadas tras el corte de los gRNA	90

Figura 23. Análisis de la expresión de distrofina a nivel de ARN en el clon editado.	91
Figura 24. Evaluación de expresión de distrofina de en los mioblastos del clon editado	92
Figura 25. Los defectos en diferenciación de los mioblastos DMD se rescatan tras la introducción de la del45–55-D1 mediante edición génica	94
Figura 26. Comparación del perfil clínico de la del44–55 de la serie recogida en el trabajo de Echigoya (Echigoya <i>et al.</i> , 2019) respecto a nuestra cohorte	98
Figura A1. Caracterización de las secuencias genómicas alrededor del neo-intrón 44– 55 en las 10 deleciones encontradas en la serie del44–55	155
Figura A2. Uso de la herramienta CRISPResso Compare para el análisis de los <i>off- targets</i>	156
Figura A3. Análisis de los sitios <i>off-target</i> en el clon editado.....	157

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información de las biopsias musculares utilizadas en este trabajo.....	48
Tabla 2. Líneas de mioblastos inmortalizados utilizados.....	59
Tabla 3. Análisis de regresión bayesiana evaluando el efecto de la posición de las deleciones y los factores modificadores sobre la severidad muscular y la presencia de cardiopatía.....	84
Tabla 4. Posición genómica y secuencias de las regiones <i>on-target</i> y potenciales regiones <i>off-target</i>	88
Tabla A1. Secuencias de <i>primers</i> para la identificación de los puntos de rotura y de los <i>long non-coding RNA</i>	135
Tabla A2. Secuencias de <i>primers</i> utilizados para RT-PCR y ddPCR sobre ADNc. ...	135
Tabla A3. Secuencias de los gRNA y <i>primers</i> para el ensayo T7EI utilizadas.	136
Tabla A4. Secuencias para la generación de librería de amplicones para secuenciación masiva	136
Tabla A5. Resumen de los datos clínicos de los 57 sujetos de la serie.....	137
Tabla A6. Evaluación cardiaca.....	141
Tabla A7. Evaluación cognitiva	145
Tabla A8. Caracterización genómica de las diez del45–55 específicas encontradas	146
Tabla A9. Genotipo de los factores modificadores estudiados, presencia de mutaciones concurrentes y perfil de preservación de los <i>long non-coding RNAs</i> en los casos estudiados.	149
Tabla A10. Predicciones <i>in silico</i> de la formación de pseudoexones.....	152
Tabla A11. Análisis de las secuencias potenciadoras y silenciadoras de <i>splicing</i> en la zona de unión del neo-intrón 44–55.....	152
Tabla A12. Resumen de las lecturas detectadas con las principales modificaciones tras el análisis de secuenciación masiva.	153

ABREVIATURAS

LISTADO DE ABREVIATURAS

2'OMePS: *2'-O-methyl-modified-phosphorothioate*

AAS: ácido acetil salicílico

AAV: *adeno-associated virus*. Virus adenoasociados

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AON: *antisense oligonucleotide*. Oligonucleótido antisentido

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: adenosín trifosfato

BAV: bloqueo atrioventricular

BB: bloqueo bifascicular

BRDHH: bloqueo de rama derecha del haz de His

BRIHH: bloqueo de rama izquierda del haz de His

BSA: *bovine serum albumin*. Albúmina de suero bovino

Ca²⁺: ión calcio

CBCL/IE: *Child Behaviour CheckList* Internalización/Externalización

CDK4: *cyclin-dependent kinase*. Cinasa dependiente de ciclina 4

CGH: *comparative genoma hybridization*. Hibridación genómica comparada

CI: coeficiente intelectual

circRNA: circular RNA. ARN circular

CIV: coeficiente intelectual verbal

CK: *creatin kinase*. Creatina quinasa

CMH I: complejo mayor de histocompatibilidad I

CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*. Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas

crRNA: CRISPR RNA. ARN CRISPR

CVF: capacidad vital forzada

DA: dificultad de aprendizaje

DAI: desfibrilador automático implantable

DAPC: *Dystrophin-associated protein complex*. Complejo de proteínas asociadas a la distrofina

ddPCR: *digital droplet PCR*. PCR digital

del45–55: deleción de los exones 45 al 55 en el gen *DMD*

del45–57: deleción de los exones 45 al 57 en el gen *DMD*

DM: *differentiation medium*. Medio de diferenciación

DMB: Distrofia Muscular de Becker

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTP: *deoxynucleoside triphosphate*. Desoxinucleósido trifosfato

DSB: *double strand break*. Corte de doble cadena

DTDVI: diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo

DTSVI: diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo

dUTP: *deoxyuridine triphosphate*. Desoxiuridina trifosfato

ECG: electrocardiograma

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*. Ácido etilendiaminotetraacético

ESE: *exonic splicing enhancer*. Potenciador de *splicing* exónico.

ESS: *exonic splicing silencer*. Silenciador de *splicing* exónico.

FA: fibrilación auricular

FACS: *Fluorescent Activated Cell Sorter*. Separación de células activadas por fluorescencia

FDA: *Food and Drug Administration of United States of America*. Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos

FEVI: fracción eyección ventrículo izquierdo

FFEE: funciones ejecutivas

FV: fluidez verbal

gADN: ADN genómico

GFP: *green fluorescent protein*. Proteína verde fluorescente

Grb2: *growth factor receptor-bound protein 2*. Proteína 2 unida al receptor de crecimiento

gRNA: *guide RNA*. ARN guía

HDR: *homologous direct repair*. Recombinación homóloga

HEK293: *Human Embryonic Kidney 293*. Células embrionarias de riñón humano 293

HLA: *human leukocyte antigen*. Antígeno leucocitario humano

HRP: *horseradish peroxidase*. Peroxidasa de rábano

HSF: Human Splicing Finder

hTERT: *human telomerase reverse transcriptase*. Telomerasa transcriptase reversa humana

IAORRI: inicio aberrante del origen de replicación y rescate incompleto de la replicación

IC: intervalo de credibilidad

Indel: inserción/delección

INF- γ : interferón gamma

lncRNA: *long non-coding RNA*. ARN largos no codificantes

LTBP4: *latent transforming growth factor β binding protein 4*. Proteína 4 de unión al factor de crecimiento transformante beta

MCK: *murine promotor of creatine kinase*. Promotor murino de la creatina cinasa

MCP: marcapasos

MHCK: *expression cassette composed of the enhancer Myosin Heavy Chain and CK promoter*. Paquete de expresión compuesto por el potenciador de la cadena pesada de la miosina y el promotor de la CK.

miRNA: *microRNA*. microARN

MMEJ: *micro-homology mediated end joining*. Unión de extremos mediada por microhomología

MMRDR: *microhomology-mediated replication-dependent*. Replicación dependiente de recombinación mediada por microhomología

MOI: *multiplicity of infection*. Multiplicidad de infección

MT: memoria de trabajo

MyHC: *myosin heavy chain*. Cadena pesada de la miosina

myomiR: *muscle specific microRNA*. microARN específicos de músculo

NHAR: *non-allelic homologous recombination*. Recombinación homóloga no alélica

NHEJ: *non-homologous end joining*. Unión de extremos no homólogos

NLS: *nuclear localization signal*. Señal de localización nuclear

NMD: *non-sense mediated decay*. Degradación del ARN mensajero mediada por mutaciones terminadoras

NNEE: necesidades especiales

nNOS μ : *neural nitric oxide synthase*. Óxido nítrico sintasa μ .

NO: *nitric oxide*. Óxido nítrico

OR: *odd ratio*. Razón de probabilidad.

PAM: *Protospacer Adjacent Motif*. Secuencia motivo adyacente a protoespaciador

PBS: *phosphate-buffered saline*. Tampón fosfato salino

PBS-T: *phosphate-buffered saline with 0,1% TritonX-100*. Tampón fosfato salino con 0,1% TritónX-100

PCR: *polymerase chain reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa

PF: procesamiento fonológico

PI3K/Akt: *phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B*. Fosfatidilinositol 3 cinasa. Proteína cinasa B

PMO: *phosphorodiamidate morpholino oligomers*.

PPMO: *Peptide-conjugated phosphorodiamidate morpholino*

Ras/MAPK: *Ras/ mitogen-activated protein kinases*. Ras/proteínas cinasas activadas por mitógenos

RHL: retraso en el habla y lenguaje

RNP: ribonucleoproteína

RT-PCR: *reverse transcription PCR*. PCR con transcripción reversa

RYR1: receptor de la rianodina 1

SAPK-3: *stress-activated protein kinase-3*. Proteína cinasa 3 activada por estrés

SEM: *standard error of the mean*. Error estándar de la media

SMC: *Skeletal Muscle Cell Growth Medium*. Medio de cultivo de mioblastos

SNP: *single nucleotide polymorphism*. Polimorfismo de nucleótido único

T7EI: endonuclease T7 I

TBST: *Tris-buffered saline with Tween 20*. Tampón Tris salino con Tween 20

TDAH: trastorno por déficit de atención e hiperactividad

TGF β : *transforming growth factor β* . Factor de crecimiento transformante beta

TNF- α : *tumor necrosis factor α* . Factor de necrosis tumoral alfa

TNR5: *tumor necrosis factor receptor superfamily member 5*. Receptor de la superfamilia 5 del factor de necrosis tumoral

tracrRNA: *trans-activating crRNA*. ARN CRISPR trans activador

TRPC: *transient receptor potential channel*. Canales receptores de potencial transitorio.

TSP-1: *thrombospondin-1*. Trombospondina-1

VTDVI: volumen telediastólico del ventrículo izquierdo

WAIS: *Wechsler Adult Intelligence Scale*. Escala de Weschler de inteligencia para adultos

WISC IV: *Wechsler Intelligence Scale for Children*. Escala de Weschler de inteligencia para niños

α -actn: α -actinin

μ Dys: micro-distrofina

INTRODUCCIÓN

1. DISTROFINOPATÍAS

Las distrofinopatías son un grupo de enfermedades ligadas al cromosoma X originadas por mutaciones en el gen *DMD* que codifica para la distrofina, una proteína estructural de las células musculares esqueléticas y cardíacas. La deficiencia de esta proteína se expresa con un abanico de fenotipos. La forma más frecuente es la distrofia muscular de Duchenne (DMD) caracterizada por una afectación muscular severa de inicio en la infancia y letal. Por otra parte también podemos encontrar el fenotipo distrofia muscular de Becker (DMB) que se caracteriza por ser menos grave y se manifiesta con un espectro mucho más amplio respecto al inicio de los síntomas y al ritmo de progresión (Darras *et al.*, 2022). Además, de los dos fenotipos clásicos mencionados, se pueden presentar formas de expresión parcial como hiperCKemia aislada, es decir con aumento de la enzima muscular creatina quinasa (CK) en sangre sin acompañarse de debilidad muscular; manifestaciones pseudometabólicas (mialgias, calambres, mioglobinuria) inducidas por esfuerzo o situaciones de estrés (Coote *et al.*, 2018); o la aparición de cardiopatía aislada ligada al cromosoma X. También pueden presentarse manifestaciones cerebrales con problemas cognitivos, de comportamiento o del neurodesarrollo, a veces aisladamente, o más comúnmente asociados a cualquiera de los fenotipos anteriormente mencionados (North *et al.*, 1996).

1.1. Gen *DMD*

El gen que codifica para la proteína distrofina es el gen *DMD* (Hoffman *et al.*, 1987), localizado en el cromosoma X (locus Xp21) (Davies *et al.*, 1983). El gen *DMD* se caracteriza por ser el gen más grande del genoma humano, con una longitud de 2,5 Mb (el 99% son regiones intrónicas), lo que corresponde a un 0,1% del genoma total. Su ARNm completo consta de 14 kb y se expresa predominantemente en músculo esquelético y cardíaco, y en menor medida en el cerebro (Monaco *et al.*, 1986; Koenig *et al.*, 1987; Burghes *et al.*, 1988; Hoffman and Kunkel, 1989).

El gen *DMD* cuenta con 79 exones y siete promotores específicos de tejido, produciendo de esta forma siete transcritos distintos que darán lugar a proteínas de distinto tamaño y localización de expresión (Muntoni *et al.*, 2003). Tres promotores se encuentran localizados aguas arriba del primer exón, controlando así la transcripción de las isoformas completas Dp427 (427 KDa) y reciben el nombre según su lugar de expresión principal: M-músculo, controla la transcripción en el músculo esquelético y cardíaco, así como en células gliales, aunque en niveles más bajos; B-cerebro, que es

un promotor específico para las neuronas corticales y del hipocampo y P-Purkinje, que regula la expresión en el músculo esquelético y las células de Purkinje. Por otro lado, los cuatro promotores restantes se encuentran localizados dentro de los intrones del gen y dan lugar a distintas isoformas de menor tamaño que carecen de la región de unión a la actina y son denominadas según su peso molecular (kDa). El promotor R, localizado en el intrón 29 da lugar a una isoforma de 260 KDa (Dp260) y se expresa principalmente en la retina; el promotor B3 en el intrón 44 produce una isoforma de 140 KDa (Dp140) expresada en cerebro, retina y riñón; el promotor S, en el intrón 55 da lugar a la isoforma Dp116 (116 KDa) expresada en las células de Schwann y por último el promotor G en el intrón 62, que da lugar a la isoforma Dp71 (71 KDa) expresada en la mayoría de los tejidos no musculares. Además, la existencia de diferentes eventos de *splicing* alternativo hace que el número de isoformas crezca considerablemente (Sironi *et al.*, 2002). De este modo, se genera una gran diversidad proteica, lo que contribuye a la compleja expresión de la distrofina (**Figura 1**).

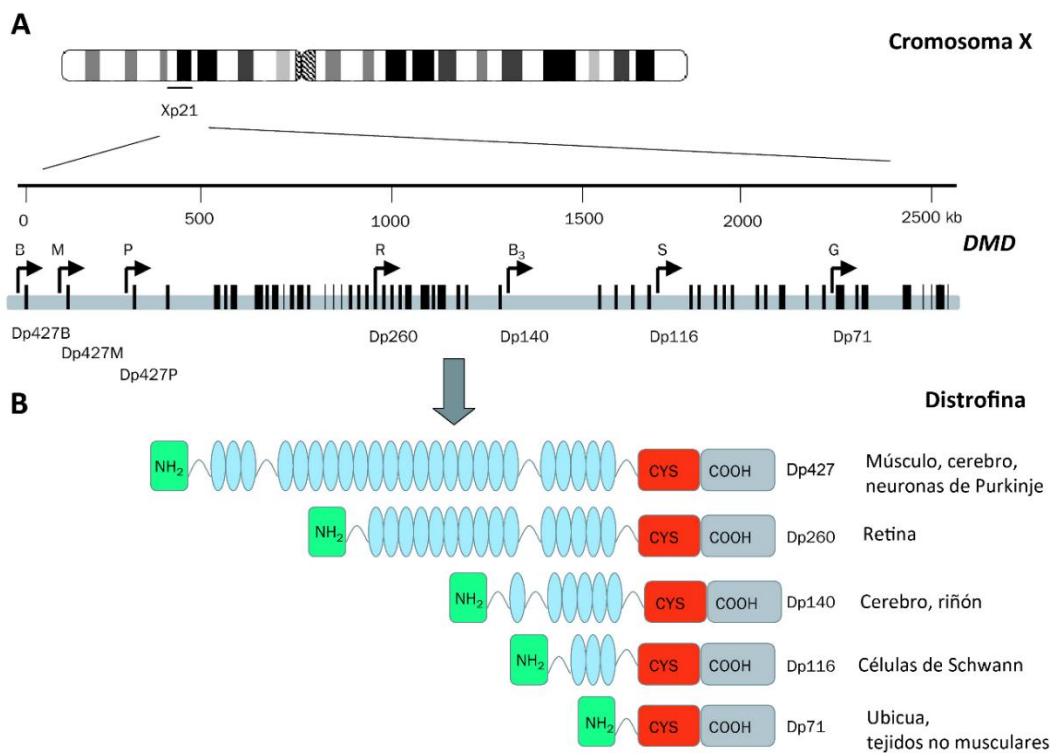


Figura 1. Representación esquemática de los promotores del gen *DMD* y de las distintas isoformas de la distrofina. (A) Organización genómica del gen *DMD*, localizado en el *locus* Xp21. Las líneas negras verticales representan los 79 exones del gen, mientras que las flechas indican los distintos promotores específicos de tejido: B (cerebro), M (músculo) y P (células de Purkinje) dan lugar a la isoforma completa Dp427; los promotores R (retina), B₃ (cerebro3), S (Schwann) y G (general) dan lugar a las isoformas Dp260, Dp140, Dp116 y Dp71 respectivamente. (B) Estructura de las distintas isoformas de la distrofina y sus tejidos de expresión. A la región amino-terminal (NH₂, verde) le sigue el dominio de repeticiones de espectrina (azul), el dominio rico en cisteínas (CYS, rojo) y el dominio carboxi-terminal (COOH, gris). Imagen adaptada de (Muntoni *et al.*, 2003).

1.2. Proteína distrofina y complejo de proteínas asociadas a la distrofina

1.2.1. Distrofina

La isoforma larga de la distrofina muscular (Dp427M) es una proteína de elevado peso molecular (427 KDa) que pertenece a la familia de la β -espectrina y α -actinina (Koenig *et al.*, 1988). La distrofina se localiza por debajo de la membrana celular de las fibras musculares (sarcolema) y se encarga de conectar el citoesqueleto de actina con la matriz extracelular mediante su interacción con el complejo de proteínas asociadas a la distrofina (DAPC, del inglés *dystrophin-associated protein complex*), manteniendo así la integridad del sarcolema y protegiendo a la célula muscular del estrés mecánico producido durante la contracción muscular (Pasternak *et al.*, 1995). Además, está implicada en diversas vías de señalización celular (Rando, 2001).

Debido a su estructura y función, podemos distinguir cuatro dominios en la distrofina (**Figura 1B**) (Koenig *et al.*, 1988):

1. Dominio amino-terminal (NH₂-). Contiene dos módulos homólogos a la calponina que le permiten la unión a los filamentos de actina citoesquelética. Este dominio, está codificado por los exones 2-8. El resto de las isoformas más cortas carecen de él.
2. Dominio central (*rod domain*). Representa la mayor parte de la proteína y está codificado por los exones 9-62. Consta de 24 repeticiones similares a la espectrina, superenrolladas en una triple hélice (R1-R24) que están interrumpidas por cuatro regiones de bisagra ricas en prolina (H1-H4) encargadas de aportar flexibilidad a la proteína. Este dominio también es capaz de unirse a la actina por medio de las repeticiones R11-R17 (mediante interacciones electroestáticas) (Amann *et al.*, 1998). Además, el dominio central de la distrofina se une a la proteína de los filamentos intermedios sinamina (Bhosle *et al.*, 2006). Mediante las repeticiones R16 y R17 (codificada por los exones 42 a 45) la distrofina se une a la enzima nNOS μ (del inglés *neural nitric oxide synthase*), permitiendo su anclaje a la zona subsarcolémica (Lai *et al.*, 2009).
3. Dominio rico en cisteína. Está codificado por los exones 64-70. A continuación de la región H4, encontramos el dominio denominado WW que es el responsable de la interacción de la distrofina con la proteína β -dystroglicano (Huang *et al.*, 2000). El dominio rico en cisteínas también contiene dos motivos de unión a Ca²⁺

intracelular y un dominio ZZ que sirve de sitio de unión a la calmodulina en un proceso dependiente de Ca^{2+} (Anderson *et al.*, 1996).

4. Dominio carboxi-terminal (-COOH). Está codificado por los exones 71-79. Contiene dos zonas de polipéptidos superenrollados en α -hélices que forman los motivos *coiled-coil*, mediante los que se establece la unión con la proteína distrobrevina y modula la interacción con la sintrofina (Blake *et al.*, 1995; Sadoulet-Puccio *et al.*, 1997).

1.2.2. Complejo de proteínas asociadas a la distrofina

La distrofina se une por medio de su dominio carboxi-terminal al complejo DAPC (conjunto de proteínas sarcoplásmicas, transmembrana y extracelulares), confiriendo de esta forma una fuerte estabilización del sarcolema y actuando de nexo de unión entre el citoesqueleto y la matriz extracelular (Davies and Nowak, 2006). Además, este complejo está implicado en distintas vías de señalización celular debido a la interacción de algunos de sus componentes con la calmodulina, relacionada con la vía PI3K/Akt (del inglés, *phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B*) y la proteína Grb2, asociada con la vía de señalización de Ras/MAPK (del inglés, *Ras/mitogen-activated protein kinases*); ambas implicadas en la supervivencia celular. Además de la ya comentada interacción con la enzima nNOS (Rando, 2001).

Entre los integrantes de este complejo encontramos (Figura 2) (Ehmsen *et al.*, 2002):

- **Complejo de distroglicanos.** Está formado por las glicoproteínas α y β -distroglicano. El β -distroglicano es una proteína transmembrana que se une con la distrofina en la zona sarcoplásmica e interactúa con el complejo de sarcoglicanos en el sarcolema. Además, se une al α -distroglicano que se encuentra en la parte extracelular. También interactúa con la proteína adaptadora Grb2 (señalización Ras/MAPK) y con la caveolina-3 asociada a esta vía de señalización y a la de nNOS. Por su parte, el α -distroglicano se une a la proteína de la matriz extracelular laminina-2, estableciéndose de esta manera la conexión matriz extracelular–citoesqueleto, aportando estabilidad al sarcolema (Ibragimov-Beskrovnaya *et al.*, 1992).
- **Complejo de sarcoglicanos.** En el tejido muscular esquelético podemos encontrar 4 tipos de sarcoglicanos, un conjunto de glicoproteínas transmembrana asociadas entre ellas: α , β , γ , δ . El γ -sarcoglicano puede interactuar directamente con la distrofina, mientras que el δ -sarcoglicano

interactúa con el complejo de distroglicanos. Dentro de este complejo se puede incluir a la proteína sarcospan, otra proteína transmembrana que está directamente conectada con los sarcoglicanos. La función principal de este complejo es la de estabilizar el complejo DAPC reforzando interacción entre la matriz extracelular, el sarcolema y el citoesqueleto, tanto a nivel mecánico-estructural como de señalización celular (Chan *et al.*, 1998). Mutaciones que afecten a cada uno de los distintos tipos de sarcoglicanos están asociados con distintos tipos de distrofias de cinturas: 2D, 2E, 2C, 2F, debido a deficiencias en los sarcoglicanos α , β , γ , δ , respectivamente (Bushby, 1999).

- **α -Distrobrevina.** Proteína sarcoplásmica que se une directamente a la distrofina y a la sintrofina. Además se ha visto que el complejo distrobrevina–sintrofina puede unirse al complejo de sarcoglicanos del sarcolema (Sadoulet-Puccio *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 2000). La α -distrobrevina también interacciona con filamentos intermedios, entre los que se encuentran la sincolina, que a su vez se une con la desmina. Como la desmina se une directamente con las proteínas del disco Z de los sarcómeros (unidad estructural y funcional del músculo esquelético), esta interacción conecta directamente el sarcolema con el lugar donde ocurre la contracción (Newey *et al.*, 2001; Poon *et al.*, 2002). La α -distrobrevina también interactúa con la sinemina, otro filamento intermedio presente en los sarcómeros, que a su vez interactúa con la distrofina, reforzando la conexión entre el sarcómero y el sarcolema (Bhosle *et al.*, 2006; Davies and Nowak, 2006).
- **Sintrofina.** Existen tres isoformas de sintrofina: α 1, β 1 (que se expresan mayoritariamente en el sarcolema) y la isoforma β 2 (mayormente expresada en la unión neuromuscular). Estas proteínas se unen a la distrofina y a la α -distrobrevina y actúan reclutando proteínas implicadas en diversas vías de señalización como nNOS, SAPK-3 (del inglés, *stress-activated protein kinase-3*) serina/treonina quinasas y canales de sodio dependientes de voltaje (Rando, 2001; Bhat *et al.*, 2013).

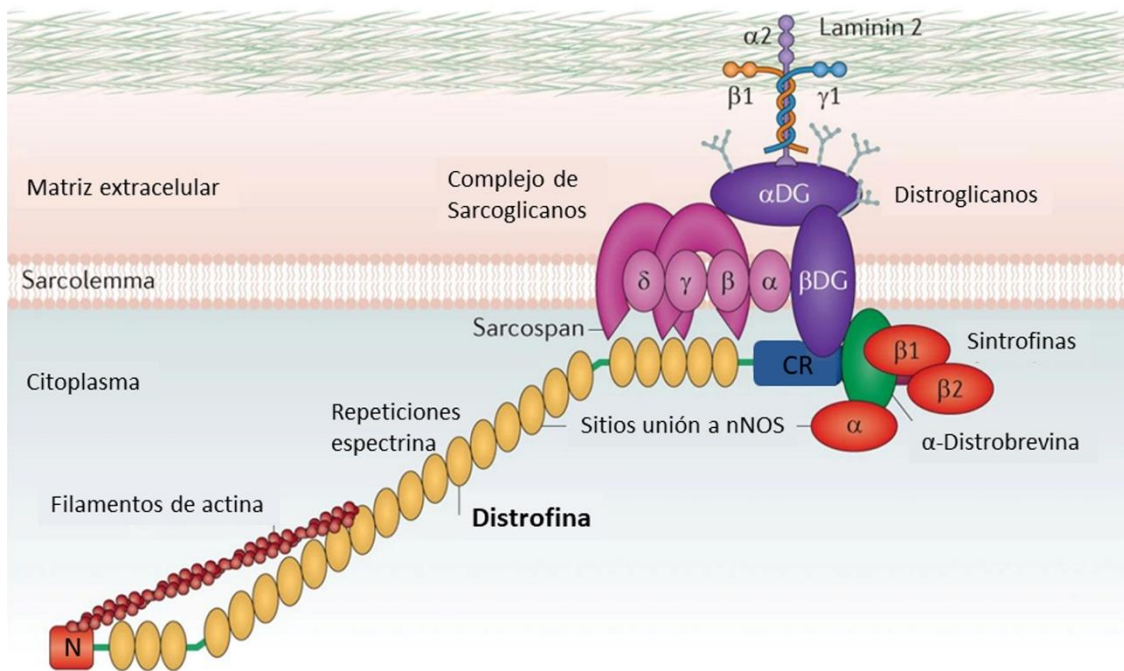


Figura 2. Distrofina y complejo de proteínas asociadas a la distrofina. Ilustración representando la interacción de la distrofina con los distintos integrantes del complejo de proteínas asociadas a la distrofina, que proporcionan estabilidad al sarcolemma al establecer una fuerte unión entre el citoesqueleto y la matriz extracelular. N (dominio amino terminal); CR (dominio rico en cisteínas); α,β DG (α,β -Distroglicanos). Imagen adaptada de (Fairclough *et al.*, 2013).

1.3. Patogenia de las distrofinopatías

1.3.1. Mutaciones en el gen *DMD* y su impacto sobre la distrofina

El enorme tamaño del gen *DMD* hace que la tasa de mutación sea mucho mayor que la que presentan de media el resto de los genes en el ser humano ($1 \cdot 10^{-4}$ vs. 10^{-5} - 10^{-6}). Además, un tercio de las mutaciones en *DMD* son de *novo*, por lo que en total podemos encontrarnos con una gran diversidad de éstas (Aartsma-Rus *et al.*, 2006a). En conjunto, las mutaciones más frecuentes que podemos encontrar son las deleciones de uno o varios exones, con una frecuencia en torno al 65%. Aunque éstas pueden ocurrir en cualquier zona del gen, hay dos zonas *hot spot* que acumulan la mayoría de las deleciones: la región central entre los exones 45–55 y la zona que incluye los exones 2–19 (Muntoni *et al.*, 2003). Las duplicaciones ocurren con una frecuencia de entre el 5% y 15% mientras que los casos restantes se deben a mutaciones puntuales (tanto mutaciones sin sentido como de cambio de sentido), mutaciones que alteran sitios de *splicing* o a pequeñas inserciones o deleciones. Las frecuencias de cada tipo de mutaciones pueden variar entre varios estudios, debido principalmente al uso de

distintas técnicas para su detección, así como de distintas poblaciones. Sin embargo, todos los estudios coinciden en que las deleciones son las más frecuentes (Muntoni et al., 2003; Dent et al., 2005; Flanigan et al., 2009; Mah et al., 2011).

Las diferencias en cuanto a la severidad fenotípica que encontramos entre los pacientes con mutaciones en *DMD* se pueden explicar mediante la denominada regla de la pauta de lectura. Esta regla, se basa en cómo las distintas mutaciones (principalmente deleciones y duplicaciones) afectan a la pauta de lectura y en consecuencia al proceso de traducción del transcrito.

En la *DMD*, las mutaciones que encontramos rompen la pauta de lectura del ARNm produciéndose un desplazamiento de la misma y dando lugar a la aparición de codones de parada prematuros. Estos, desencadenan el mecanismo celular llamado NMD (del inglés *non-sense mediated decay*) que produce la degradación de estos transcritos y como consecuencia, la ausencia de la proteína distrofina (**Figura 3**) (Kerr et al., 2001). De esta forma, independientemente de donde ocurran y del tamaño de las mutaciones (existen algunas excepciones que comentaremos a continuación), la consecuencia es siempre la misma, la ausencia total de distrofina.

En la *DMB*, caracterizada por presentar fenotipos más leves y variables, encontramos mutaciones que conservan la pauta de lectura. En estos casos se origina una proteína truncada (por ejemplo, más corta en el caso de las deleciones) pero parcialmente funcional (Figura 3). La funcionalidad de la distrofina resultante dependerá de los dominios afectados por la mutación y esto se traducirá en una mayor o menor severidad clínica (Monaco et al., 1988; Koenig et al., 1989).

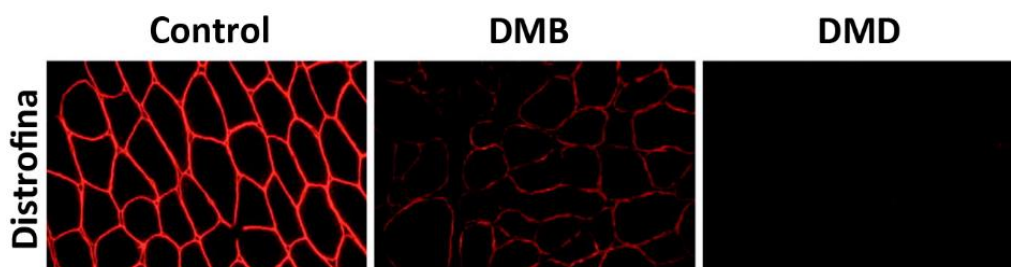


Figura 3. Inmunofluorescencia de distrofina en músculo de sujetos control, DMB y DMD. Puede apreciarse una correcta localización de la expresión de distrofina, pero con menor intensidad en el caso de DMB y la ausencia total de ésta en DMD. Imagen adaptada de (Blake et al., 2002).

Diversos estudios se han centrado en las mutaciones que conservan la pauta de lectura de *DMD* y que afectan al dominio central de la distrofina (**Figura 4**). Por un lado

de manera generalizada se ha tratado de establecer una asociación entre las mutaciones que ocurren en este dominio y las manifestaciones clínicas: mutaciones que ocurren en la parte proximal y central de este dominio se asocian con fenotipos más leves como calambres, mialgias e hiperCKemia; mientras que las mutaciones que afectan a la parte distal de este dominio se asocian fenotipos Becker “clásicos” (Beggs *et al.*, 1991, Aartsma-Rus *et al.*, 2006a). Sin embargo, existen numerosas excepciones que nos hacen dudar de la existencia de tal correlación.

Posteriormente, otros trabajos se focalizaron en analizar el impacto de diversas deleciones localizadas en el dominio central sobre la conformación de la proteína. Observaron que afectaban a la estructura de las repeticiones de espectrina de la distrofina de distinta forma encontrando, por un lado, aquellas que mantenían la estructura nativa de triple hélice, denominadas repetición híbrida y por otro, aquellas que no la reconstituían denominadas repetición fraccional. Ambos tipos de proteínas resultantes preservaban la estabilidad, sin embargo, la funcionalidad se veía afectada en el caso de las que poseían repeticiones fraccionales ya que presentaban una mayor dificultad para el plegamiento, alterando su capacidad estructural y estaban asociadas con fenotipos más graves. Por el contrario, las deleciones que originan repeticiones híbridas las presentaban sujetos con síntomas más leves (Kaspar *et al.*, 2009; Nicolas *et al.*, 2015; Nakamura *et al.*, 2017).

La regla de la pauta de lectura se cumple en el 92% de los casos, existiendo algunas excepciones (**Figura 4**) (Michel Koenig *et al.*, 1989; Muntoni *et al.*, 2003; Aartsma-Rus *et al.*, 2006):

- **Sujetos DMD con mutaciones que conservan la pauta de lectura.** Ocurre en casos que a pesar de la conservación de la pauta de lectura presentan fenotipos muy severos. Esto puede deberse a que las mutaciones alteran regiones esenciales de la distrofina, como los dominios de unión a actina o el dominio rico en cisteínas; así deleciones demasiado largas (más de 35 exones) que alteren considerablemente la funcionalidad de la proteína.
- **Sujetos DMB con mutaciones que rompen la pauta de lectura.** Es posible que las distintas mutaciones que rompen la pauta de lectura alteren el proceso de *splicing* pudiendo ocasionar saltos de exón que permitan recuperar la pauta y por tanto la producción de una distrofina con cierta funcionalidad. Este evento también lo podemos apreciar en las denominadas fibras revertidas presentes en un gran número de pacientes con DMD y que consiste en la presencia de algunas fibras que expresan distrofina, en un contexto de fibras sin dicha expresión

(Arechavala-Gomez *et al.*, 2010). Por otro lado, en el caso de las mutaciones localizadas a partir del exón 74 es posible que los codones de parada prematuros generados escapen al mecanismo NMD y se pueda expresar proteínas que mantienen cierta funcionalidad, (Kerr *et al.*, 2001).

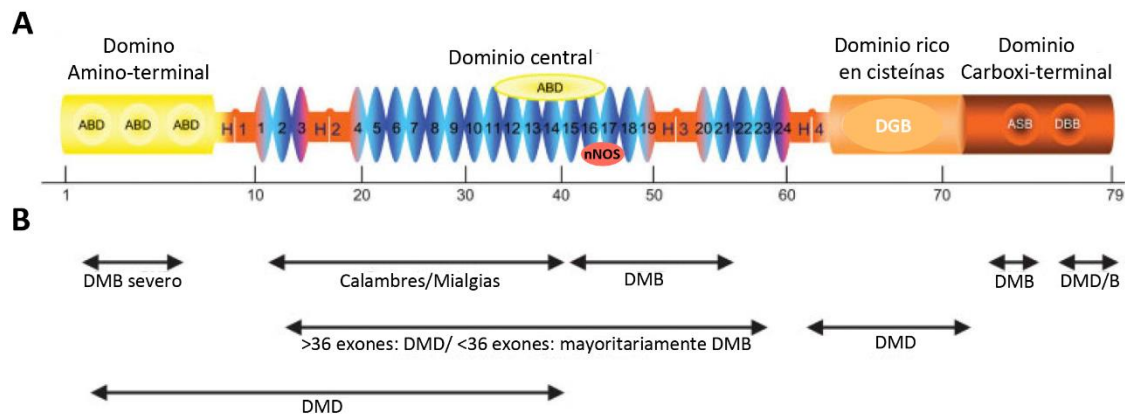


Figura 4. Estructura de la distrofina y correlación de la localización de mutaciones in-frame con los fenotipos. (A) La isoforma Dp427 de la distrofina contiene 4 dominios funcionales: (i) dominio Amino-terminal de unión a actina (ABD); (ii) dominio central de repeticiones de espectrina (R1-R24) interrumpido por 4 regiones bisagra (H1-H4). La enzima nNOS se une a la distrofina por las repeticiones R16 y R17. (iii) Dominio rico en cisteínas de unión al β -dystroglicano (DGB) y (iv) dominio carboxi-terminal de unión a sintrofina (ASB) y a distrobrevina (DBB). Los números que aparecen sobre una línea horizontal indican los exones. **(B)** Representación gráfica de la relación entre la localización de distintas delecciones en pauta y la severidad de los fenotipos. Imagen adaptada de (Aartsma-Rus *et al.*, 2006a).

1.3.2. Repercusión sobre la fibra muscular

1.3.2.1. *Alteraciones histopatológicas*

Las fibras musculares sufren importantes alteraciones debido a la falta de producción de distrofina funcional, que conlleva a la pérdida de su soporte estructural.

El análisis de biopsias musculares en pacientes distróficos es muy informativo, ayudando al diagnóstico de estos pacientes y a la evaluación del grado de afectación que estos presentan, ya pueden observarse cambios histológicos antes de que las manifestaciones clínicas sean apreciables. Según el grado de afectación podemos encontrar variabilidad en el tamaño de las fibras, presencia de núcleos centrales (en lugar de periféricos) o la presencia de fibras necróticas y degenerativas agrupadas en *clusters*. También podemos encontrar fibras regenerativas, (caracterizadas por ser de menor tamaño, basófilas y con núcleo central) producidas como mecanismo para tratar

de reemplazar las fibras dañadas (se suceden repetidos ciclos de degeneración-regeneración). Las fibras necróticas son fagocitadas, por lo que podemos encontrar la presencia de linfocitos CD4+ y macrófagos en el perimisio y endomisio. Esto, junto con la pérdida progresiva de la capacidad regenerativa del músculo conlleva al reemplazamiento gradual de las fibras musculares por tejido adiposo y conectivo fibrótico (**Figura 5**). La combinación de la progresiva fibrosis junto con la pérdida de fibras musculares contribuye a la aparición de la debilidad muscular (Emery *et al.*, 2015; Guiraud *et al.*, 2015).

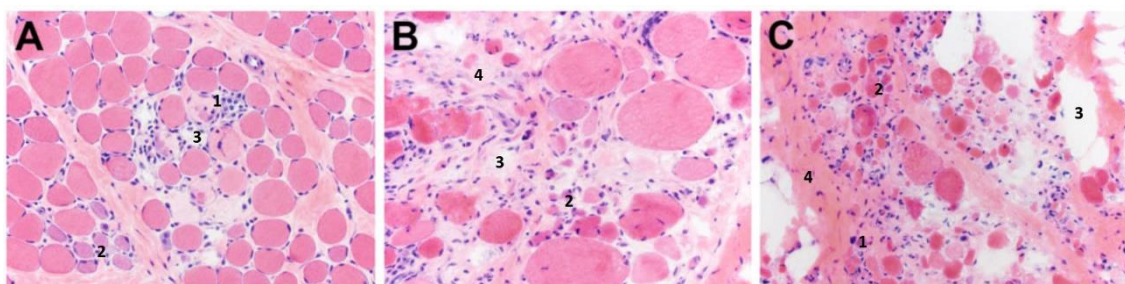


Figura 5. Representación histológica de secciones de músculo en distintos estados distróficos. Imágenes de tinción de Hematoxilina-Eosina de sujetos con distintos grados distróficos, **(A)** moderado observando variabilidad de fibras, fibras necróticas (1) y regenerativas (2) así como reemplazamiento por tejido adiposo (3) y fibrótico. Estas características se acentúan en grados más severos **(B, C)**.

1.3.2.2. Patomecanismos celulares

Desde el punto de vista molecular, la ausencia o mal funcionamiento de la distrofina altera y desencadena una serie de mecanismos que favorecen o dan lugar a la degeneración y patogénesis de la fibra muscular. Podemos diferenciar los siguientes:

Pérdida de la función estructural

Como ya hemos comentado, la distrofina junto con el complejo DAPC mantienen la integridad y estructura del sarcolema, conectando el citoesqueleto con la matriz extracelular. De esta manera se ayuda a amortiguar el estrés generado durante la contracción de los sarcómeros. En ausencia de distrofina, el sarcolema es más susceptible al daño tras la contracción. En 1975 Morki y Engel, observaron mediante microscopía electrónica lesiones en el sarcolema de fibras musculares de pacientes con DMD (Morki and Engel, 1975). Concretamente son las contracciones excéntricas (aquellas en las que se produce un alargamiento del músculo) las que provocan más

lesiones en el sarcolema de fibras distróficas ya que el estrés mecánico producido es mayor (Petrof *et al.*, 1993). La aparición de roturas en el sarcolema permite el influjo de sustancias extracelulares (como iones de Ca^{2+}) y que enzimas intracelulares como la CK se liberen del interior de la fibra muscular. Niveles elevados de CK pueden detectarse en suero de pacientes DMD y DMB (Mendell and Lloyd-Puryear, 2013) aunque no es un marcador específico debido a que esta elevación puede observarse en otro tipo de distrofias musculares o miopatías donde se produzca daño muscular.

Desregulación de la homeostasis del Ca^{2+}

Los niveles de Ca^{2+} aumentan en el sarcoplasma de las fibras musculares distróficas, debido a su influjo a través de un sarcolema desestabilizado en ausencia de distrofina (Bodensteiner and Engel, 1978). Este aumento de Ca^{2+} intracelular se debe también a otros factores adicionales. Una de las vías de entrada del Ca^{2+} al citoplasma parece ser a través de canales de calcio mecanosensibles TRPC (del inglés, *transient receptor potential channel*) que están sobreexpresados y sobreactivados en las fibras musculares distróficas (Franco and Lansman, 1990; Franco-Obregón and Lansman, 1994; Vandebrouck *et al.*, 2002). Además, la actividad de los canales de goteo de Ca^{2+} , que sirven para aumentar el influjo de este ion a través del sarcolema está aumentada. La elevación anormal de Ca^{2+} intracelular activa proteasas dependientes de Ca^{2+} como la calpaína, que es capaz de modificar la actividad de estos canales de goteo para que permanezcan más tiempo abiertos (Alderton and Steinhardt, 2000a, b). La calpaína también puede degradar proteínas del sarcolema, contribuyendo de esta forma a la aparición de necrosis de la fibra muscular (Vallejo-Illarramendi *et al.*, 2014). Un aumento anormal de Ca^{2+} intracelular puede causar la entrada excesiva de éste en la mitocondria, alterar la fosforilación oxidativa, lo que conlleva a una disminución en la generación de ATP y como consecuencia la muerte celular (Millay *et al.*, 2008).

Óxido nítrico, daño oxidativo y regeneración

Durante el curso de la enfermedad, se produce un aumento de estrés oxidativo, encontrando un incremento de la peroxidación de lípidos así como la nitrosilación de proteínas, lo que contribuye al daño de las células musculares (Rando *et al.*, 1998; Dudley *et al.*, 2006). En este proceso está implicado el óxido nítrico (NO, del inglés *nitric oxide*) y la enzima nNOS μ . Como hemos comentado, en condiciones normales la enzima se ancla al sarcolema gracias a su interacción con la distrofina y el complejo sintrofina-distrobrevina, (Lai *et al.*, 2009). Sin embargo, en ausencia de distrofina (o de los

dominios de ésta que la anclan al sarcolema) se produce la deslocalización de nNOS μ , produciendo NO citosólico que provoca la nitrosilación del receptor de la rianodina RYR1 (canales de calcio del retículo sarcoplásmico) fomentando la desregulación de la homeostasis de Ca²⁺ (Gentil *et al.*, 2012).

Por otro lado, el NO es un activador de las células satélite estimulando así el proceso de regeneración como mecanismo frente al daño muscular. Sin embargo, finalmente esta sobreactivación conlleva a una depleción de la población de células satélite favoreciendo el aumento de fibrosis muscular (Buono *et al.*, 2012).

Inflamación y fibrosis

Diversos procesos inmunológicos también contribuyen a la patogénesis muscular en DMD y DMB. La degeneración de las fibras musculares distróficas está relacionada con un aumento de macrófagos y linfocitos T CD4+ y CD8+ activados localmente, (Spencer *et al.*, 2001). Como consecuencia, se produce un aumento de citoquinas proinflamatorias como TNF- α (del inglés *tumor necrosis factor α*) e IFN- γ (interferón gamma). Estas citoquinas pueden producir un incremento del complejo mayor de histocompatibilidad I (CMH I) en las fibras musculares distróficas, presentando antígenos propios que son reconocidos por los linfocitos T, aumentando así el daño celular. Estos procesos de inflamación sostenida favorecen la aparición de fibrosis muscular, proceso en el que está implicado el TGF β (del inglés *transforming growth factor β*). Este factor se encuentra a mayores concentraciones en sujetos distróficos, localizándose en las fibras atroficas, necróticas y regenerativas, promoviendo el reemplazo del tejido muscular dañado por tejido fibrótico (Spencer and Tidball, 2001).

1.3.3. Factores modificadores en *trans*

Además de la consecuencia directa de la alteración de distrofina, existen otros factores en *trans* que pueden modificar el fenotipo resultante, debido a una diferente expresión o regulación de estos en distintos sujetos.

1.3.3.1. Epigenética

Además de la consecuencia directa de pérdida del soporte estructural de las fibras musculares, la ausencia de distrofina se ha visto relacionada con alteraciones epigenéticas que conllevan a la desregulación de la activación transcripcional de las células satélite (Rugowska *et al.*, 2021).

Uno de los elementos clave en la regulación epigenética son los microRNAs (miRNAs), un subtipo de ARNs no codificantes que están implicados en la regulación de la expresión génica a través de interacciones ARN-ARN post-transcripcionales. Existe un grupo de miRNAs expresados específicamente en músculo esquelético y cardíaco, que recibe el nombre de myomiRs y están relacionados con los procesos de proliferación, diferenciación y regeneración y activación de las células satélite (Horak *et al.*, 2016; Aránega *et al.*, 2021). Se ha visto que los niveles de estos myomiRs están desregulados en algunos desordenes musculares, como por ejemplo en DMD y DMB. Por esto, el estudio de algunos myomiRs presentes en suero ha cobrado relevancia por el papel que podrían tener como biomarcadores para el diagnóstico y prognosis de estas enfermedades (Li *et al.*, 2014). Se ha observado que el miR-31 está sobreexpresado en el tejido muscular de pacientes con DMD y actúa específicamente reprimiendo la expresión de distrofina (Cacchiarelli *et al.*, 2011). Por otro lado, recientemente se ha observado la sobreexpresión de miR-106b en las células satélite de un modelo de ratón distrófico cuya inhibición contribuye a la miogénesis y al aumento la regeneración muscular (Rodríguez-Outeiriño *et al.*, 2022). También podemos encontrar otros miRNAs desregulados, como miR-206 relacionado con la regeneración muscular; miR-1, relacionado con la regulación del estrés oxidativo; o miR-29 relacionado con los procesos fibróticos que aparecen. Adicionalmente, la expresión de los miRNAs está sujeta a una compleja regulación, que en algunos casos puede verse afectada por la deslocalización de la enzima nNOS μ y el estado de nitrosilación de las histonas deacetilasas que la regulan (Cacchiarelli *et al.*, 2010).

1.3.3.2. Genes modificadores de DMD

Diversos estudios se han centrado en la búsqueda de factores que puedan contribuir a la variabilidad de la progresión de los síntomas en DMD. Entre ellos, se ha identificado la presencia de ciertos polimorfismos (SNPs, del inglés *single nucleotide polymorphism*) en varios genes, que pueden actuar modificando el fenotipo final (Bello and Pegoraro, 2019).

SPP1

Este gen codifica para la proteína osteopontina, una citoquina secretada como respuesta a daño muscular y está implicada en los procesos de inflamación, regeneración y fibrosis. El estudio llevado a cabo por Pegoraro y colaboradores identificó que la presencia del SNP rs28357094 (que produce el cambio de una T por una G 66 pb aguas arriba del lugar de inicio de transcripción del gen) estaba relacionado con una pérdida de la ambulación temprana y mayor debilidad muscular, en dos cohortes independientes de pacientes DMD (Pegoraro *et al.*, 2011). La presencia del alelo con la variante mutante (G) actúa de manera dominante, es decir, que los pacientes que lo presentan tanto en homocigosis (GG) como heterocigosis (G/T), presentan peor progresión que los que presentan el alelo normal (TT). Sin embargo, posteriores estudios no pudieron validar esta asociación (Flanigan *et al.*, 2013; van den Bergen *et al.*, 2014). Posteriormente se observó que la presencia de rs28357094 con el alelo G, aumentaba la expresión de *SPP1* como respuesta a tratamiento con glucocorticoides, mientras que los pacientes con el genotipo TT, mantenían invariables sus niveles. Los pacientes que son tratados con glucocorticoides y presentan el alelo G, pierden la deambulación antes que los que no lo presentan. La edad de pérdida de deambulación entre los no tratados se mantiene invariable independientemente del genotipo (Bello *et al.*, 2015). Debido a esta sobreexpresión de *SPP1*, se produce una desregulación de los procesos que controla, aumentando la inflamación y la fibrosis en el músculo. De esta forma, estos resultados sugieren que *SPP1* desempeña un papel farmacodinámico en respuesta a los glucocorticoides en DMD.

LTBP4

Este gen codifica para la proteína LTBP4 (del inglés, *latent transforming growth factor β binding protein 4*). Esta proteína regula la actividad de TFG β , uniéndose a este receptor en la matriz extracelular, formando el complejo latente LTBP4-TFG β . Éste último es liberado de LTBP4 por la acción de diversas proteasas. Flanigan y colaboradores (Flanigan *et al.*, 2013) identificaron un haplotipo compuesto por los siguientes 4 SNPs en el gen *LTBP4*, produciendo cada uno un cambio de aminoácido: rs2303729 (V194I), rs1131620 (T787A), rs1051303 (T820A) y rs10880 (T1140M); dando lugar principalmente a los haplotipos VTTT e IAAM. El haplotipo IAAM estaba asociado con una pérdida de la deambulación más tardía en pacientes DMD (tanto tratados con GCs como

no) que el haplotipo VTTT y que el resto de los haplotipos minoritarios. Estos hallazgos fueron validados utilizando otras cohortes de pacientes DMD (Bello *et al.*, 2015; van den Bergen *et al.*, 2015). El efecto protector del haplotipo IAAM está relacionado con un mayor secuestro de TGF β debido a que la proteína LTBP4 con estos aminoácidos es más resistente a la acción de las proteasas, reduciendo de esta manera la cantidad de TGF β libre, lo que conlleva a una reducción de la aparición de fibrosis (Bello and Pegoraro, 2019).

THBS1

Este gen codifica para la proteína TSP-1 (del inglés, *thrombospondin-1*) que se encarga de liberar a TGF β de la proteína LTBP4 mediante proteólisis. El SNP rs2725797 (que produce un cambio de una G por una A) produce una disminución de la expresión de TSP-1, reduciendo de esta manera la activación de TGF β y la consecuente aparición de fibrosis (Weiss *et al.*, 2018); asociándose con un retraso en la pérdida de la deambulación en sujetos DMD.

CD40

Este gen codifica la proteína TNFR5 (del inglés, *tumor necrosis factor receptor superfamily member 5*), expresada en la superficie de las células presentadoras de antígeno y es necesaria para la polarización y activación de las células T. La presencia del SNP rs1883832 que produce un cambio de una C por una T, está asociada con una pérdida temprana de la deambulación en pacientes con DMD. Este SNP, reduce la expresión de CD40, pudiendo producir un fallo en los procesos de regeneración y favorecer la aparición de fibrosis en el músculo de pacientes con DMD (aunque el mecanismo de acción que conlleva a estos procesos no se conoce con exactitud) (Bello *et al.*, 2016b).

ACTN3

Este gen codifica la proteína α -actinina-3, que es uno de los componentes de la línea Z sarcomérica del músculo esquelético. El polimorfismo rs1815739 presente en este gen produce la aparición de un codón de parada (R577X) y la consecuente ausencia de proteína (parcial o total dependiendo si está presente en uno o dos alelos). Los pacientes DMD deambulantes que presentan el alelo nulo (577X) poseen menos fuerza muscular y necesitan más tiempo para recorrer 10 metros. Sorprendentemente, los pacientes heterocigotos (RX)

pierden la deambulaci3n antes que los RR (normal) y que los XX (ausencia total de prote3na), no habiendo diferencias significativas entre los dos 3ltimos. Este hallazgo podr3a deberse a que una p3rdida parcial de la prote3na, a pesar de producir una disminuci3n de la fuerza muscular, no sea suficiente como para activar los mecanismos compensatorios que produzcan un cambio hacia el metabolismo oxidativo y la generaci3n de fibras lentas, conocidas por ser menos susceptibles a la degeneraci3n causada por la ausencia de distrofina (Webster *et al.*, 1988; Hogarth *et al.*, 2017).

1.4. Aspectos cl3nicos de las distrofinopat3as

1.4.1. Distrofia muscular de Duchenne

La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD, OMIM:310200) es considerada la enfermedad ligada al cromosoma X m3s com3n, afectando a 1 de cada 3.500-5.000 ni3os reci3n nacidos (Emery, 1991; Emery *et al.*, 2015). Los primeros s3ntomas aparecen sobre los 2 a 5 a3os y se caracterizan por una debilidad progresiva principalmente de los m3sculos de extremidades inferiores y proximales, junto a rasgos peculiares como pseudo-hipertrofia de las pantorrillas y lordosis lumbar pronunciada. Estos ni3os presentan un retraso del inicio de la marcha que adem3s resulta insegura y sufren ca3das frecuentes, junto a una gran dificultad para correr y subir escaleras, y terminan desarrollando una forma caracter3stica de caminar denominada marcha anserina o "de pato". Tambi3n presentan dificultad para levantarse del suelo (maniobra de Gowers), teniendo que recurrir al apoyo de los brazos para ello sobre las piernas para enderezar el tronco (Gowers, 1879). Finalmente, alrededor de los 12 a3os, pierden la deambulaci3n y quedan confinados en una silla de ruedas por la impotencia de los miembros inferiores. A medida que la enfermedad avanza, la debilidad se extiende a los miembros superiores y desarrollan una escoliosis y deformidad de la caja tor3cica que restringe el flujo a3reo pulmonar, ya comprometido por la debilidad de los m3sculos respiratorios. La funci3n respiratoria se agrava gradualmente llegando un punto que se hace necesaria la ventilaci3n asistida. Los pacientes DMD tambi3n presentan problemas cardiacos que se agravan conforme avanza la enfermedad, con el desarrollo de una miocardiopat3a dilatada o de problemas de la conducci3n cardiaca (arritmias). Finalmente, estos pacientes fallecen entre la tercera o cuarta d3cada de vida, principalmente por problemas respiratorios, infecciones pulmonares (el 90% de los casos) o complicaciones cardiacas (Darras *et al.*, 2022).

Otro signo característico de los pacientes con DMD son las alteraciones cognitivas y del neurodesarrollo. Aproximadamente un 26% de ellos presentan deficiencia intelectual, que se documenta mediante un valor de coeficiente intelectual (CI) inferior a 70. Además, en torno a un 50%-70% de los sujetos DMD presentan retraso en el desarrollo del lenguaje, aunque finalmente una mayoría de ellos consiguen hablar con normalidad. También pueden presentar alteraciones cognitivas/conductuales como trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), autismo o problemas de aprendizaje (Ricotti *et al.*, 2016). Diversos estudios han relacionado los problemas cognitivos con la alteración de las isoformas cerebrales de la distrofina Dp140 y Dp71, (Bardoni *et al.*, 2000; Daoud *et al.*, 2009; Pane *et al.*, 2012; Chamova *et al.*, 2013).

1.4.2. Distrofia muscular de Becker

Como hemos comentado anteriormente, la distrofia muscular de Becker (DMB, OMIM:300376) suele estar causada por mutaciones en el gen *DMD* que no alteran la pauta de lectura permitiendo la producción de una distrofina, parcialmente funcional. Esta distrofia tiene menor incidencia que la DMD, apareciendo en 1 de cada 16.700-18.500 nacimientos del sexo masculino ('Orphanet: Distrofia muscular de Becker', n.d.).

Respecto a la DMD, los pacientes con DMB desarrollan síntomas más leves, tienen una progresión más lenta y la edad de aparición varía entre la infancia y la de adulto tardío. Por definición, la pérdida de la deambulacion en estos pacientes ocurre después de los 16 años, promediándose en torno a los 37 años en diversas series publicadas, aunque no resulta infrecuente encontrar pacientes de avanzada edad que la conservan (Yazaki *et al.*, 1999).

Cuando aparece la debilidad muscular, lo hace con una distribución similar a la presente en DMD afectando primariamente los músculos proximales de los miembros inferiores, extendiéndose más adelante a los miembros superiores y músculos distales. La hipertrofia de pantorrillas es muy común y la presencia de síntomas pseudometabólicos como calambres, mialgias y rabdomiólisis relacionados con esfuerzo o situaciones de estrés son bastante característicos de estos pacientes, sobre todo en los estadios iniciales o presintomáticos. También es frecuente la aparición de complicaciones cardiacas, siendo la principal causa de fallecimiento (aproximadamente el 50%) de los pacientes. En series publicadas la media de edad de fallecimiento la sitúan entre la cuarta o quinta década (Bushby and Gardner-Medwin, 1993; Comi *et al.*, 1994; Darras *et al.*, 2022), pero la información es retrospectiva y los criterios de inclusión no han sido homogéneos. Por otro lado, las complicaciones respiratorias no son tan

relevantes o no se han estudiado a fondo en este tipo de pacientes. Finalmente, los sujetos DMB también pueden presentar alteraciones cognitivas, conductuales, de aprendizaje y neurodesarrollo (Young *et al.*, 2008; Lambert *et al.*, 2020), aunque estos aspectos tampoco han sido estudiados tan a fondo como en la DMD.

1.4.3. Formas clínicas de distrofinopatía parciales o presentación aislada

De forma creciente se está tomando conciencia de casos de distrofinopatías que cursan de forma subclínica expresándose únicamente con hiperCKemia (Ferreiro *et al.*, 2009; Pons *et al.*, 2017) o con manifestaciones aisladas del espectro clínico de las distrofias DMD-DMB, como son los síntomas pseudometabólicos (Sanchez-Arjona, 2005); la miocardiopatía dilatada aislada (también denominada en inglés *X-linked dilated cardiomyopathy*) (Nakamura, 2015); o el déficit cognitivo sin debilidad muscular (North *et al.*, 1996). Aunque en general estas formas de presentación se suelen incluir en el capítulo de la distrofia muscular tipo Becker (Darras *et al.*, 2022), el tema tiene suficiente entidad para considerarlas aparte. Primero, porque estas situaciones cursan sin debilidad muscular que es el síntoma definitorio de la DMB; en segundo lugar, porque suponen un reto clínico que requiere un diagnóstico diferencial específico; y en tercer lugar porque subyacen mecanismos patogénicos todavía desconocidos que condicionan la presentación de dichas formas.

1.5. Aproximaciones terapéuticas de las distrofinopatías

Actualmente no existe una cura para las distrofinopatías y los esfuerzos están dirigidos al tratamiento de las manifestaciones asociadas a la enfermedad para ayudar a prolongar la supervivencia y la calidad de vida. Entre estas podemos encontrar la prevención del desarrollo de deformidades de la columna vertebral, el manejo de las complicaciones respiratorias y nutricionales (mediante alimentación a través de tubo gastrointestinal). En cuanto a las complicaciones cardíacas, se suelen utilizar fármacos antihipertensivos o beta-bloqueantes para mejorar la función del ventrículo izquierdo o para el tratamiento de arritmias; diuréticos en casos de infarto agudo de miocardio y en aquellos casos DMB con ausencia o leve afectación muscular pero con una severa cardiopatía puede estar indicado el trasplante cardíaco (Emery *et al.*, 2015; Darras *et al.*, 2022).

El único tratamiento farmacológico que ha demostrado mejorar la progresión de la enfermedad son los corticoides, ya que aumentan la fuerza y la función muscular, retrasando la edad de pérdida de la deambulación además de reducir el riesgo de

escoliosis y estabilizar la función pulmonar. Sin embargo, los glucocorticoides no evitan la evolución fatal de la enfermedad (Bushby *et al.*, 2010; Matthews *et al.*, 2016).

Las principales aproximaciones terapéuticas para DMD se basan en dos estrategias: la restauración de la expresión de distrofina (defecto primario) y el desarrollo de terapias enfocadas a tratar las consecuencias secundarias de la ausencia de esta proteína (defectos secundarios), como el aumento de inflamación, la desregulación de la homeostasis de Ca^{2+} , el aumento de estrés oxidativo, la desregulación mitocondrial, , aumento de fibrosis; así como potenciadores la regeneración muscular y la sobreexpresión de la utrofina, una proteína homóloga a la distrofina (Verhaart and Aartsma-Rus, 2019). Estos compuestos son aplicables a todos los sujetos con distrofinopatía pero aunque puedan retrasar la progresión de la enfermedad es necesario combinarlos junto con terapias enfocadas a resolver el defecto primario.

A continuación, nos centraremos en las terapias dirigidas a la recuperación de la distrofina.

1.5.1. Transferencia génica

Esta terapia se basa en la introducción del gen *DMD*, pero debido a su enorme extensión se han desarrollado versiones más sintéticas llamadas micro-distrofinas (μDys) que pueden ser empaquetadas en virus adenoasociados (AAV, del inglés *adeno-associated virus*) para su distribución sistémica. El diseño de las μDys surgió inicialmente del descubrimiento de grandes mutaciones en *DMD* que originaban distrofinas altamente funcionales y presentes en sujetos con síntomas leves (England *et al.*, 1990).

Actualmente hay tres tipos μDys en ensayos clínicos y tienen en común la presencia del dominio amino-terminal, el dominio rico en cisteínas, las repeticiones de espectrina R1 y R24 y las regiones bisagra H1 y H4; así como la ausencia del dominio C terminal (Duan, 2018; Happi Mbakam *et al.*, 2022). Particularmente, se ha observado que el dominio carboxi-terminal es esencial para la correcta interacción de la distrofina con las sintrofinas y las proteínas cavin (componentes de la caveolas) en músculo cardíaco y cuya ausencia altera la activación de rutas de señalización cardio-protectoras (Tandon *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2021). En la **Figura 6** puede observarse los componentes de los tres tipos de μDys , así como sus diferencias.

Aunque se han obtenido resultados esperanzadores en modelos animales y en los ensayos clínicos que se encuentran en desarrollo, como el aumento de expresión de

distrofina muscular y mejora funcional, esta terapia se enfrenta a importantes obstáculos (Duan, 2018). Por una parte, existen preocupaciones sobre la funcionalidad de estas pequeñas proteínas. Por otro lado, la expresión del transgén podría decaer en el tiempo. Finalmente, su distribución puede verse afectada por la respuesta inmune del huésped frente a proteínas de la cápside del AAV o frente a la propia μ Dys (Duan, 2018; Verhaart and Aartsma-Rus, 2019). Estudios adicionales son necesarios para resolver estos problemas y que la adición génica se convierta en una terapia factible para DMD.

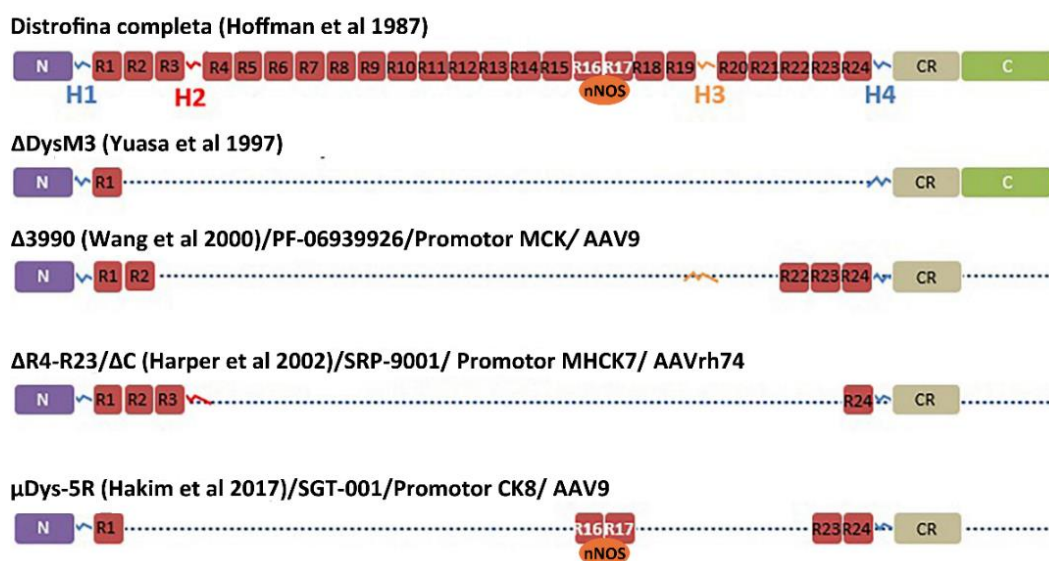


Figura 6. Variantes de la micro-distrofina. En primer lugar, se muestra la estructura de la distrofina completa con sus distintos dominios, que incluye el dominio amino-terminal (N); las regiones bisagra (H1-H4); el dominio central (RX) indicando el sitio de unión de la enzima nNOS (del inglés, *neural nitric oxide synthase*) (R16 y R17); el dominio rico en cisteínas (CR) y el dominio carboxi-terminal (C). La imagen ilustra las distintas versiones de micro-distrofinas (μ Dys) (con sus particularidades estructurales) que se encuentran actualmente en ensayos clínicos, incluyendo el modelo original de Yuasa (Yuasa *et al.*, 1997). La Δ 3990 se utiliza en el ensayo PF-06939926 (Pífzer) con el promotor MCK (promotor murino de la creatina quinasa, CK) y AAV9 (adenovirus asociado serotipo 9) para su distribución. La Δ R4-R23/ Δ C se utiliza en el ensayo SRRP-9001 (Nationwide Children's Hospital) con el promotor MHCK7 (promotor específico de músculo esquelético, con expresión potenciada en músculo cardíaco) y AAVrh74. La μ Dys-5R tiene la particularidad de incluir las repeticiones R16 y R17 y se utiliza en el ensayo SGT-001 (Solid Bioscience) utiliza el promotor específico de músculo CK8 y AAV9. Imagen modificada de (Happi Mbakam *et al.*, 2022).

1.5.2. Terapia con células madre

Este tipo de terapias tienen como objetivo reponer el reservorio de células madre con células que expresen distrofina. Mientras que un ensayo clínico en el que se utilizó mesoangioblastos de un donante HLA-compatible no demostró mejoras funcionales

(Cossu *et al.*, 2015), estudios preclínicos recientes se han centrado en el trasplante autólogo de células madre corregidas (Meng *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2020). Sin embargo, esta terapia se enfrenta a importantes retos como la baja eficiencia y distribución, así como el riesgo de la aparición de tumores en los pacientes tratados.

1.5.3. Atalureno

El atalureno es un compuesto químico que ha sido autorizado de manera condicional por la Agencia Europea del Medicamento para su el tratamiento de pacientes DMD ambulantes con mutaciones sin sentido causantes codones prematuros de parada (alrededor del 13%-15% pacientes DMD). Este fármaco es capaz de interferir con los ribosomas durante la traducción evitando que reconozcan el codón de parada prematuro e introduciendo un aminoácido, permitiendo así la producción de la proteína. Sin embargo, no se ha confirmado que el tratamiento aumente la producción de distrofina y su eficacia clínica es muy limitada (Politano, 2021).

1.5.4. Salto de exón

Esta terapia está basada en las mutaciones que mantienen la pauta de lectura y dan lugar a distrofinas con cierta funcionalidad. De hecho, el estudio de los fenotipos asociados a estas mutaciones es esencial para determinar las delecciones más favorables a replicar mediante el salto de exón (Anthony *et al.*, 2011, 2014a).

El objetivo de esta terapia es recuperar la pauta de lectura del ARNm mediante el uso de oligonucleótidos antisentido (AON) que se unen a secuencias consenso del pre-ARNm de un determinado exón, evitando así ser reconocido por la maquinaria de *splicing* celular, no incluyéndose en el ARNm maduro y consiguiendo por tanto la recuperación de la expresión de distrofina (Aartsma-Rus *et al.*, 2009). Podemos encontrar distintos tipos de AONs atendiendo a su estructura química: PMO (del inglés *phosphorodiamidate morpholino oligomers*), 2'OMePS (del inglés *2'-O-methyl-modified-phosphorothioate*), la nueva generación de PMOs conjugados con péptidos que favorecen la entrada celular (PPMOs); así como la síntesis de 2'OMePS estereopuros para aumentar su eficiencia (Fortunato *et al.*, 2021b).

Actualmente 4 PMOs han recibido la aprobación de la FDA (del inglés, *Food and Drug Administration of United States of America*): Eteplirsén (para el salto del exón 51, aplicable al 13% de los pacientes DMD); Golodirsén y Vitolarsén (para el salto del exón 53, aplicable al 8%-10% de pacientes DMD) y Casimersén (para el salto del exón 45,

aplicable al 8% de pacientes DMD) (Fortunato *et al.*, 2021a). A pesar de su aprobación por la FDA, presentan una captación sub-óptima por el tejido diana, evidenciada por la ligera recuperación de la expresión de distrofina en músculo (menos del 3% en todos los casos); así como una discutible mejora funcional de los pacientes tras su administración. Otro principal inconveniente de esta terapia es que es específica de cada tipo de mutación y aplicable a un número limitado de pacientes (siendo el salto del exón 51 el de mayor aplicabilidad). Además, hay que tener en cuenta de la necesidad de su administración por vía intravenosa semanalmente así como la aparición de toxicidad y efectos adversos con algunos compuestos.

Ensayos clínicos con la nueva generación de AONs están en marcha para evaluar si producen un aumento de eficacia y seguridad. Por ejemplo, la nueva generación de Eteplirsén (con conjugado PPMO) ha demostrado unos resultados preliminares alentadores, con una expresión de distrofina del 6,55% (Happi Mbakam *et al.*, 2022).

1.5.5. Edición génica mediante CRISPR-Cas9

El sistema CRISPR-Cas9 (del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9*) fue identificado por el investigador español Francis Mójica, como parte del sistema inmune adaptativo de bacterias y arqueas frente a ADN invasor (Mojica *et al.*, 1993, 2000, 2005). Posteriormente se identificaron los elementos esenciales de este sistema (Jinek *et al.*, 2012) y se adaptaron para la edición genómica de células de humanas (Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013) y modelos animales (Wang *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). La gran precisión, eficiencia, simplicidad y versatilidad de este sistema ha supuesto una enorme revolución en el campo de la edición y la terapia génica; de tal manera que las investigadoras Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna recibieron en 2020 el Premio Nobel de Química por sus avances sobre el sistema CRISPR-Cas9 ('Press release: The Nobel Prize in Chemistry 2020 - NobelPrize.org', n.d.).

Los elementos esenciales del sistema CRISPR-Cas9 utilizados para edición génica (principalmente derivados de *Streptococcus pyogenes*) son la nucleasa Cas9 y el ARN guía (gRNA), compuesto a su vez por 2 moléculas de ARN: el crRNA (del inglés, *CRISPR RNA*) y el tracrRNA (del inglés *trans-activating crRNA*). El tracrRNA actúa de unión entre el crRNA y la nucleasa Cas9. Por otro lado, es el crRNA el que contiene una secuencia monocatenaria de 20 nucleótidos complementaria al sitio del genoma que se quiere editar, donde además es necesaria la presencia de la secuencia PAM 5'-NGG-3' (del inglés *Protospacer Adjacent Motif*), adyacente a la secuencia diana. Una vez la

Cas9 es dirigida por el gRNA a la secuencia diana y reconoce la PAM, produce un corte de doble cadena en el ADN (DSB, del inglés *double strand break*) (Doudna and Charpentier, 2014). La maquinaria celular dispone de dos mecanismos para reparar los DSB: la unión de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés *non-homologous end joining*), un mecanismo propenso a la introducción de inserciones y deleciones (indels); y la recombinación homóloga (HDR, del inglés *homologous direct repair*), mecanismo menos frecuente que en presencia de un ADN molde produce una reparación precisa (Mojica and Montoliu, 2016). Ambos mecanismos pueden utilizarse según nuestros objetivos para producir disrupción génica (mediante NHEJ) o la corrección precisa de una mutación (mediante HDR) (**Figura 7A**).

El sistema CRISPR-Cas9 ha sido ampliamente utilizado en DMD. Al igual que la terapia de salto de exón, es posible recuperar la pauta de lectura de *DMD* introduciendo de manera simultánea 2 complejos CRISPR-Cas9 para que produzcan una escisión del exón o exones de interés, dando lugar a una proteína truncada pero parcialmente funcional (similar a las que encontramos en DMB) (**Figura 7B**). La principal ventaja frente a los AONs es que, al actuar a nivel genómico, la escisión de los exones es permanente y estable. De hecho, se han obtenido esperanzadores resultados tanto en modelos *in vitro* (Min *et al.*, 2019; Soblechero-Martín *et al.*, 2021) como *in vivo* (**Figura 7C**) (Long *et al.*, 2016; Nelson *et al.*, 2016; Tabebordbar *et al.*, 2016; Amoasii *et al.*, 2018). Sin embargo, los principales inconvenientes de este sistema son la producción de cortes inespecíficos (del inglés, *off-targets*) en el genoma del organismo diana, así como la respuesta inmune del huésped frente a la propia Cas9 o el vehículo en el que es introducido en el organismo (Charlesworth *et al.*, 2019; Nelson *et al.*, 2019). Por lo tanto, esfuerzos adicionales son necesarios para abordar estos retos y que la edición génica pueda convertirse en una terapia plausible para DMD.

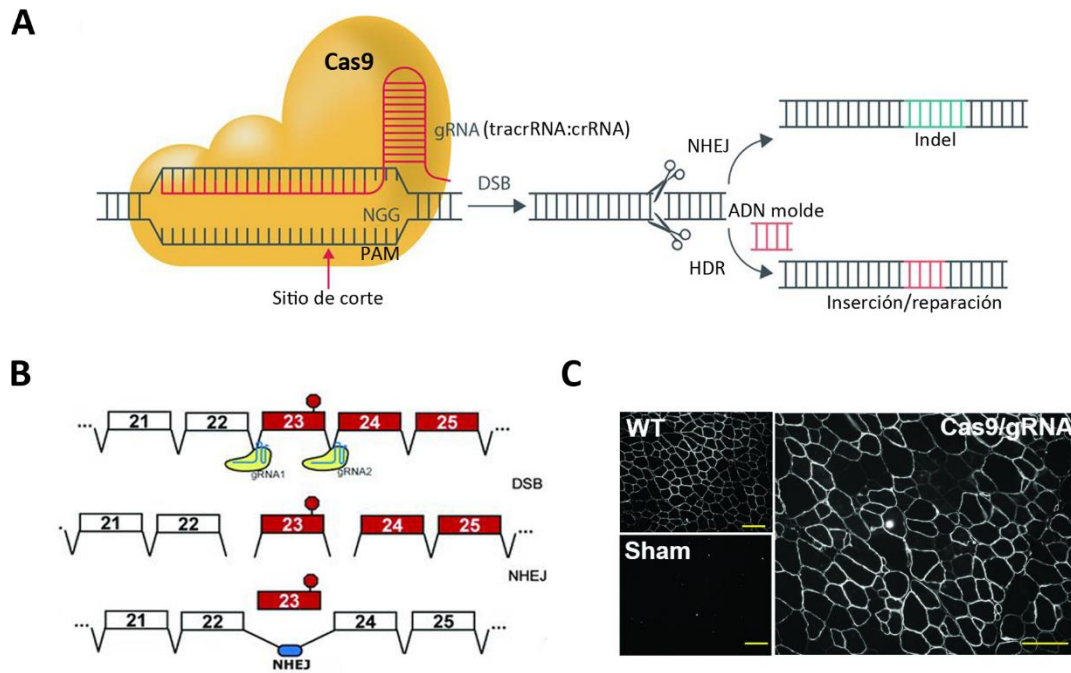


Figura 7. Sistema CRISPR-Cas9 y su aplicación en DMD. (A) El sistema CRISPR-Cas9 está compuesto por la nucleasa Cas9 y el gRNA. Este a su vez está constituido por el crRNA que contiene la región homóloga a la zona del genoma de interés, adyacente a la secuencia PAM (5'-NGG-3') y el tracrRNA, que se une con el crRNA y con la nucleasa Cas9. Una vez la nucleasa es dirigida por el gRNA a la zona de interés y reconoce la secuencia PAM produce un corte de doble cadena en el ADN (DSB), que puede repararse por el mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ, introduciendo indels) o mediante recombinación homóloga (HDR, que en presencia de un ADN molde realiza una precisa reparación, o modificaciones específicas). (B) Uso de dos complejos gRNAs que hibridan en los intrones 22 y 23 para eliminar el exón 23 de DMD del modelo de ratón mdx, que contiene una mutación que causa un codón prematuro. Los DSB se reparan por NHEJ, empalmándose la zona intrónicas contiguas, restaura la pauta de lectura del gen DMD. (C) Como consecuencia se recupera la expresión de distrofina en las fibras musculares de los ratones mdx tratados (imagen Cas9-gRNA), frente a los que no (Sham). WT: músculo de ratón sano. Escala= 100 μ m. Imagen (A) adapta de (González-Romero *et al.*, 2019) y (B,C) adaptada de (Nelson *et al.*, 2016).

2. DELECIÓN DE LOS EXONES 45–55 EN EL GEN *DMD*

Dentro de las distintas mutaciones que conservan la pauta de lectura, es de especial interés la delección de los exones 45 al 55 en *DMD* (del45–55). Esta delección afecta al dominio central de la distrofina y da lugar a una proteína más corta (360 KDa) que además presenta la conformación estructural favorable de repetición híbrida de espectrina (**Figura 8**). A pesar de la falta de 11 exones, esta delección está asociada con fenotipos favorables, pudiéndose encontrar en sujetos con afectación muscular leve (calambres, mialgias, intolerancia al ejercicio) e incluso en individuos totalmente asintomáticos a edades avanzadas que cursan con hiperCKemia aislada. Sin embargo, también hay algunos sujetos con esta delección que presentan afectación muscular severa (incluyendo casos registrados como fenotipo DMD), además de la presencia de serias complicaciones cardíacas (Yazaki *et al.*, 1999; Bérout *et al.*, 2007; Ferreiro *et al.*, 2009; Taglia *et al.*, 2015; Nakamura *et al.*, 2017; Echigoya *et al.*, 2019).

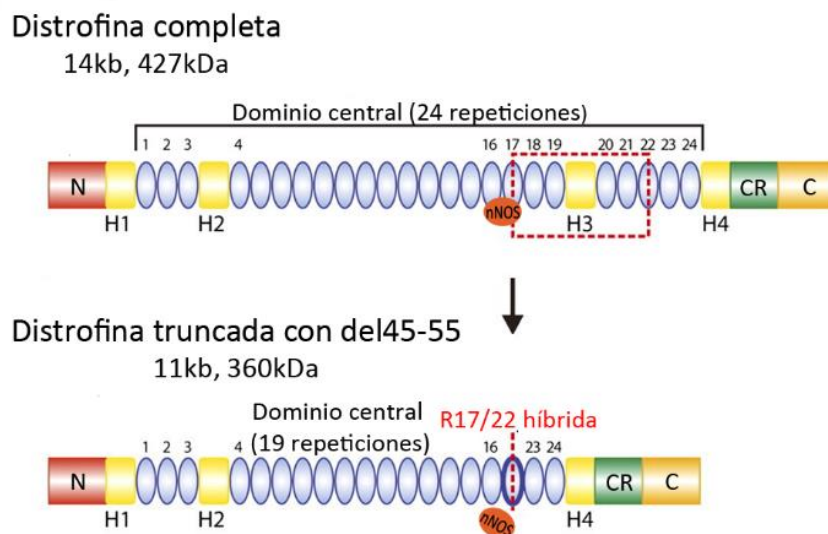


Figura 8. Estructura de la distrofina completa y tras la del45–55. Como podemos observar, la del45–55 afecta al dominio central de la distrofina, dando lugar a una proteína más corta y con la conformación híbrida en la unión de las repeticiones 17 y 22 (R17/22). La del45–55 afecta al sitio de unión de la enzima nNOS, que en condiciones normales se une a las repeticiones R16 y R17. N: dominio amino-terminal de unión a la actina; H1-H4: regiones bisagra; CR: dominio rico en cisteínas y C: dominio carboxi-terminal. Imagen modificada de (Aoki *et al.*, 2012).

Desde el punto de vista terapéutico, esta delección es enormemente interesante debido a que hasta el 60% de las mutaciones en *DMD* están localizadas entre estos exones y podría ser beneficioso para un mayor número de sujetos que con una

mutagénesis en la que se realiza un salto único de exón (Bérout *et al.*, 2007; Flanigan *et al.*, 2009; Kaspar *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2017). De hecho, se han llevado a cabo satisfactoriamente distintas aproximaciones de salto de los exones 45–55, utilizando cócteles de AONs tanto en modelos celulares como animales (Aoki *et al.*, 2012; Echigoya *et al.*, 2015, 2019; Lee *et al.*, 2018). Sin embargo, presenta notables obstáculos como una eficiencia limitada (ligada a una baja distribución del conjunto de AONs), la producción de diversos transcritos intermedios no deseados (tanto que conservan la pauta de lectura como no) como consecuencia de la eficiencia desigual de cada AON, o problemas de toxicidad (van Vliet *et al.*, 2008; Echigoya *et al.*, 2015, 2019; Aslesh *et al.*, 2018). La escisión de los exones 45–55 también se ha conseguido mediante el sistema CRISPR-Cas9 tanto en modelos DMD celulares (Ousterout *et al.*, 2015; Young *et al.*, 2016) como animal (Young *et al.*, 2017), demostrando la capacidad de este sistema de producir grandes deleciones de manera eficiente y con un diseño más sencillo para recuperar la expresión de distrofina. Además, con el sistema CRISPR-Cas9 es posible crear una deleción a medida, manteniendo o interrumpiendo las secuencias reguladoras localizadas en los intrones 44 y 55 según nos interese. Sin embargo, aún son necesarios estudios donde se administre el sistema CRISPR-Cas9 con esta estrategia de manera sistémica, así como resolver los inconvenientes ya comentados previamente asociados a esta tecnología.

Debido a la variabilidad fenotípica entre los sujetos con la del45–55 y para que esta deleción se convierta en una alternativa terapéutica para DMD es necesario profundizar en el estudio e identificación de los posibles factores que pueden ser responsables de ello. Entre los posibles candidatos podemos encontrar factores en *cis* y *trans*.

2.1. Factores modificadores en *cis*

2.1.1. Factores intrónicos

Los intrones 44 y 55 del gen *DMD* son extraordinariamente largos, con 248 kb y 120 kb respectivamente. A pesar de que todos los pacientes con esta deleción carecen de la misma región codificante, los puntos de rotura intrónicos pueden variar enormemente de uno a otro, pudiendo alterar distintos factores intrónicos afectando al fenotipo resultante. A continuación, se describen algunos de los factores que podrían verse afectados.

Isoformas de la distrofina Dp140 y Dp116

Las secuencias reguladoras y los primeros exones de las isoformas Dp140 y Dp116 se localizan en el intrón 44 (Lidov *et al.*, 1995) y en el 55 (Byers *et al.*, 1993) de *DMD* respectivamente. La isoforma Dp140 se expresa mayoritariamente durante el desarrollo fetal del cerebro, aunque también se han visto que está altamente expresada en la corteza cerebral y en el cerebelo adulto (Doorenweerd *et al.*, 2017). Distintos estudios han establecido una asociación entre mutaciones en *DMD* que afectan a esta isoforma con la presencia de alteraciones cognitivas/conductuales (Felisari *et al.*, 2000; Chamova *et al.*, 2013). Por lo que respecta a la isoforma Dp116, expresada en las células de Schwann de los nervios periféricos (Byers *et al.*, 1993), hasta el momento no se ha encontrado ninguna implicación clínica relacionado con su deficiencia (Matsuo *et al.*, 2017).

Long non-coding RNA

Estudios transcriptómicos han revelado la existencia de un gran número de ARNs que no codifican para ninguna proteína. Entre estos se encuentran los lncRNA (del inglés, *long non-coding RNA*) con una extensión de más de 200 pb y que pueden transcribirse desde regiones intrónicas (Mercer *et al.*, 2009). El equipo de Bovolenta identificó 4 lncRNA de localización nuclear y cuyo inicio de transcripción residía en los intrones 44 y 55 del gen *DMD*: lncRNA44s, lncRNA44s2, lncRNA55s y lncRNA55as. Se observó que éstos se expresaban preferentemente en los mismos tejidos que las isoformas largas de la distrofina y cuyos niveles se correlacionaban inversamente con los ARNm de estas isoformas. De esta forma, estos lncRNA interaccionan con el promotor de la isoforma Dp427, reprimiendo su transcripción (Bovolenta *et al.*, 2012).

Alteración del proceso de splicing

La generación de reordenamientos genómicos como el que encontramos en la del45–55 puede acercar secuencias de *splicing* (dadores o aceptores) que anteriormente estaban muy alejadas; así como la disrupción de secuencias reguladoras (potenciadores o silenciadores). Esto puede dar lugar a que ciertas secuencias intrónicas se incluyan en el ARNm maduro (pseudoxones) (Greer *et al.*, 2015; Keegan, 2020), o alternativamente el salto de uno o varios exones generando transcritos con codones de parada prematuros que eviten la

expresión de la distrofina. Estos eventos también pueden generar transcritos que mantengan la pauta de lectura, pero que puedan alterar la estructura y funcionalidad de la distrofina. En conjunto, la producción de distintos eventos de *splicing* alternativos puede contribuir a la severidad clínica (Tuffery-Giraud *et al.*, 2017).

Distintos pacientes con la del45–55, pueden tener distintos puntos de rotura en los intrones 44 y 55 del gen *DMD*, alterando los factores comentados anteriormente de distinta manera, pudiendo tener influencia sobre el fenotipo final, contribuyendo así a la variabilidad clínica que se observa en los sujetos con esta mutación. Como consecuencia de esto, es extremadamente importante analizar y determinar con precisión los puntos de rotura intrónicos en estos pacientes, para saber con seguridad que factores pueden verse afectados. Además, es necesaria la caracterización de las secuencias cercanas a los puntos de rotura para conocer con exactitud los mecanismos genómicos responsables de la producción de esta delección y ver si son comunes para otras delecciones en *DMD*, (Miyazaki *et al.*, 2009; Esposito *et al.*, 2017; Keegan *et al.*, 2019).

2.1.2. Interacción distrofina-nNOS

Como se ha comentado previamente, la enzima nNOS μ se localiza en la zona subsarcolémica gracias a su unión con la distrofina por las repeticiones de espectrina R16 y R17 de ésta (codificado por los exones 42-45) (Lai *et al.*, 2009). En los pacientes con la del45–55, parte de la repetición R17 esta delecionada, pudiendo alterar dicha unión. En un estudio llevado a cabo por Gentil y su colaboradores de una serie de pacientes con del45-55 (Gentil *et al.*, 2012) se observó un descenso de la expresión de nNOS μ en la mayoría de éstos. Éste descenso, se ha visto que está regulado por una serie de miRNAs que están sobreexpresados en estos pacientes (Guilbaud *et al.*, 2018). Sin embargo, la gravedad fenotípica que observó Gentil no se correlacionaba con los niveles de nNOS μ , sino que con su localización. Los fenotipos más graves los presentaban aquellos sujetos en los que nNOS μ perdía su anclaje al sarcolema y se localizaba citosólicamente, que como ya hemos comentado en el apartado 1.3.2.2, contribuye a la desregulación de la homeostasis de Ca²⁺ y la patogénesis. Sin embargo, pacientes con la misma delección en los que esta enzima se localizaba anclada a la zona interna del sarcolema presentaban fenotipos más favorables (Gentil *et al.*, 2012).

A pesar de estas contribuciones todavía está por resolver la razón por la que distintos pacientes con la del45–55 presentan una distinta localización de nNOS μ .

Podría deberse a efectos epigenéticos como se sugería en el trabajo de Gentil, aunque también podría ser una consecuencia más que una causa. Es decir, que aquellos individuos con una clínica más severa presenten una mayor afectación muscular (con mayor alteración del sarcolema) que produzca dicha deslocalización. Además, cabe recordar que la distrofina también permite la localización sarcolémica de la enzima nNOS a través de la interacción con las sintrofinas, por medio del dominio carboxi-terminal, conservado en el caso de la del45–55.

2.2. Factores modificadores en *trans*

Entre los distintos factores en *trans* que pueden contribuir a la variabilidad fenotípica observada en los sujetos con la del45–55 cabe destacar la influencia de los mecanismos epigenéticos y los genes modificadores de DMD, comentados previamente en el apartado 1.3.3.

2.2.1. Mutaciones concurrentes en otros genes

Como previamente se ha descrito, la presencia de mutaciones adicionales en genes miopáticos en sujetos con deleciones que conservan la pauta del gen *DMD*, puede actuar como agravante de la severidad (Kerst *et al.*, 2000), siendo un punto a tener en cuenta ya que podría contribuir a la variabilidad fenotípica de los sujetos con la del45–55.

HIPÓTESIS

La hipótesis en la que se basa la presente tesis doctoral es:

La delección de los exones 45–55 en el gen *DMD* puede convertirse en un modelo terapéutico para la distrofia muscular de Duchenne, pero antes es necesario reconocer los mecanismos responsables de la variabilidad fenotípica que expresa y, sobre todo, entender la razón de su presentación asintomática.

OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es el análisis de la delección de los exones 45–55 en el gen *DMD* para tratar de desvelar los factores que promueven su presentación de manera asintomática, de forma que pueda replicarse como modelo de terapia para la distrofia muscular de Duchenne. Con este fin, planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1) Estudio a fondo de una cohorte de sujetos con la delección 45–55 en el gen *DMD*. Caracterización clínica y genética.
- 2) Análisis de los potenciales factores modificadores del fenotipo en *cis* y *trans* que puedan explicar la variabilidad clínica asociada a la del45–55.
- 3) Aproximación de la del45–55 como posible modelo de terapia, mediante su reproducción en una línea de mioblastos DMD utilizando el sistema de edición génica CRISPR-Cas9.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ESTUDIO DE UNA COHORTE DE SUJETOS CON LA del45–55

1.1. Caracterización clínica de los pacientes

1.1.1. Pacientes

Se llevó a cabo una búsqueda de sujetos que presentaran la del45–55 en el gen *DMD* mediante un estudio cooperativo entre distintos centros españoles de enfermedades neuromusculares, liderado por el Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe) y el Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia en colaboración con el Hospital Sant Pau de Barcelona. Además, se consultaron los registros de pacientes de la asociación Duchenne Parent Project España y del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER, Instituto de Salud Carlos III). Los casos índice fueron contactados por su respectivo neurólogo o neuropediatra y fueron invitados a participar en el estudio. Los datos clínicos de los informes hospitalarios o de atención primaria fueron obtenidos a partir del respectivo facultativo con el consentimiento del paciente o de su pariente más cercano y con la aprobación del jefe de servicio correspondiente. El protocolo llevado a cabo en este estudio fue aprobado por el Comité de ética del Hospital La Fe de Valencia (código **2018/0200, Anexo I**), además de la obtención del consentimiento informado según la declaración de Helsinki firmado por los pacientes o sus respectivos padres o tutores legales.

1.1.2. Aspectos clínicos

Se aplicó un protocolo que recogía aspectos clínicos relevantes como datos demográficos, historia familiar, hitos del desarrollo, edad de aparición de los primeros síntomas (así como de los subsecuentes) y la edad a la que aparecían determinados aspectos relevantes de la enfermedad. Se llevó a cabo una completa evaluación funcional utilizando la escala de Vignos modificada (Vignos and Archibald, 1960): grado 0= hiperCKemia y desarrollo de todas las actividades con normalidad; grado 1= deambulación normal pero incapacidad para correr; grado 2= incapacidad de andar de puntillas y marcha anserina; grado 3= debilidad muscular evidente, marcha en estepaje y uso de pasamanos para subir escaleras; grado 4= dificultad para levantarse del suelo, signo de Gowers; grado 5= incapacidad para subir escaleras; grado 6= incapacidad para la incorporación desde una silla; grado 7= marcha con ayuda o uso de bastón; grado 8= uso de silla de ruedas; grado 9= incapacidad para comer, beber o permanecer sentado

sin asistencia; grado 10= confinado en cama. Las evaluaciones cardiológicas y respiratorias de cada paciente fueron realizadas por el especialista del centro correspondiente.

Para la evaluación cognitiva de los pacientes adultos, el protocolo incluía preguntas sobre logros del neurodesarrollo, rendimiento escolar y social, así como alteraciones del comportamiento y psiquiátricas. Cuando se reportó alguna alteración se procedió a una evaluación exhaustiva mediante la aplicación de la batería de test de Weschler para adultos. Por otro lado, todos los pacientes pediátricos fueron evaluados de manera sistemática por el mismo neuropsicólogo. Este análisis consistía en el uso de una batería de test validados, empleados en la evaluación de pacientes DMD (Ricotti *et al.*, 2016) y que cubren distintas funciones cognitivas: inteligencia general mediante el test de Raven; la memoria de trabajo mediante la prueba de Digit Span, un subtest de la batería del WISC IV (escala de Weschler de inteligencia para niños); procesamiento fonológico y fluidez verbal mediante la aplicación de un subtest de la batería de NEPSY II; función ejecutiva y la capacidad de resolución de problemas mediante la prueba de la Torre de Londres. Los problemas emocionales y del comportamiento fueron evaluando mediante el cuestionario de CBCL de Achenbach (del inglés *Child Behaviour Checklist*).

En el caso de aquellos pacientes que no era posible concertar una visita presencial su evaluación se realizó vía telefónica mediante la aplicación de un cuestionario estructurado que recogía información relevante sobre datos familiares, aspectos clínicos principales y edad de aparición de los síntomas.

Los sujetos que presentaban la delección fueron clasificados en uno de los siguientes fenotipos:

- HiperCKemia aislada. Incluyendo casos totalmente asintomáticos o paucisintomáticos asociados con síntomas menores como pseudometabólicos (mialgia, calambres o rabdomiólisis inducida por ejercicio o factores extenuantes).
- Fenotipo DMB. En aquellos sujetos donde los síntomas aparecían a partir de los 40 años, les denominamos DMB de inicio tardío.
- Cardiopatía aislada.

Por otro lado, la severidad muscular se clasificó en cuatro grados según la escala de Vignos descrita anteriormente: asintomático (grado 0–1), leve (grado 2–4), moderado (grado 5–6) y severo (grado ≥ 7).

La afectación cardíaca se definió según los criterios de las guías internacionales (Ponikowski *et al.*, 2016) y evaluado por el correspondiente cardiólogo. Se tuvieron en cuenta los datos obtenidos mediante ecocardiografía considerando los límites que se describen a continuación: presencia de una fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) <55%; volumen telediastólico del ventrículo izquierdo (VTDVI) $>54 \pm 10$ ml/m² (indexado por superficie corporal) / $> 105 \pm 20$ ml (no indexado); el diámetro teliadiastólico del ventrículo izquierdo/derecho (DTDVI/D) >54 mm. También se tuvieron en cuenta datos obtenidos del electrocardiograma, como fibrilaciones o bloqueos.

La disfunción respiratoria se estableció cuando la capacidad vital forzada (CVF) < 60% o era necesario el uso de un ventilador para tratar casos de insuficiencia pulmonar restrictiva.

1.2. Caracterización genética

1.2.1. Secuenciación masiva mediante panel de genes dirigido

Uno de nuestros objetivos era determinar los puntos de rotura en los intrónicos en sujetos con la delección de los exones 45–55 en *DMD*. Para ello, diseñamos un panel de genes dirigido para la secuenciación masiva de todos los exones del gen *DMD*, además de los intrones 44 y 55 al completo. El diseño también incluía los modificadores genéticos de la severidad de *DMD* *SPP1*, *LTBP4* y *ACTN3* (Bello and Pegoraro, 2019); así como 268 genes involucrados en otras miopatías, obtenidos de la actualización de 2018 de la guía de genes relacionados con enfermedades neuromusculares (Bonne *et al.*, 2017). Las sondas fueron diseñadas para hibridar contra todos los exones además de 25pb de las secuencias intrónicas flanqueantes. El diseño del panel fue generado utilizando el programa Agilent SureDesign (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA). En total generamos un panel de 272 genes, compuesto por 357 zonas de interés divididas en 6.033 regiones, con un tamaño de 2.683 Mpb. La cobertura teórica fue del 99,92%.

El ADN de los sujetos índice analizados mediante el panel se extrajo a partir de sangre de los pacientes utilizando el kit Maxwell 16 Blood DNA purification (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos; AS1520) utilizando el instrumento Maxwell RSC (Promega, AS4500). Además, se utilizaron muestras almacenadas en el laboratorio Patología Neuromuscular del IIS La Fe así como del Departamento de Genética del Hospital Sant Pau de Barcelona.

El ADN de los sujetos índice se utilizó para la preparación de las librerías y su secuenciación. Este proceso fue realizado por la Unidad de Genómica y Genética Traslacional del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia. Brevemente, las librerías fueron preparadas de acuerdo con el protocolo de SureSelect^{QXT} Target Enrichment Multiplexed Sequencing protocol (Agilent Technologies, Santa Clara, California, Estados Unidos; versión E0, Abril 2018). Las librerías fueron secuenciadas en un secuenciador Miseq (Illumina Inc, San Diego, California, Estados Unidos), utilizando el Miseq Reagent kit v3, 150-cycle (Illumina, MS-102-3001). Los archivos FastQ, BAM y VCF fueron obtenidos mediante los programas Miseq Reporter 2.6.2.3 e Illumina RTA 1.18.54 (Illumina Inc.). Las lecturas generadas fueron mapeadas contra el genoma humano de referencia (GRCh37/hg19). El análisis se realizó utilizando los programas Alissa Interpret versión 5.2.6 y SureCall versión 4.2.0.18 (Agilent Technologies). Se tomaron en consideración las variantes ya descritas entre los genes analizados.

1.2.2. Identificación de los puntos de rotura intrónicos

A partir de la localización de los puntos de rotura en los intrones 44 y 55 determinados por el análisis mediante secuenciación masiva, diseñamos parejas de *primers* para amplificar unos 500 pb alrededor de la zona de unión del neo-intrón 44–55. También se diseñaron *primers* para detectar los lncRNAs localizados en estos intrones (lncRNA44s, 44s2, 55s y 55as) en base a su posición cromosómica ya conocida y a los puntos de rotura intrónicos (Bovolenta *et al.*, 2012). Las amplificaciones se llevaron a cabo mediante la PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos; K0171). Las secuencias de los *primers*, pueden encontrarse en **Tabla A1, Anexo I**. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1% y fueron purificados mediante el reactivo ExoSAP-ITTM (Thermo Fisher, 78201) siguiendo el protocolo comercial. Posteriormente, se realizó la secuenciación Sanger en la empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal), enviando 10 µl de producto de PCR purificado junto con 3 µl del *primer* correspondiente (a una concentración de 10 µM). Los cromatogramas obtenidos tras la secuenciación visualizados y analizados mediante el programa SnapGene Viewer versión 4.3.6.

1.2.3. Caracterización de las secuencias intrónicas

Para la caracterización de las secuencias intrónicas tuvimos en cuenta 500 pb tanto aguas arriba como aguas abajo de cada uno de los distintos puntos de rotura en

los intrones 44 y 55. Se procedió a la búsqueda de elementos repetitivos mediante el programa RepeatMasker (Smit *et al.*, 2015) y de palíndromos utilizando el programa Palindrome ('EMBOSS: palindrome', n.d.). Las secuencias de referencia de las regiones delecionadas se obtuvieron utilizando UCSC Genome Browser (Kent *et al.*, 2002).

Utilizamos el programa Human Splicing Finder V.3.1 (HSF) (Desmet *et al.*, 2009) para analizar por un lado elementos reguladores de *splicing*, incluyendo ESE y ESS (del inglés *exonic splicing enhancer/silencer*) en una región de 1 kb alrededor de la zona de unión del neo-intrón 44–55.

Por otro lado, también buscamos secuencias aceptoras y dadoras de *splicing* en la zona del neo-intrón para predecir la posible activación de pseudoexones. Para ello se tuvieron en cuenta las secuencias con alta puntuación que aparecían en dos predictores (HSF y MaxEnt); las secuencias aceptoras debían encontrarse en la zona correspondiente al intrón 44 y las dadoras al intrón 55; y el tamaño del potencial pseudoexón resultante no debía ser mayor de 500 pb (idealmente cercano a 250 pb). Los criterios utilizados, fueron previamente descritos (Liquori *et al.*, 2016).

Para estos dos análisis se utilizaron las secuencias secuenciadas de los pacientes índice, en lugar de las de referencia, para tener en cuenta las variantes que éstos presentaban en la zona de interés.

1.2.4. Estudio de efectos fundadores mediante el análisis de haplotipos

El análisis de haplotipos se realizó en los pacientes índice que compartían los mismos puntos de rotura intrónicos. A partir de las lecturas del panel de genes alineadas con el genoma de referencia (comentado previamente), se obtuvieron las variantes utilizando la herramienta bioinformática GATK HaplotypeCaller (Poplin *et al.*, 2017), siguiendo el protocolo del Broad Institute (MIT-Harvard; Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos). Se obtuvieron todos los SNPs presentes en la región secuenciada del gen *DMD* y las variantes se anotaron utilizando Genome Aggregation Database (gnomAD; Broad Institute). Para el análisis solamente se tuvieron en cuenta las variantes con una frecuencia alélica $\geq 0,3$ and $< 0,5$ (frecuencias alélicas en la población europea no finlandesa). Para la construcción del haplotipo de cada grupo, se tuvieron en cuenta tanto los SNPs (v) como la secuencia de referencia (r) y se representaron en un gráfico solamente la forma más predominante (v o r) para cada posición.

2. ANÁLISIS DE FACTORES MODIFICADORES DEL FENOTIPO

2.1. Estudio de expresión de distrofina en biopsias musculares

Para los análisis de expresión de distrofina utilizamos 9 biopsias de músculo esquelético de pacientes con la del45–55 (varones), además de una muestra de un control sano y una de un sujeto con DMD. Todas las biopsias se realizaron bajo el previo consentimiento de los pacientes, con fines diagnósticos y en el marco del proyecto de investigación aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Investigación Sanitaria y el Hospital La Fe de Valencia (código **2018/0200, Anexo I**). Las biopsias se almacenaron debidamente en nitrógeno líquido en la colección del Laboratorio de Patología Neuromuscular del Hospital La Fe de Valencia. Los detalles de los sujetos estudiados se recogen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Información de las biopsias musculares utilizadas en este trabajo

Código Paciente	Mutación ^a	Músculo	Edad
Control	-	Tibial anterior	38
P1	del45–55-D1	Tibial anterior	31
P2	del45–55-D1	Tibial anterior	26
P4,2	del45–55-D1	Tibial anterior	61
P7	del45–55-D1	Tibial anterior	23
P8,1	del45–55-D1	Tibial anterior	63
P9	del45–55-D1	Tibial anterior	14
P17	del45–55-D4	Tibial anterior	33
P18	del45–55-D5	Tibial anterior	37
P22,1	del45–55-D9	Deltoides	52
DMD	del52	Bíceps	11

(a) Mutación que presentan los distintos pacientes. En el caso de la del45–55 se indica el subgrupo, indicado como -D1,4,5 y 9.

A continuación, se describen los métodos realizados con estas biopsias.

2.1.1. Estudios sobre el ARN de biopsias musculares

2.1.1.1. *Extracción RNA de biopsias musculares.*

Utilizamos unos 50 mg de cada biopsia congelada, a los que se le añadió 700 µl de QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Hilden, Alemania; 1023537) y se homogenizó mediante una bola de acero en el aparato TissueLyser II (Qiagen, 85300) durante 4 minutos a 30 Hz en frío. Posteriormente, añadimos 140 µl de cloroformo a cada homogenado y mezclamos durante 15 segundos. Tras dejar la mezcla a temperatura ambiente durante 3 minutos, se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4 °C y se transfirieron 350 µl de la fase acuosa originada a un nuevo tubo. A continuación, añadimos 525 µl de etanol 100% a cada muestra y se procedió a la purificación del ARN utilizando el kit de extracción miRNeasy mini kit (Qiagen, 217004), siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración de ARN de cada muestra se cuantificó mediante el instrumento Nanodrop 2000 (Thermo Fisher).

2.1.1.2. *Retrotranscripción*

La retrotranscripción del ARN extraído de las biopsias musculares se realizó utilizando el kit SuperScript IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher, 18091050).

En un primer lugar se digirió el ADN genómico de las muestras de ARN extraídas. Para ello, incubamos 750 ng de ARN total de cada muestra con la enzima DNAsa I (ezDNase™, Thermo Fisher), durante 2 minutos a 37 °C. Posteriormente, la enzima fue inactivada añadiendo 10 mM de DTT e incubando durante 5 minutos a 55 °C y las muestras se colocaron en frío. A continuación, la síntesis de ADNc se realizó añadiendo a las muestras previamente digeridas hexámeros y dNTPs e incubando a 65 °C durante 5 minutos. Los tubos se incubaron en hielo y se les añadió DTT, inhibidor de ribonucleasas, la enzima retrotranscriptasa Superscript IV y el tampón de esta, según las condiciones del fabricante, obteniendo un volumen final de reacción de 20 µl. La mezcla de reacción se incubó 23 °C 10 minutos, 55 °C 10 minutos y 80 °C 10 minutos. Para eliminar los restos de ARN cada muestra se incubó con la enzima RNase H y se incubó a 37 °C durante 20 minutos. Las muestras de ADNc sintetizado se guardaron a -20 °C hasta su utilización y el ARN sobrante a -80 °C.

2.1.1.3. RT-PCR anidada

Para la RT-PCR anidada (del inglés, *reverse transcription PCR*) utilizamos 2 μ l del ADNc sintetizado de cada muestra como molde para amplificar la región cercana a los exones 44 y 56. Realizamos una primera amplificación (PCR1) utilizando una pareja de *primers* que hibridaban en los exones 41 (E41D) y 60 (E60R). Esta amplificación se realizó con la polimerasa Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher, F530L) siguiendo las indicaciones del fabricante, pero utilizando 15 segundos en el paso de hibridación (64 °C) y 20 segundos en el paso de elongación (72 °C) durante 15 ciclos. El producto de esta PCR1 fue purificado mediante el reactivo ExoSAP-IT™ y 2 μ l de esta reacción fue utilizado como molde para la PCR2 con la misma polimerasa, pero con dos parejas de *primers* distintas, hibridando en los exones (1) 43 (E43D) + 59 (E59R) y (2) 44–58 (E44–58D) + 59 (E59R). Para esta amplificación se utilizaron 10 segundos tanto en el paso de hibridación como en el de elongación durante 30 ciclos. Los productos de la PCR2 fueron visualizados en un gel de agarosa al 0,8% y los distintos fragmentos se purificaron recortando el gel y utilizando el kit comercial E.Z.N.A. Gel Extraction kit (OMEGA Bio-tek Inc, Norcross, Georgia, Estados Unidos, D2500-02). Una vez purificados, fueron validados mediante secuenciación Sanger como ya se ha descrito previamente. Las secuencias de los *primers* pueden encontrarse en **Tabla A2, Anexo II**.

2.1.1.4. PCR digital

Se puso a punto la técnica de la PCR digital (ddPCR, del inglés *droplet digital PCR*) para cuantificar los niveles de dos transcritos del gen DMD: transcrito con la del45–55 y otro con la del45–57. La ventaja de esta técnica frente a la PCR a tiempo real convencional es que ofrece una mayor sensibilidad, precisión y principalmente una cuantificación absoluta puesto que no está influenciada por la eficiencia de amplificación. Utilizamos dos ensayos de ddPCR conjuntamente en cada reacción, con sondas diseñadas para hibridar específicamente en la unión de los exones de *DMD* 44–56 (marcada con el fluoróforo FAM) y otra que hibrida en la unión de los exones 44–58 (marcada con el fluoróforo HEX). Las secuencias de los *primers* y las sondas que componen estos ensayos pueden encontrarse en **Tabla A2, Anexo II**.

La ddPCR se llevó a cabo en el QX200 Droplet Digital PCR system (Bio-Rad, Hercules, California, Estados Unidos; 1864001) y el flujo de trabajo puede observarse ilustrativamente en la Figura 9. Para la reacción se utilizaron 4 μ l de ADNc en 22 μ l de reacción final que contenía: 1 μ l de cada uno de los dos ensayos diseñados, 11 μ l del

tampón ddPCR Supermix for Probes (no dUTP) (Bio-Rad, 1863023) y 5 µl de agua libre de Dnasa/Rnasa. A continuación, se cargaron 20 µl de la mezcla anterior además de 70 µl de Droplet generator oil for probes (Bio-Rad, 1863005) en pocillos adyacentes del cartucho 8-channel droplet generator cartridge (Bio-Rad, 1864008) que se introdujo en el QX200 droplet generator (Bio-Rad, 1864002) para generar la partición de la muestra en miles de nanogotas. Posteriormente, 40 µl de la emulsión generada se introducen en una placa de PCR de 96 pocillos (Bio-Rad, 12001925) que se selló y se introdujo en el termociclador C1000 Touch (Bio-Rad, 1851197) utilizando las siguientes condiciones: 95 °C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C 15 segundos, 56,8 °C durante 1 minuto y 98 °C 10 minutos.

La placa que contenía las gotas donde se había producido la amplificación se cargó en el lector QX200 droplet reader (Bio-Rad, 1864003) que cuantifica el número de gotas positivas y negativas para cada fluoróforo en cada pocillo. Los datos se analizaron con el programa QuantaSoft Analysis Pro (Bio-Rad) y se aplicó un umbral (de forma manual) de amplitud de fluorescencia para discriminar entre las gotas positivas y negativas por muestra. Se determinó la concentración (copias/µl) de cada transcrito y se utilizó para calcular el porcentaje del transcrito del 45–57 en cada muestra: $[\text{copias}/\mu\text{l } 44\text{--}58 / (\text{copias}/\mu\text{l } 44\text{--}58 + \text{copias}/\mu\text{l } 44\text{--}56) * 100]$ (Verheul *et al.*, 2016).

Por cada muestra se realizaron tres replicados técnicos además de un control negativo (sin ADNc). En todas las muestras (y sus respectivos replicados) se generaron más de 10.000 gotas válidas, que es el límite para considerar que un experimento de ddPCR se ha producido satisfactoriamente.



Figura 9. Ilustración esquemática del flujo de trabajo en la PCR digital. (1) Preparación de un mix que contiene el ADNc molde, los *primers* y la sonda (o sondas), así como el tampón que contiene los dNTPs. (2) Este mix se carga en el cartucho junto con el aceite y se introduce en el QX200 droplet generator para emulsionar y dividir la muestra en miles de nanogotas de tamaño y volumen uniforme. (3) Posteriormente se transfiere la emulsión a una placa de PCR de 96 pocillos y se procede a la amplificación individual de la muestra en cada una de las gotas, bajo las mismas condiciones. (4) Tras la amplificación, la placa se coloca en el lector QX200 droplet reader que analiza cada gota individualmente. Los resultados se analizan con el programa QuantaSoft Anlysis Pro. Imagen adaptada de (Lambrescu *et al.*, 2022).

2.1.2. Estudios de expresión de proteína en las biopsias musculares

2.1.2.1. *Inmunofluorescencia*

Realizamos criocortes transversales de 7 μm de las 11 musculares descritas en la **Tabla 1. Información de las biopsias musculares utilizadas en este trabajo** y los atemperamos sobre una bayeta húmeda durante 15 minutos. Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente. Posteriormente fueron incubados con el tampón de bloqueo (1% BSA en PBS 1X) durante 30 minutos y a continuación con los anticuerpos primarios durante 1 hora y 30 minutos (diluidos en tampón de bloqueo) para detectar las proteínas distrofina y laminina (marcador que sirve para localizar el sarcolema) sobre la misma muestra: anticuerpo monoclonal anti-distrofina hecho en ratón (1:50, NCL-Dys2; Leica Biosystems, Newcastle, Reino Unido) y anticuerpo monoclonal anti-laminina hecho en rata (1:500, Laminin- α 2 L0663; Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos). Seguidamente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con el tampón de bloqueo y se incubó durante 1 hora con los anticuerpos secundarios: Alexa Fluor594 goat anti-

mouse IgG (H+L) y Alexa Fluor488 goat anti-rat IgG (H+L) (1:200; Thermo Fisher; A-11032 y A-11006 respectivamente). Los cortes se lavaron tres veces con PBS 1X durante 10 minutos y se montaron con el reactivo VECTASHIELD antifade mounting medium (Vector Laboratories, Newark, California, Estados Unidos; H-1000-10). Las secciones se visualizaron en el microscopio confocal LSM800 (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y se adquirieron imágenes de 16-bits con una magnificación de 200X.

2.1.2.2. *Extracción y cuantificación de proteínas de las biopsias musculares*

La extracción de proteína de las biopsias musculares se realizó también mediante el aparato Tissulyser II (Qiagen), con las mismas condiciones descritas anteriormente para la extracción de ARN, pero utilizando en este caso 500 µl/muestra de tampón de lisis (4,4 mM Tris-HCl pH:6,8; 9% SDS; 4% Glicerol; 5% β-mercaptoeanol). Una vez las muestras fueron lisadas, se centrifugaron a 16.000 g durante 15 minutos a 12 °C, se recogió el sobrenadante y se guardaron a -20 °C.

Para la determinación de la concentración de proteína de cada muestra se utilizó el kit comercial Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher; 23227) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.1.2.3. *Western blot*

La cuantificación de distrofina se realizó mediante *western blot* siguiendo el protocolo estandarizado aplicado para evaluar el efecto de las terapias con AON en los ensayos clínicos (Anthony *et al.*, 2014b). Se desnaturalizaron 30 µg de cada muestra en presencia del tampón de carga NuPAGE LDS 4X (Thermo Fisher, NP0007) durante 10 minutos a 90 °C. Posteriormente las muestras se cargaron en los geles de electroforesis NuPAGE Tris-Acetato 3–8% (Thermo Fisher, EA03752BOX) durante 5 horas a 100 V en hielo en presencia del tampón de electroforesis NuPAGE Tris-Acetato SDS Running Buffer y de antioxidante (Thermo Fisher; LA0041, NP0005). La transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa (Thermo Fisher, 88014) se realizó en presencia de tampón de transferencia NuPAGE (Thermo Fisher, NP0006) durante 18 horas a 20 V a 4 °C. Una vez acabada la transferencia, las membranas se bloquearon con TBST (15 mM Tris-HCl; 4,6 mM Tris base; 150,6 mM NaCl; 0,1% Tween 20) durante 1 hora y 30 minutos. A continuación, se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios (diluidos en tampón de bloqueo) a 4 °C durante toda la noche: anticuerpo monoclonal anti-distrofina (1:40, NCL-Dys1; Leica Biosystems) y anticuerpo monoclonal anti-α-actinina (1:3000, Sigma-Aldrich; A7732). Tras la incubación de las membranas

con los anticuerpos primarios, realizamos 3 lavados de 10 minutos con TBST e incubamos 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano en oscuridad: sheep anti-mouse IgG (H&L) HRP (1:2000, ab6808; Abcam, Cambridge, Reino Unido). Después, realizamos 3 lavados de 10 minutos con TBST y revelamos las membranas por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL Supersignal West Pico Plus (Thermo Fisher, 34579) mediante adquisidor de imágenes Amershand Imager 600 (GE healthcare, Chicago, Illinois, Estados Unidos). Las bandas obtenidas se cuantificaron con el programa ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, Estados Unidos). La intensidad de las bandas correspondientes a la distrofina fue normalizada con las de su respectiva α -actinina y se representaron como el porcentaje relativo a la señal de un control sano. Se llevaron a cabo tres replicados técnicos por cada muestra.

2.2. Análisis de factores modificadores en *trans*

Para el análisis exploratorio de los modificadores genéticos de DMD, los SNPs de los 23 casos índice se evaluaron con el panel de genes y mediante secuenciación Sanger 10 casos secundarios. El criterio utilizado en los SNPs evaluados fue (Bello and Pegoraro, 2019):

- La presencia la variante de riesgo G en el gen *SPP1* (rs28357094).
- La presencia del haplotipo beneficioso IAAM/IAAM en el gen *LTBP4*, compuesto por los 4 SNPs: rs2303729; rs1131620; rs1051303 y rs10880.
- El rs28357094 en el gen *ACTN3*, considerando dos modelos: 1) la presencia del cambio (R577X), ya sea en homocigosis o en heterocigosis se consideró de riesgo; 2) la presencia en heterocigosis se consideró intermedio.

Además, se llevó a cabo el análisis de los modificadores en 10 pacientes secundarios mediante secuenciación Sanger

Por otro lado, también se anotaron la presencia de mutaciones concurrentes en alguno de los genes analizados en el panel de genes utilizado.

2.3. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el soporte de la Unidad de Bioestadística y Bioinformática del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia.

Se realizaron test no paramétricos (Kruskal-Wallis) para comparar las variables continuas de los distintos grupos (p -valor $<0,005$). Se aplicó un modelo de regresión ordinal bayesiano para evaluar el efecto de los distintos grupos de deleciones, los distintos perfiles de preservación de los lncRNA y los modificadore genéticos de DMD sobre los distintos grados de severidad muscular. Análisis de regresión logística bayesiana para evaluar el efecto de las variables dicotómicas (afectación cardiaca). La deleción 1 se utilizó como referencia además del grupo que preservaba los 4 lncRNAs. La edad se consideró como factor de confusión en todos los modelos, y los grupos de deleciones y lncRNA que contenía un único sujeto fueron excluidos del análisis (grupos D6 y D8). Se consideró un efecto significativo cuando los intervalos de credibilidad (IC) 95% no incluían el 1, cuya potencia depende del valor del *odd ratio* (OR). Todos los análisis estadísticos se realizaron el software R (versión 3.5.3), el paquete de R brms (versión 2.8.0) y Crick (versión 0.4.32).

3. APROXIMACIÓN AL MODELO CELULAR

3.1. Cultivos celulares

Todos los procesos de cultivos celulares se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad y las líneas se cultivaron en un incubador a 37 °C y 5% de CO₂.

3.1.1. Línea celular HEK293

Las células HEK293 (del inglés *Human Embryonic Kidney 293*) se cultivaron a 37 °C y 5% de CO₂ con un medio compuesto por DMEM (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) 4,5 g/L de glucosa (Gibco, Thermo Fisher; 11960044) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco, Thermo Fisher; 11573397) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco, Thermo Fisher; 15070063).

3.1.2. Obtención de cultivo de mioblastos primarios humanos

Se obtuvieron mioblastos primarios a partir de la biopsia de músculo esquelético del paciente P1 con la del45–55, del grupo de deleción D1 (del45–55-P1) (**Tabla 1**). Tras la realización de la biopsia muscular, se separó un parte sin congelar para este proceso como se detalla a continuación (de Luna *et al.*, 2006).

Transferimos la biopsia muscular a una placa estéril con DMEM y retiramos los restos de sangre y grasa; la cortamos mediante un bisturí en piezas de aproximadamente 3 mm que transferimos a una nueva placa de 35 mm² y los incubamos durante la noche en el incubador con medio de acondicionamiento compuesto por: Medio 199 (Gibo, Thermo Fisher; 11150059) suplementado con 37,5% de suero bovino fetal, Ciprofloxacina + Anfotericina B (1:1000, Sigma-Aldrich; 1785, A2942 respectivamente). A continuación, introducimos las piezas de músculo espaciadas en una nueva placa Petri de 35 mm² con un medio compuesto por el medio de acondicionamiento preparado anteriormente suplementado con 20% de plasma humano (Siemens Healthcare, Marburg, Alemania; ORKL17). Este medio gelifica y las piezas se quedan embebidas en él, y las incubaremos durante 8 días permitiendo así el crecimiento de fibroblastos del músculo. Tras este periodo, retiramos las piezas de músculo del medio semisólido y las ponemos en una nueva placa con DMEM donde las cortaremos en piezas de aproximadamente 1 mm. Estas piezas, a las que a partir de ahora las llamaremos explantes, se colocan espaciados en una nueva placa Petri de 35 mm² recubierta con gelatina 1,5% (Sigma-Aldrich, G9136) suplementada con 30% de plasma humano y una vez adheridos se añaden 2 ml del medio específico de mioblastos

Skeletal Muscle Cell Growth Medium (SMC; Pelo-Biotech, Planegg, Alemania; PB-MH-272-0000). Los explantes se cultivan en el incubador durante 5-7 días, favoreciendo el crecimiento de los mioblastos a partir de ellos. Una vez crecidos los mioblastos se van amplificando en *flask* de mayor tamaño (tratados con gelatina 0,1%) y los explantes se van traspasando a nuevas placas Petri, repitiendo el proceso anterior para obtener un mayor número de mioblastos.

A pesar de que durante los pasos comentados previamente se favorece el crecimiento de mioblastos de los explantes, es habitual que en el cultivo haya contaminación de fibroblastos, puesto que proliferan a mayor ritmo que los mioblastos. Para obtener un cultivo de mioblastos primarios purificado, realizamos una selección de éstos utilizando el marcador de superficie específico de este tipo celular CD56 (De Luna *et al.*, 2006). Este proceso se llevó a cabo utilizando sistema de separación magnética por columnas MACS (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) siguiendo las especificaciones del fabricante y como describimos a continuación. Una vez expandidas las células primarias (con un máximo de 10^7) se resuspenden en el tampón de separación frío (PBS; 0,5% BSA; 2 mM EDTA) y se pasan por un filtro de 30 μm (Milteny Biotec; 130-041-407) para individualizar las células y evitar agregados. Tras esto, incubamos el *pellet* celular con 20 μl del anticuerpo anti-CD56 conjugado con MicroBeads magnéticas (Milteny Biotec, 130-050-401), durante 15 minutos a 4–8 °C. A continuación, lavamos la muestra con 400 μl de tampón de separación, para eliminar el exceso de anticuerpo, resuspendemos el *pellet* en 500 μl de tampón e introducimos la muestra en las columnas MS (Milteny Biotec, 130-042-201) que colocamos en el separador MiniMACS (Milteny Biotec, 130-042-102). Éste es un potente imán que genera un fuerte campo electromagnético en el interior de las columnas, reteniendo las células que tienen adheridas las MicroBeads (CD56+). La fracción de células CD56- (fibroblastos) pasan por la columna sin oposición y pueden recogerse para su almacenamiento. Finalmente, eluimos las células retenidas en la columna, obteniendo la fracción celular CD56+, es decir, los mioblastos primarios purificados que amplificamos utilizando medio SMC. El esquema de este proceso puede observarse en la **Figura 10**.

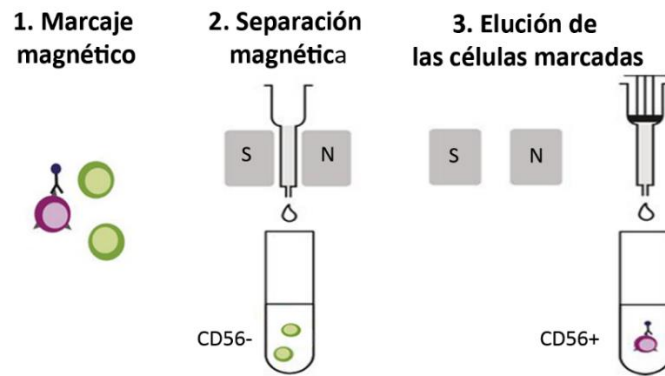


Figura 10. Principio de selección celular con el sistema MACS. (1) Las células de interés (mioblastos) se marcan con un anticuerpo que reconoce el marcador específico de este linaje (CD56) y que tiene conjugado las MicroBeads magnéticas. **(2)** A continuación se pasa la solución por la columna MS sobre el separador que genera el campo magnético y las células CD56- pasan a través de ella. **(3)** Por último, las células CD56+ retenidas en la columna se eluyen, obteniendo así el cultivo de mioblastos purificado. S y N hacen referencia a los polos Sur y Norte del imán del separador, respectivamente.

3.1.3. Inmortalización de los mioblastos primarios

Los mioblastos primarios del45–55-P1 purificados previamente, fueron inmortalizados en colaboración con el *Instute de Myologie* (París, Francia), con el fin de aumentar su capacidad proliferativa, incrementando así los estudios que pueden llevarse a cabo con ellas (Mamchaoui *et al.*, 2011). Para ello, los mioblastos primarios fueron transducidos con lentivirus que expresaban los transgenes *hTERT* (del inglés, *human telomerase reverse transcriptase*) y *CDK4* (del inglés, *cyclin-dependent kinase*); evitando así la entrada en senescencia de las células. Se utilizó una multiplicidad de infección (MOI) de 5 (que define el ratio del número de partículas de lentivirus respecto al número de células), en presencia de 4 µg/ml de polibreno (Sigma-Aldrich, TR-1003). Las células transducidas se seleccionaron con 0,2 µg/ml de puomicina (Gibco, Thermo Fisher; A1113802) durante 4 días y con 0,3 µg/ml de neomicina (Gibco, Thermo Fisher; 21810031) durante 10 días. Posteriormente las células se sembraron en densidad clonal y los clones seleccionados se aislaron de cada población utilizando cilindros de vidrio.

3.1.4. Líneas de mioblastos inmortalizados

Además de la línea de mioblastos del paciente del45–55-P1 previamente inmortalizados también utilizamos 3 líneas adicionales de controles sanos y una línea de un paciente DMD (con delección del exón 52) (**Tabla 2**). Todas estas líneas de mioblastos inmortalizados fueron cedidas por el biobanco del *Instute de Myologie* (París, Francia).

Las líneas se cultivaron en el medio de proliferación SMC en el incubador y cuando estaban confluentes se sembraron en distintas placas (según el objetivo) previamente tratadas con matrigel 1% en DMEM (Corning, Madrid, España; 45356231). Al día siguiente se cambió el medio por medio de diferenciación (DM) compuesto por DMEM suplementado con 2% de suero de caballo (Gibco, Thermo Fisher; 26050-070) y 1% de Penicilina/Estreptomicina. Los cultivos se mantuvieron en el incubador durante 7 días en DM (refrescándolo cada 2 días) para favorecer la formación de miotubos.

El conteo de las células se realizó con el contador automático EVE™ Automated Cell Counter (NanoEntek, Seoul, Corea) introduciendo las cámaras EVE™ Cell counting slides (NanoEntek; 7342676) que contienen la suspensión celular mezclada con Tripan-Blue 1:1.

Tabla 2. Líneas de mioblastos inmortalizados utilizados

Código células	Mutación	Músculo	Edad
AB1079 (Control 1)	-	Cuádriceps	38
AB1190 (Control 2)	-	Paravertebral	16
AB678 (Control 3)	-	Cuádriceps	53
Paciente P1*	del45–55-D1	Tibial anterior	31
KM1328 (DMD)	del52	Paravertebral	16
Clon editado**	del45–55-D1	Paravertebral	16

*Se inmortalizaron a partir de los mioblastos primarios purificados de explantes de biopsia.

**Clon obtenido tras la introducción de del45–55-D1 mediante CRISPR-Cas9 en la línea DMD.

Delección (del).

3.1.5. Almacenamiento y congelación-descongelación de células y explantes

Las células y los explantes se almacenaron congeladas en un tanque de nitrógeno líquido del laboratorio de Patología Neuromuscular y Ataxias del IIS La Fe. Para ello introducimos por cada criovial aproximadamente 10^6 mioblastos o 5 explantes resuspendidos en 1 ml de medio de congelación (suero bovino fetal con 10% de DMSO). Estos se introdujeron en un contenedor de congelación (Thermo Fisher, 5100-0001) con isopropanol y se almacenaron en un congelador de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al día siguiente se almacenaron en el tanque de nitrógeno líquido.

Para la descongelación, sacamos el criovial del tanque de nitrógeno líquido, lo descongelamos en el baño a 37 °C y añadimos al criovial 2 ml de DMEM. Centrifugamos, eliminamos el sobrenadante, resuspendemos el *pellet* en medio SMC y sembramos las células en un *flask* de 75 cm² que introducimos en el incubador. En el caso de los explantes los introducimos en una placa Petri de 35 cm² y continuamos con el proceso descrito anteriormente.

3.2. Sistema de edición génica CRISPR-Cas9

3.2.1. Diseño de los gRNA

Para reproducir la del45–55 del subgrupo D1 (del45–55-D1), diseñamos gRNAs cercanos a sus puntos de rotura en el intrón 44 y 55 (ChrX:32056814 y ChrX:31599476 respectivamente, de acuerdo con la secuencia de referencia del genoma humano Hg19). Utilizamos varias herramientas bioinformáticas para el diseño de los gRNAs (ya que cada una utiliza distintos algoritmos para el cálculo de la eficiencia y los potenciales sitios *off-targets*): (Park *et al.*, 2015), CHOPCHOP (Labun *et al.*, 2016) y Breaking-Cas (Oliveros *et al.*, 2016). Elegimos un total de 4 gRNAs (2 por cada punto de rotura) comunes a los 3 predictores. Las secuencias de las 4 gRNAs pueden observarse en la **Tabla A3, Anexo II**.

3.2.2. Generación de un vector de expresión del sistema CRISPR-Cas9

Los 4 gRNA diseñados se clonaron independientemente en el vector pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (Addgene, Watertown, Massachusetts, Estados Unidos; #48138) del laboratorio de Feng Zhang (Ran *et al.*, 2013). Este plásmido contiene el gen de la nucleasa Cas9 de *Streptococcus piogenes*, el sitio de clonación para el gRNA y el gen que codifica para la proteína verde fluorescente GFP (del inglés, *green fluorescent protein*) además del gen de resistencia a la ampicilina. La secuencia de la Cas9 se encuentra flanqueada por secuencia de localización nuclear (NLS, del inglés *nuclear localization signal*), para favorecer su transporte al núcleo una vez sintetizada (**Figura 11A**).

Para la clonación de los gRNAs en el vector PX458, sintetizamos la secuencia de cada gRNA como *primers* antiparalelos, incluyendo la secuencia 5'-CACC-3' en el extremo 5' del *primer* directo y la secuencia 5'-AAAC-3' en el extremo 5' del *primer* reverso, necesarios para generar los extremos cohesivos para la enzima de restricción

BbsI (Thermo Fisher; ER1011). Ambos *primers* antiparalelos se hibridan para formar un dúplex de doble cadena añadiendo 4,5 μ L (a 100 μ M) de cada uno de ellos junto con 1 μ L de tampón dúplex (acetato potásico 1 M y HEPES 300 mM; pH 7,5). La hibridación la realizamos mediante una rampa de temperatura desde 95°C a 25°C a razón de 1 °C por minuto.

Por otro lado, digerimos 1 μ g del vector PX458 con la enzima de restricción BbsI, siguiendo las instrucciones del proveedor, generando extremos cohesivos complementarios a las secuencias añadidas en los extremos 5' de los *primers* del gRNA. A continuación, realizamos la ligación del dúplex gRNA en el vector (3 ng de dúplex y 150 ng de vector linealizado), utilizando la ADN ligasa T4 y siguiendo las especificaciones del fabricante (Thermo Fisher; EL0014). Este producto de ligación se utilizó para electroporar bacterias *Escherichia coli* TOP10 (electrocompetentes) utilizando el MicroPulser™ Electroporator (BIO-RAD) que sembramos en placas LB-agar con ampicilina (para seleccionar las bacterias transformadas) durante toda la noche a 37 °C. Tras la incubación realizamos una PCR de las colonias cultivadas, utilizando el *primer* directo específico del gRNA y uno reverso que hibrida con la secuencia del vector, utilizando la PCR Master Mix 2X. Las colonias positivas se amplificaron mediante cultivo LB líquido con ampicilina a 37 °C en agitación durante 16 horas y el plásmido se purificó utilizando el kit comercial HiSpeed Plasmid Midi Kit (QIAGEN; 12643) siguiendo las especificaciones del fabricante. Éste, se secuenció por Sanger para confirmar la correcta incorporación del gRNA.

3.2.3. Pruebas de eficiencia en células HEK293

El testado de la eficiencia de corte de los 4 gRNAs clonados en el vector PX458 se realizó en las células HEK293. Para ello sembramos 5×10^5 células por pocillo de placa de 6 pocillos en su medio correspondiente y se cultivaron en el incubador durante 24 horas. Por cada plásmido, se transfectaron dos condiciones independientes, 1,5 μ g y 3 μ g utilizando el reactivo Lipofectamina 3000 (Invitrogene, Thermo Fisher; L3000001). A las 24 horas tras la transfección se observó en el microscopio de fluorescencia la señal de GFP y a las 48 horas post-transfección se recogen las células y se extrajo el ADN mediante el kit comercial QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN; 51304).

Con el ADN de las células transfectadas procedimos a realizar el ensayo de la enzima Endonucleasa T7 I (T7EI), que cuantifica el porcentaje de indels generados por la acción del NHEJ tras la producción de DSB por la nucleasa Cas9. Para ello amplificamos el ADN utilizando la Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase con una pareja de *primers* donde el directo y el reverso queden a distinta distancia del sitio teórico

de corte de la Cas9. Utilizamos una pareja para evaluar la eficiencia de corte del intrón 44 y otra para el intrón 55 (**Tabla A3, Anexo II**). Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 0,8% y se purificaron con el kit comercial E.Z.N.A. Gel Extraction kit. A continuación, utilizamos 200 ng del ADN purificado para realizar el ensayo de la T7EI siguiendo las especificaciones del proveedor de la enzima (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Estados Unidos; M0302L). Este ensayo se basa en que en que la zona amplificada presenta tanto secuencias sin cambios, como secuencias con distintos indels. El ADN se somete entonces a una rampa de temperaturas que produce la desnaturalización de la doble cadena de ADN y su hibridación de nuevo, pudiéndose formar heterodúplex constituidos de una hebra no modificada y otra con la presencia de un indel. Estos heterodúplex son los que reconoce la enzima T7EI y escinde, produciéndose dos fragmentos de distinto tamaño (menor que el correspondiente a las secuencias no editadas) (**Figura 11B**). Los productos del ensayo se resolvieron en un gel de agarosa al 2% donde se pudo observar los 3 tipos de bandas. Se incluyó una reacción sin introducir la enzima como control negativo.

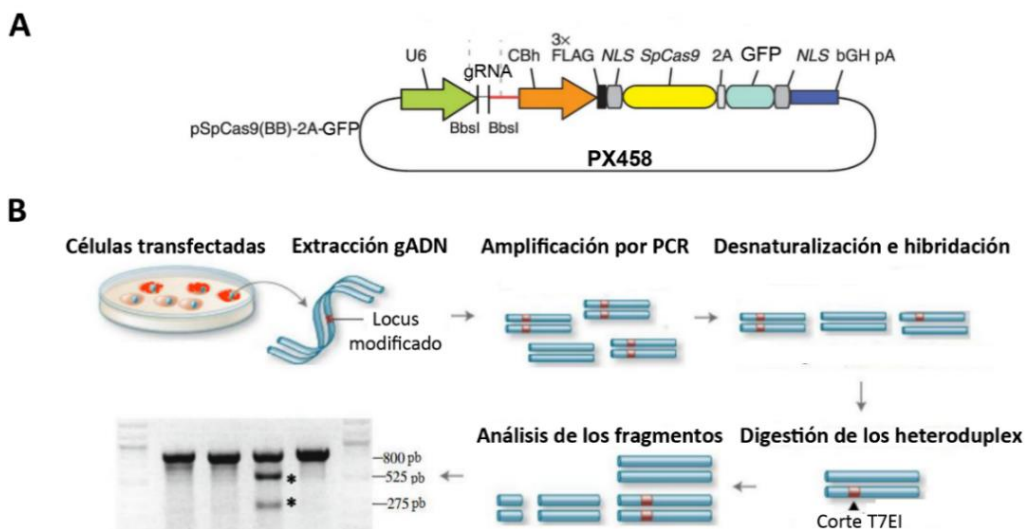


Figura 11. Plásmido PX458 utilizado y ensayo T7EI. (A) Estructura del plásmido PX458 donde se representan sus componentes principales: promotor U6 que controla la expresión del gRNA, clonado utilizando los sitios BbsI; la expresión de la SpCas9 está controlada por el *enhancer* CMV y el promotor de la β -actina (CBh); que también controla la expresión de GFP (las 2 proteínas se traducen independientemente gracias al péptido 2A). Secuencias de localización nuclear (NLS). (B) 48 horas tras la transfección de las células con el plásmido PX458 que contiene el gRNA de interés, se extrae el ADN genómico (gADN) donde algunas células presentarán indels por la acción de la Cas9. Amplificamos la región cercana al sitio de corte y sometemos al ADN a una rampa de temperaturas que produce la desnaturalización de las hebras, y la hibridación aleatoria de éstas, pudiéndose formar heterodúplex (la unión de una hebra modificada con una que no). Esto es lo que detecta y digiere la enzima T7EI, produciendo dos fragmentos de menor tamaño (*) que se analizan en un gel de agarosa. También se detecta una banda de mayor tamaño que corresponde a los productos no escindidos (las carreras con la banda superior corresponden a muestras no transfectadas y muestras no tratadas con la enzima). Imagen adaptada de (A) Addgene y (B) NewEngland Biolabs.

Las densidades de cada una de las 3 bandas se cuantificó con el programa ImageJ y el cálculo de las eficiencias de corte se realizó con la siguiente fórmula (Guschin *et al.*, 2010): $\text{Indel (\%)} = 100 \times (1 - \sqrt{1 - f_{\text{cut}}})$. Donde f_{cut} corresponde a la fracción de los 2 productos digeridos respecto al total (la intensidad de estos junto con la del producto no digerido).

La co-transfección para generar la del45–55-D1 en células HEK293 se realizó introduciendo 1,5 µg de los vectores gRNA_44.1 y gRNA_55.2, como hemos comentado previamente. A las 48 horas después de la transfección se extrajo el ADN y se amplificó utilizando la pareja de *primers* D1 (**Tabla A1, Anexo II**) y se resolvió en un gel de agarosa 1% además de secuenciarse con la técnica Sanger.

3.2.4. Introducción de la del45–55-D1 en mioblastos DMD y obtención de clones editados

Este punto se llevó a cabo como parte de una estancia doctoral en el laboratorio de Enfermedades Neuromusculares del Instituto de Investigación Biocruces Bizkaia, a cabo de la Dra. Virginia Arechavala Gomeza.

Para la generación de clones con la del45–55-D1 sembramos $2,5 \times 10^5$ mioblastos inmortalizados DMD en un pocillo de placa de 6 pocillos. Al día siguiente co-transfectamos con 1,5 µg de cada uno de los vectores gRNA_44.1 y gRNA_55.2 utilizando el reactivo de transfección Viafect (Promega; E4981), con un ratio plásmido:reactivo de 1:5 siguiendo las indicaciones del proveedor. También incluimos un pocillo sin plásmido, pero con el reactivo de transfección que nos serviría como control negativo. A las 24 horas evaluamos la expresión de GFP. A las 48 horas de la transfección resuspendimos las células en tampón *sorting* (HEPES 25 mM, EDTA 5 mM, BSA 1% en PBS) para separar las células GFP+ mediante FACS (del inglés *Fluorescent Activated Cell Sorter*) utilizando el BD FACSJazz™ Cell Sorter (Beckton Dickinson, East Rutherford, Nueva Jersey, Estados Unidos) de la Unidad Analítica Celular de Achucarro Basque Center for Neuroscience (Leioa, España). De esta forma, sembramos las células GFP+ en pocillos de placas de 96, a razón de una única célula por pocillo, con el objetivo de obtener cultivos clonales. Las placas se cultivaron en medio SMC durante semanas (refrescándolo periódicamente) y se fueron amplificando en placas de pocillos de mayor tamaño. Cuando los pocillos llegaban al 90%-100% de confluencia, se levantaron las células, congelando la mitad para su almacenamiento y el resto se utilizó para extraer el ADN (como previamente hemos descrito). Utilizamos el ADN para detectar mediante PCR (con la pareja de *primers* D1) si se había introducido la del45–55-D1, resolviendo

los productos en un gel de agarosa al 1%. Aquellas colonias que resultaron positivas se secuenciaron mediante la técnica de Sanger para confirmar la correcta incorporación de la delección. Además, una de las colonias positivas se amplificó en cultivos para realizar posteriormente distintos experimentos de caracterización.

3.3. Análisis de la eficiencia de corte y de los potenciales *off-targets* mediante secuenciación masiva

Utilizamos el predictor bioinformático Cas-OFFinder (Bae *et al.*, 2014) y Breaking-Cas (Oliveros *et al.*, 2016) para identificar los potenciales sitios *off-targets* asociados a los gRNA_44.1 y gRNA_55.2. Como requisitos, seleccionamos hasta un máximo de 3 *mismatches* (número de nucleótidos que difieren de la secuencia original del gRNA).

El estudio se llevó a cabo con ADN de mioblastos DMD transfectados solamente con el gRNA_44.1, para el análisis del *on-target* del intrón 44; de mioblastos DMD transfectados con el gRNA_55.2, para el *on-target* del intrón 55 y de mioblastos transfectados con ambos gRNAs para el análisis de los *off-targets*. También se empleó ADN de mioblastos DMD sin transfectar, para las mismas regiones como control negativo.

Generamos una librería de amplicones mediante dos tandas de PCR. En la PCR1 utilizamos *primers* específicos a cada región a analizar, a los que les acoplamos una secuencia adaptadora. La reacción de PCR la realizamos con la polimerasa de alta fidelidad Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase en una reacción de 32 ciclos. Los productos de la PCR1 se purificaron utilizando las partículas paramagnéticas Ampure XP (Beckman Coulter, Brea, California, Estados Unidos; A63881) con un ratio 0,8X; sobre un soporte magnético, realizando lavados con etanol 80% y eluyendo en agua libre de nucleasas (Sigma-Aldrich; W4502) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. De esta forma purificamos se purifican los fragmentos de ADN mayores de 100 pb, eliminando los restos de contaminantes (nucleótidos, sales, enzima...).

Para la PCR2, amplificamos los productos de la PCR1 purificados utilizando una pareja de *primers* que contienen una zona complementaria a los adaptadores introducidos en la PCR1 y el resto de la secuencia final del adaptador. Además, el *primer* reverso contiene una secuencia índice que sirve para diferenciar las muestras transfectadas de las que no. La reacción también la realizamos con la polimerasa Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase, utilizando esta vez 10 ciclos. Los productos de PCR2 también fueron purificados con las partículas Ampure XP (ratio 1X).

Finalmente, la librería se generó mezclando las PCR2 purificadas a concentraciones equimolares (4 nM), siguiendo el protocolo comercial. Las secuencias de los *primers* utilizados para este objetivo pueden encontrarse en la **Tabla A4, Anexo II**.

La secuenciación la realizamos cargando las librerías en el cartucho de secuenciación MiSeq Reagent Kit V2 500 cycles (Illumina; MS-102-2003) y la secuenciación se llevó a cabo mediante la plataforma de secuenciación MiSeq (Illumina).

Los archivos FastaQ fueron obtenidos mediante el programa Miseq Reporter 2.6.2.3 y analizados mediante el software CRISPResso2 (Clement *et al.*, 2019). Este programa realiza la cuantificación de los eventos asociados a los mecanismos de reparación celular (NHEJ en nuestro caso) tras la edición génica, alineando las lecturas de la secuenciación con la secuencia de referencia correspondiente. Además, genera diversos gráficos de fácil interpretación mostrando la frecuencia y lugar de las modificaciones (inserciones, deleciones y sustituciones).

Con el fin de analizar los posibles efectos *off-target* se utilizó la herramienta CRISPResso Compare para comparar la zona de interés en las muestras transfectadas y las que no, respecto a la secuencia de referencia; para de esta manera observar si los cambios que se puedan observar en la muestra transfectada se deben por el sistema CRISPR-Cas9 o debido a variantes presente en las muestras no tratadas.

Se extrajo el ADN del clon editado seleccionado para la caracterización fenotípica y se secuenciaron los potenciales sitios *off-target* mediante secuenciación Sanger utilizando las mismas secuencias de *primers* que los utilizados en la PCR1 de la generación de librerías de secuenciación masiva, pero sin los adaptadores (**Tabla A4, Anexo II**).

3.4. Estudios de expresión de distrofina a nivel de ARN

El análisis a nivel de ARN lo llevamos a cabo en las 4 líneas de mioblastos inmortalizados: control 1, DMD, Clon editado y paciente P1. Para esto, se sembraron 10^6 mioblastos de cada línea que se diferenciaron durante 7 días en DM como previamente hemos descrito. Se llevó a cabo un triplicado por cada una de las líneas. Tras esto, se recogieron las muestras de cada línea celular y se guardó a -80°C .

La extracción de ARN se llevó a cabo como hemos descrito previamente en el apartado 2.1.1.1, pero disgregamos el *pellet* celular utilizando el Vortex, en lugar del Tissuelyser II.

La retrotranscripción se realizó utilizando 1000 ng de partida de cada muestra en las mismas condiciones que las anteriormente detalladas.

La RT-PCR anidada se realizó utilizando 2 µl de ADNc de partida, en las mismas condiciones que las detalladas anteriormente en el objetivo 1 y utilizando la pareja de *primers* E41D + E60R para la PCR1 y la pareja E43D + E59R y E43D + E58R para la PCR2 (**Tabla A2, Anexo II**).

La ddPCR para analizar la expresión de distrofina se realizó en las mismas condiciones que las explicadas anteriormente, utilizando en este caso 3 µl de ADNc de partida. En este caso, además de la utilizar el ensayo con la sonda que hibrida en los exones 44–58 (descrito en el apartado 2.1.1.4), utilizamos el ensayo comercial para detección de distrofina dHsaCPE5049433 (BIO-RAD) marcada con el fluoróforo HEX. La sonda de este ensayo hibrida entre los exones 67 y 68 permitiendo de esta forma la cuantificación del transcrito de distrofina en las células control y DMD, que al no tener la del45–55 las sondas utilizadas en el objetivo anterior no hibridarían.

3.5. Estudios de proteína en los miotubos de las líneas celulares

3.5.1. Inmunofluorescencia

Para la inmunodetección de distintas proteínas, sembramos $2,5 \times 10^4$ mioblastos de cada una de las líneas a estudiar, en cubreobjetos de 13 mm (introducidos en pocillos de placas de 24 pocillos) (Sarstedt Inc, Nümbrecht, Alemania; 83.1840.002) y se diferenciaron en miotubos durante 7 días. Tras esto, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 minutos, y se lavó con PBS para eliminar los restos. Los miotubos se permeabilizaron con PBS-T (0,1% TritonX-100 en PBS) y fueron bloqueados con el tampón de bloqueo compuesto por 1% BSA, 1% suero de cabra en PBS-T, durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente incubamos los miotubos con los anticuerpos primarios correspondientes, diluidos en el tampón de bloqueo, durante toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos utilizados fueron:

- **Detección de distrofina:** utilizamos un mix compuesto por 3 anticuerpos monoclonales hechos en ratón: NCL-Dys1 (1:50; Leica Byosystems); MANDYS1 y MANDYS106 (1:50; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, Iowa, Estados Unidos).

- **Detección de la cadena pesada de la miosina (MyHC del inglés *myosin heavy chain*):** utilizamos el anticuerpo monoclonal hecho en ratón MF20 (1:50; Developmental Studies Hybridoma Bank).
- **Detección de desmina:** utilizamos el anticuerpo policlonal hecho en conejo Ab15200 (1:200; Abcam).

Tras la incubación con los anticuerpos primarios, las células se lavaron 3 veces con PBS-T y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes diluidos en tampón de bloqueo: goat anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor Plus 488 y goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor Plus 488 (1:200, Thermo Fisher; A32723, A32731 respectivamente). Tras la incubación, las células se lavaron 3 veces en PBS.

Finalmente, para detectar los núcleos, todas las muestras se montaron con el medio de montaje VECTASHIELD Antifade Mounting Medium con DAPI (Vector Laboratories; H-1200-10). Las imágenes se adquirieron con el microscopio confocal LSM800 (Zeiss) con una magnificación de 200X.

3.5.2. Ensayo *In-cell western*

Sembramos 7500 mioblastos/pocillo en placas de 96 pocillos de las líneas a estudiar y las diferenciamos durante 7 días en DM. Posteriormente fijamos las placas con metanol frío y las permeabilizamos con PBS-T durante 4 rondas de 5 minutos. A continuación, bloqueamos durante 2 horas a temperatura ambiente con el tampón de bloqueo OBB (Odyssey Blocking Buffer; LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska; 927-40010). Posteriormente incubamos con los anticuerpos primarios correspondientes diluidos en OBB, durante toda la noche a 4 °C: mix anti-distrofina (1:100; NCL-Dys1, MANDYS1 y MANDYS106) y anticuerpo anti-MyHC (1:100, MF20); ya descritos en el apartado anterior. A continuación, realizamos 4 lavados (0,1% Tween20 en PBS) y en los pocillos para la detección de distrofina, amplificamos la señal incubando durante 1 hora con el anticuerpo biotinilado Goat Anti-Mouse IgG H&L (Biotin) (1:2000, Abcam; ab6788) diluido en OBB. Después, lavamos e incubamos durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes: IRDye® 800CW Streptavidin (1:2000, LI-COR; 926-32230) (para la detección de distrofina); IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG (1:500, LI-COR; 926-32210) (para la detección de MyHC) y el marcador CellTag™ 700 Stain (1:1000, LI-COR; 926-41090) que sirve de normalizador relativo al número de células de cada pocillo. Posteriormente realizamos 4 lavados, quitamos todo el volumen de los pocillos y leemos las placas en el escáner

Odyssey CLx Imager (LI-COR). Este aparato detecta las longitudes de onda emitidas por los fluoróforos utilizados que se encuentran en el infrarrojo cercano (800 nm y 700 nm), eliminando el ruido de fondo y presentando una mayor sensibilidad. Además, en cada placa incluimos varios replicados de controles negativos sin los anticuerpos primarios, que nos dará la información de señal de fondo.

Al contrario que las técnicas estándar de *western blot*, el *in-cell western* presenta una gran reproducibilidad, menor variación y permite realizar un mayor número de replicados, debido a la necesidad de utilizar un menor número de células.

3.5.3. Extracción de proteína y *western blot*

Se sembraron 10^6 mioblastos de cada línea a estudiar en placas Petri y se diferenciaron durante 7 días. Tras esto, se recogió el *pellet* celular y se congeló hasta $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

La extracción de proteína se realizó resuspendiendo cada *pellet* celular en 500 μl de tampón de lisis (apartado 2.1.2.2), vorteamos vigorosamente y sonicamos a 80 kHz en frío en un sonicador de baño, aplicando 3 pulsos de 10 segundos, con intervalos de descanso de otros 10 segundos. A continuación, continuamos con el proceso de extracción y de cuantificación de proteína como previamente hemos descrito en el 2.1.2.2.

Utilizamos la técnica de *western blot* para cuantificar la expresión de la distrofina en los miotubos de las líneas de interés, exactamente como previamente hemos descrito en el apartado 2.1.2.3.

3.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos generados en este estudio se realizó aplicando la prueba U de Mann-Whitney y la prueba de Kruskal-Wallis para determinar los niveles de significancia correspondientes. El análisis se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, Estados Unidos).

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE UNA COHORTE DE SUJETOS CON LA del45–55

1.1. Caracterización clínica de los pacientes

Se llevo a cabo una caracterización clínica completa de 39 sujetos, incluyendo 23 casos índices y 16 secundarios. Además, se obtuvo información fiable de 18 sujetos adicionales mediante entrevistas telefónicas o consultando las historias clínicas, debido a su fallecimiento (n= 13) o a la imposibilidad de realizar una visita presencial (n= 5). La **Tabla A5, Anexo II** recoge la información clínica de los 57 pacientes con del45–55 de esta serie, donde se especifica el grupo al que corresponden, asignado según los puntos de rotura del respectivo caso índice. El análisis de los 23 pedigríes demostró una transmisión ligada al cromosoma X en todos los casos índices, exceptuando 5 de ellos cuyo estatus materno no se pudo determinar.

Los pacientes se dividieron en las siguientes categorías de acuerdo a la clínica que presentaban: (I) hiperCKemia aislada (53% de los casos) subdividida en asintomática (n= 23) y paucisintomática (n= 7); (II) fenotipo DMB presente en el 28% de los casos (n= 16); (III) cardiopatía aislada, presente en el 19% de los casos (n= 11). La cardiopatía también se encontró en siete pacientes con fenotipo DMB. También se encontraron alteraciones cognitivas o de comportamiento en diez sujetos, nueve de los cuales eran de edad pediátrica y todos ellos presentando hiperCKemia. El paciente adulto además presentaba cardiopatía.

En la **Figura 12** se puede observar la distribución de los pacientes en las distintas categorías clínicas según la edad de su evaluación. Los pacientes de la categoría de hiperCKemia aislada (asintomáticos) eran significativamente más jóvenes que los DMB y cardiopatía aislada. La mediana de la edad de comienzo en los casos índice fue a los 12 años (rango, 2–40 años). Las alteraciones musculares en los pacientes DMB ocurrieron siempre después de los 20 años y en muchas ocasiones (10 de 16 casos), después de los 40 años (DMB-tardío). Aproximadamente el 44% (7 de 16 casos) de los pacientes DMB perdieron la deambulación, generalmente después de los 50 años.

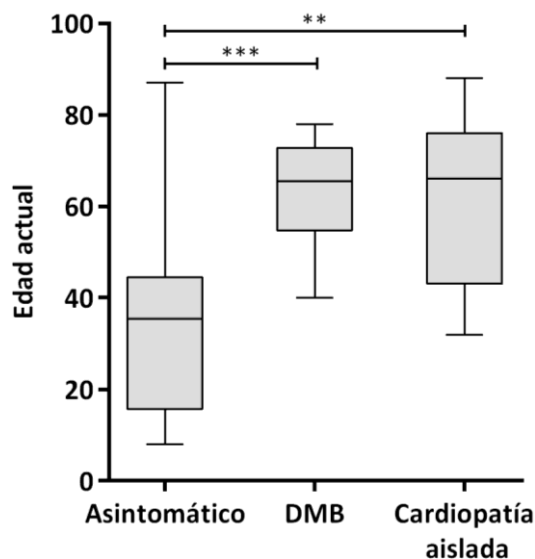


Figura 12. Representación gráfica de la edad en la evaluación de los sujetos del 45-55. Los diagramas de cajas muestran la mediana y el rango de la edad de evaluación de las tres en las que clasificamos a los sujetos según los fenotipos. Encontramos una diferencia significativa entre el grupo asintomático/paucisintomático (mediana= 35,5; rango= 8-87) y los grupos DMB (mediana= 65,5; rango= 40-78) y cardiopatía aislada (mediana= 66; rango= 32-88). **p-valor<0,01; ***p-valor<0,001 de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis).

El inicio de la cardiopatía ocurrió siempre después de los 20 años, con una incidencia creciente asociada a la edad (**Figura 13A**). Los detalles de los datos cardiológicos disponibles están recogidos en la **Tabla A6, Anexo II**. Cuatro pacientes presentaban bloqueos atrio-ventriculares requiriendo la implantación de marcapasos, uno de ellos a los 29 años como síntoma inaugural. Otros dos, recibieron un desfibrilador automático implantable (DAI). En la mayoría de las ocasiones los pacientes se mantuvieron estables mediante terapia cardíaca, sin embargo, el trasplante cardíaco fue indicado en 3 casos. Uno de ellos vivió nueve años tras la intervención, el segundo murió estando en la lista de espera de trasplante, mientras que el tercero está actualmente esperando la intervención.

Ninguno de los pacientes requirió atención respiratoria y las pruebas de evaluación rutinarias mostraron una CVF superior al 50% en todos los casos.

La prevalencia de los síntomas de la serie completa en los distintos rangos de edad se muestra en la **Figura 13A**. Mientras que, a la edad inferior de 20 años, la totalidad de los sujetos eran asintomáticos, éstos representaban el 22% después de los 60 años y en este tramo de edad los sujetos DMB se incrementaron hasta el 52%. La prevalencia de la cardiopatía alcanzó el 43,5% entre los mayores de 60 años (26% de los cuales la presentaban de forma aislada). Por otro lado, el subgrupo con el punto de

rotura específico más numeroso (grupo D1) presentaba una tendencia similar a la de la serie completa en cuanto a la prevalencia de los síntomas en las distintas edades (**Figura 13B**).

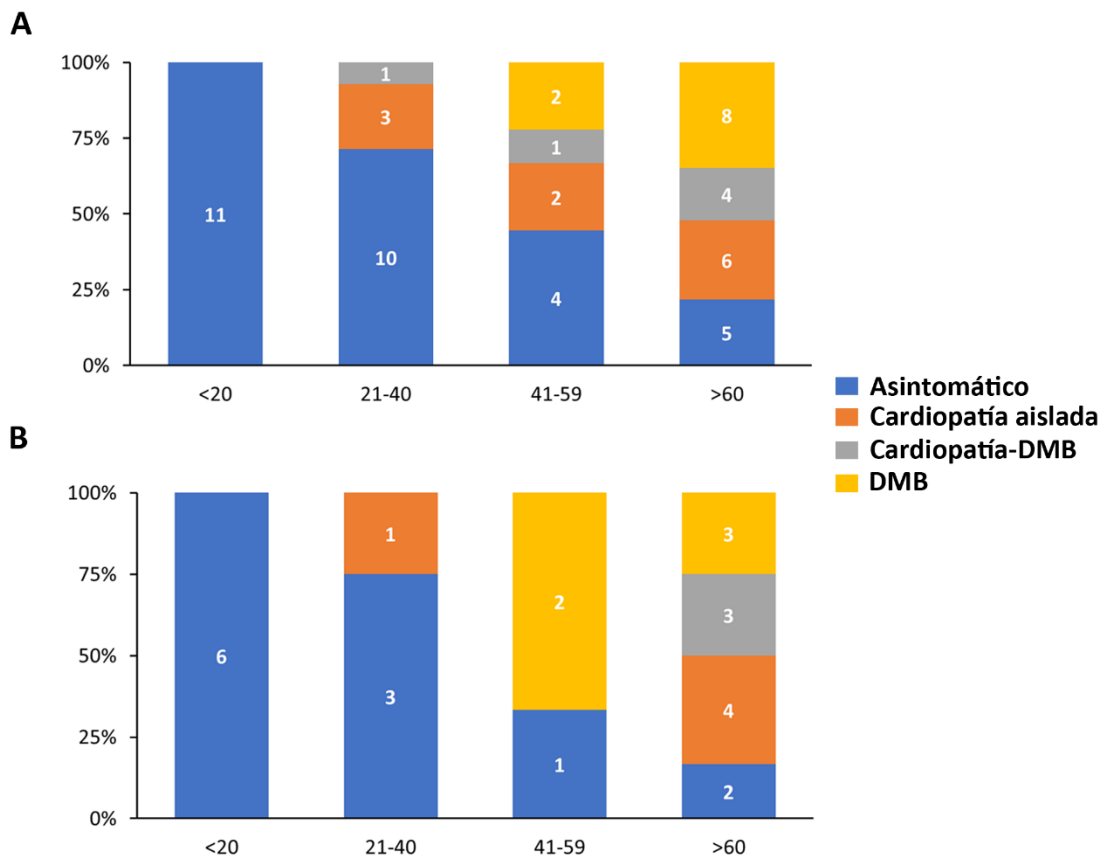


Figura 13. Prevalencia de las manifestaciones clínicas a lo largo de la edad en la serie del 45-55. (A) Prevalencia de los síntomas en la serie global (n= 57 sujetos) a lo largo de los cuatro tramos de edad indicados. (B) Misma representación, pero de los sujetos del subgrupo de delección 1 (D1) (n= 25), donde se observa una distribución similar a la de la serie global.

La **Tabla A7, Anexo II** recoge los resultados de la evaluación cognitiva que se llevó a cabo. Por un lado, nueve de los diez pacientes pediátricos presentaron alteraciones. Estas, estaban relacionadas con el neurodesarrollo (en el 80% de los casos), la reducción del CI (en el 40%), alteraciones del lenguaje ya sea en el procesamiento fonológico o verbal (88% y 55% de los casos, respectivamente); alteraciones de la función ejecutiva (55%) y problemas emocionales y de comportamiento (80% de internalización y 70% de externalización). Por otro lado, el paciente adulto evaluado presentaba un perfil similar a los pacientes pediátricos.

Cuando los datos fueron recogidos, 14 pacientes habían fallecido; seis de ellos debido a la cardiopatía, uno de ellos debido a muerte súbita y los seis restantes debido a otras causas médicas o no relacionadas con la enfermedad. La edad mediana de decesos se situaba en los 70 años (rango, 52–88 años). Particularmente, la esperanza de vida de la población masculina española se sitúa entre los 76 y los 79 años en los últimos 20 años.

1.2. Caracterización genética

1.2.1. Análisis de los puntos de rotura intrónicos

La secuenciación de los pacientes índice de nuestra serie reveló que los 23 se agrupaban en sólo 10 deleciones con puntos de rotura específicos en los intrones 44 y 55. Cuatro de las deleciones estaban presentes en más de un paciente índice (deleciones D1 a D4). Entre éstas, la D1 aparecía en 9 casos índice; la D2 y D3 en 3, mientras que la D4 en 2 casos índice. Las seis deleciones restantes (D5 a D10) estaban presentes solamente en un caso índice.

La posición de los puntos de rotura intrónicos y el tamaño de las 10 deleciones se puede observar en la **Tabla A8, Anexo II**. Como se puede observar en la **Figura 14**, es remarcable que mientras que los puntos de rotura de todas las deleciones en el intrón 44 se distribuyen de manera dispersa; en el intrón 55 se agrupan en sus 60 kb más proximales. Además, las deleciones D4 y D8 eliminan la región del promotor y el primer exón de la isoforma Dp140 de la distrofina, localizada en el intrón 44. Por otro lado, los distintos puntos de rotura pueden alterar las secuencias de los lncRNAs 44s, 44s2, 55s y 55as localizados en los intrones 44 y 55. Solamente la deleción D7 preserva todos los lncRNAs, mientras que la D8 elimina todas las secuencias. El resto de las deleciones elimina algunos lncRNAs (total o parcialmente), dando lugar a distintos patrones de preservación, siendo el más numeroso el que conserva los lncRNAs 44s y 44s2 (patrón PPNN) (**Figura 14, Figura 15 y Tabla A9, Anexo II**).

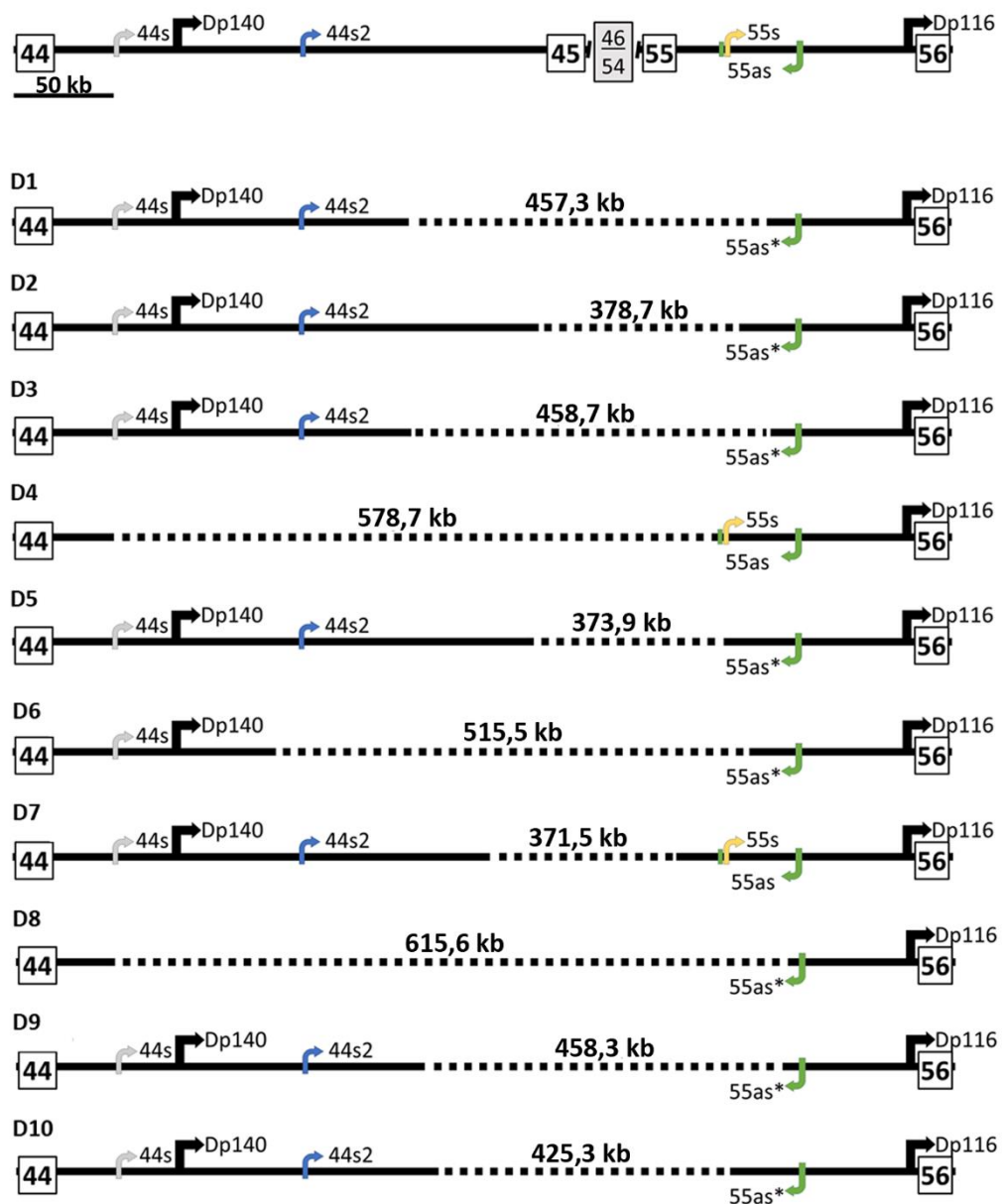


Figura 14. Representación esquemática de las diez deleciones con puntos de rotura intrónicos específicos encontrados en la cohorte del45-55. En la parte superior encontramos una representación de la arquitectura de los intrones 44 y 55 y sus exones adyacentes en condiciones normales. Se muestra la localización del promotor de las isoformas de la distrofina Dp140 y Dp116. Además, también están representados las posiciones de los *long non-coding RNAs* (lncRNAs) 44s, 44s2, 55s y 55as; así como su dirección de transcripción. Cada deleción específica (D1-D10) se representa de acuerdo con la posición sus puntos de rotura en los intrones 44 y 55, indicándose el tamaño (kb) de cada una de ellas. Todas las deleciones, excepto la D4 y D7 eliminan el sitio de poliadenilación del lncRNA 55as (indicado con *). Las líneas de puntos indican el segmento delecionado.

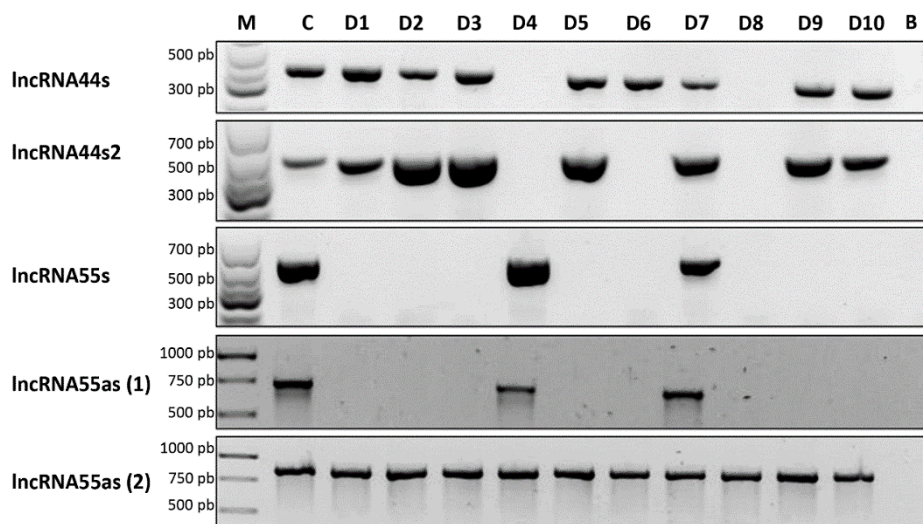


Figura 15. Detección de los *long non-coding RNAs* de los intrones 44 y 55 de *DMD*. Detección de los lncRNA 44s, 44s2, 55s y 55as mediante PCR utilizando ADN de sujetos con las diez deleciones del 45–55 específicas encontradas (D1-D10); un control sano (C) y un blanco (B). En el caso del lncRNA55as, amplificamos con dos parejas de *primers* (1) hibridando a la zona final donde se encuentra el sitio de poliadenilación y (2) hibridando en la zona cercana al inicio de transcripción. El patrón de lncRNA reflejado en la **Tabla A9, Anexo II** proviene de la presencia (P), ausencia (N) o ausencia parcial (N*, en el caso de la ausencia de la secuencia terminal del lncRNA55as).

El análisis de las secuencias alrededor de los puntos de rotura del intrón 44 y 55 reveló la presencia de elementos repetitivos en todas las deleciones; sin embargo, no se observó una homología extensiva entre los elementos encontrados en los dos puntos de rotura de la misma deleción. Adicionalmente se encontraron secuencias que pueden inducir rotura del ADN en las diez deleciones. Se encontraron palíndromos; la secuencia TTAAA conocida por inducir curvatura en el ADN (Singh *et al.*, 1997), además de la secuencia consenso de deleción TG(A/G)(A/G)(G/T)(A/C) descrita por Krawczak y colaboradores (Krawczak and Cooper, 1991). Por otro lado, se encontraron microhomologías de 1 a 6 pb en la zona de unión del neo-intrón 44–55 de todas las deleciones, así como inserciones (de 1 pb a 38 pb) en cinco deleciones (D3, D5, D6, D8 y D10). Curiosamente los nucleótidos insertados en las deleciones D6 (26 pb) y D8 (38 pb) son repeticiones cortas en tándem de la secuencia de referencia adyacente al punto de rotura. Todos estos elementos se pueden observar en la **Tabla A8, Anexo II** y **Figura A1, Anexo III**.

El análisis *in silico* de sitios de *splicing* en la zona de unión del neo-intrón 44–55, desveló la posibilidad de activación de pseudoexones en todas las deleciones (**Tabla A10, Anexo II**). Por otro lado, el análisis de los elementos reguladores de *splicing* en esta región mostró que las deleciones no modifican de manera sustancial el ratio entre

las secuencias potenciadoras y silenciadoras de *splicing* (ESE/ESS), ya que este se mantiene cercano a 1 en todas ellas (**Tabla A11, Anexo II**).

1.2.2. Análisis de haplotipos

Debido a que la mayoría de los pacientes índice que presentaban la misma delección (deleciones D1–D4) residían en la misma región geográfica, procedimos a realizar un análisis de haplotipos con el fin de buscar efectos fundadores.

El análisis desveló que todos los sujetos pertenecientes a cada una de las deleciones D2, D3 y D4 presentaban el mismo haplotipo (**Figura 16**).

Curiosamente entre los sujetos que presentaban la delección D1, se encontraron dos subgrupos de haplotipos. Por un lado, el subgrupo de los seis casos índice P2-P7 y por otro el compuesto por los tres casos índice P1, P8 y P9; pudiéndose observar estos dos perfiles detallados en la **Figura 17**. Este hecho indica la presencia de dos eventos fundadores distintos que han originado la misma delección específica.

Globalmente, se identificaron 5 mutaciones (una recurrente) que dieron lugar a distintos eventos fundadores.

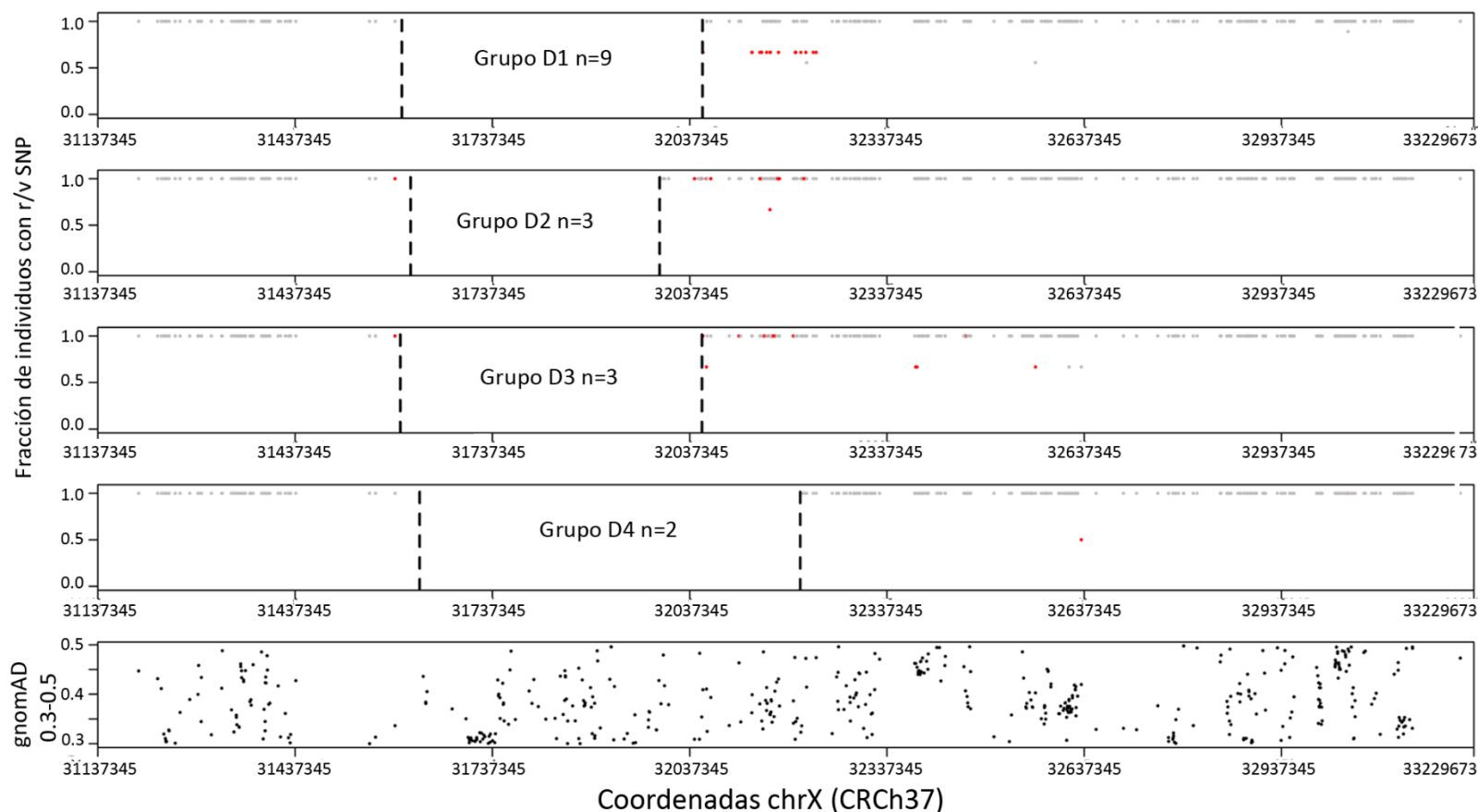


Figura 16. Análisis de haplotipos en los sujetos con las deleciones compartidas D1–D4. (A) Grafica que representa una selección de SNP (del inglés *single nucleotide polymorphism*) a lo largo de toda la región secuenciada del gen *DMD* en los sujetos índice de los grupos de deleción D1 a D4. Por cada SNP, se tiene en cuenta tanto la secuencia de referencia (*r*) como la variante (*v*) y sólo se representa la forma más predominante, con puntos grises (*r*) o rojos (*v*) según su proporción entre los sujetos de cada grupo. La altura de los puntos en el eje y representa dicha proporción. Como puede apreciarse todos los sujetos de cada uno de los grupos D2, D3 y D4 presentan prácticamente el mismo perfil de haplotipos; sin embargo, los sujetos del grupo D1 presentan dos perfiles de haplotipos. La posición de los puntos de rotura intrónicos se representa con líneas de puntos verticales. La última gráfica representa los SNPs que cumplen el criterio de selección (frecuencia alélica $\geq 0.3 < 0.5$) a lo largo de todo el gen *DMD*.

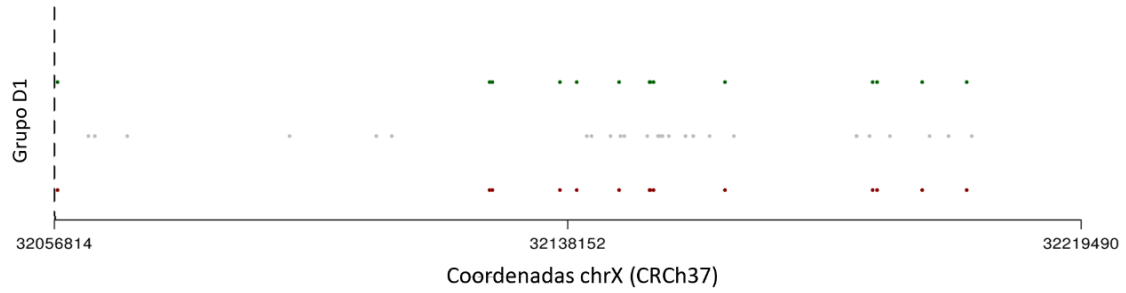


Figura 17. Representación gráfica de los dos haplotipos encontrados en la delección D1. Magnificación de la región de interés del grupo D1 (chrX: 32,056,814–32,219,490), para resaltar los dos perfiles de SNPs (del inglés *single nucleotide polymorphism*). Los SNPs (r o v) comunes en los 9 sujetos de este grupo están representados en gris, mientras que los subgrupos de 6 y 3 sujetos con distinto perfil de haplotipo se representan con puntos verdes y rojos, respectivamente. La posición de los puntos en el eje y es arbitraria.

2. ANÁLISIS DE FACTORES MODIFICADORES DEL FENOTIPO

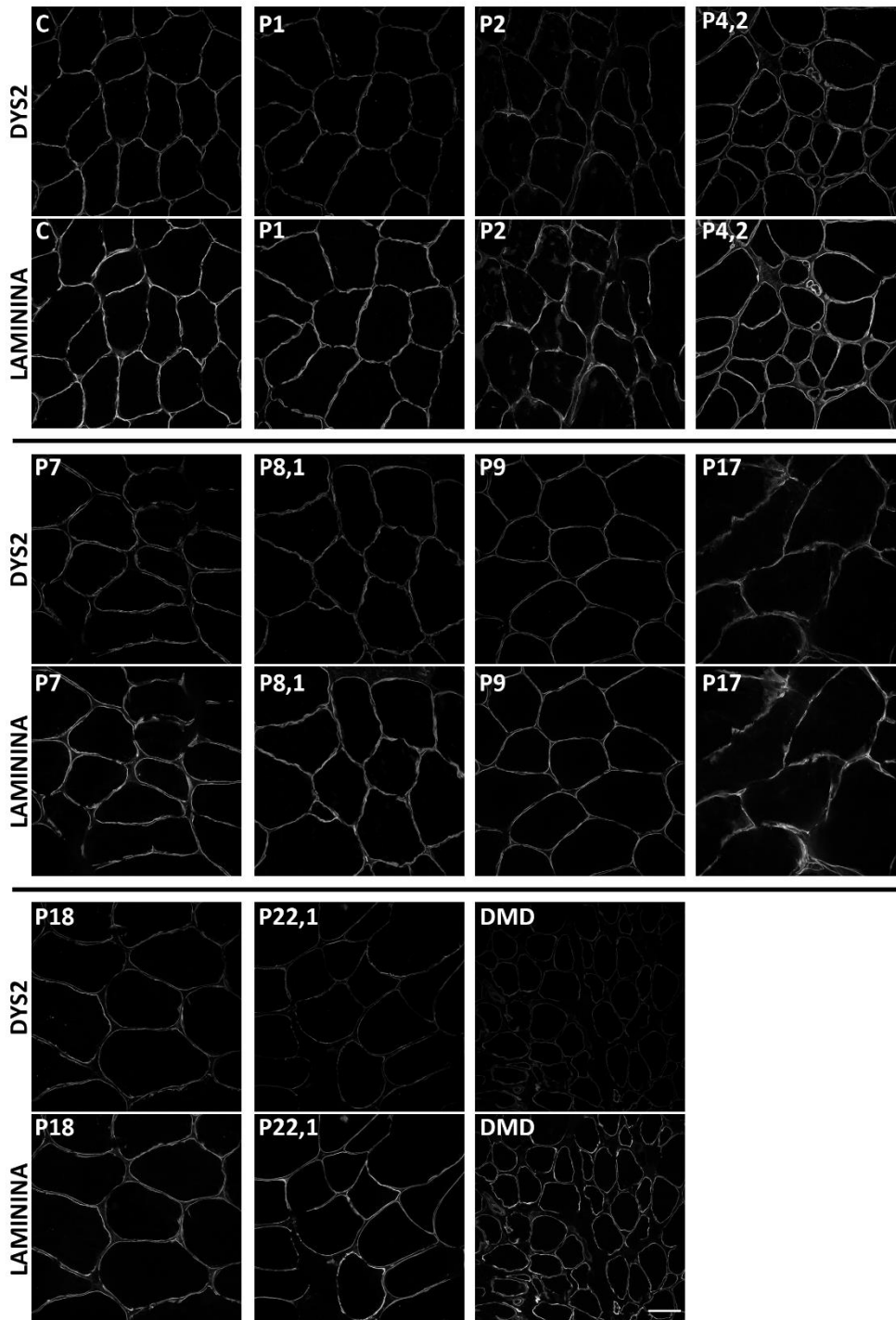
2.1. Factores modificadores en *cis*

2.1.1. Expresión de distrofina

El análisis de distrofina mediante inmunofluorescencia en las nueve biopsias musculares disponibles (**Tabla 1**) mostró una correcta expresión sarcolémica de la proteína, con una ligera reducción en cuanto a intensidad en algunos casos (**Figura 18A**). Por otro lado, se procedió a su cuantificación mediante la técnica de *western blot* mostrando altos niveles en todas las muestras (de 67% a 106% relativa a la señal de una muestra de un control sano) (**Figura 18B**).

Por otra parte, se procedió al análisis del ARN de las biopsias disponibles. Los resultados de la RT-PCR anidada (amplificando la región cercana al empalme de los exones 45–55 de *DMD*) no demostraron la presencia de ningún pseudoexon, pese a las predicciones *in silico* favorables. Sin embargo, el análisis de la muestra del paciente P18 (procedente del grupo D5 y que presenta un fenotipo severo), mostró en diversos replicados la presencia de un salto adicional de los exones 56 y 57, dando lugar a transcrito con la delección de los exones 45–57 (del45–57) cuya pauta de lectura está conservada (**Figura 19A**). Posteriormente se procedió a amplificar específicamente dicho transcrito (utilizando un cebador que hibridaba en la unión de los exones 44–58), revelándose la presencia de este transcrito alternativo en todas las muestras analizadas. Con el fin de profundizar en este hallazgo, se cuantificó el transcrito del45–57 mediante la técnica ddPCR, utilizando sondas específicas (marcadas con los fluoróforos FAM y HEX) para detectar los dos tipos de transcritos en cada una de las muestras. El análisis mostró que la expresión del transcrito del45–57 era muy residual y representaba menos del 0,1% en todas las muestras (respecto al transcrito del45–55) (**Figura 19B y C**).

A



B

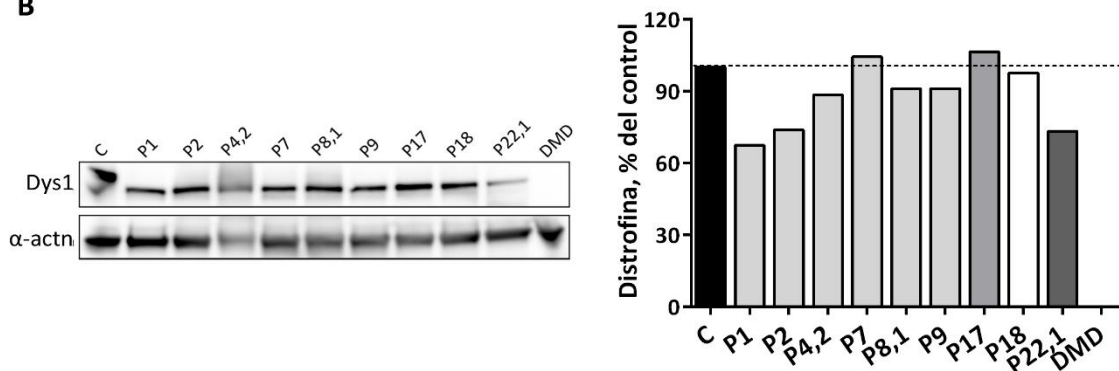


Figura 18. Análisis de la proteína distrofina en nueve biopsias musculares de sujetos con del44–55, además de una muestra de un control sano (C) y de distrofia muscular de Duchenne (DMD). (A) Imágenes representativas del marcaje de distrofina mediante inmunofluorescencia en secciones transversales, mostrando una correcta localización sarcolémica con una ligera o moderada reducción de intensidad en algunas muestras (DYS2, imágenes superiores). El marcaje de laminina (imágenes inferiores) se realizó para localizar el sarcolema de cada muestra. Escala= 50 μ m. (B) Cuantificación de distrofina mediante la técnica de *western blot* sobre extractos totales de proteína de las biopsias musculares de los mismos sujetos. Podemos apreciar que en las muestras de los sujetos con del44–55 la distrofina presenta un menor peso molecular que en el control y la ausencia de esta en la muestra DMD. Los niveles de distrofina (Dys1) se normalizan respecto a la señal de α -actinina (α -actn) y se representan como porcentaje de la señal del control. Os datos representan la media de 3 replicados técnicos. Las barras del mismo tono indican los sujetos que pertenecen al mismo subgrupo de delección (grupo D1 = P1; P2; P4,2; P7; P8,1; P9. Grupo D4 = P17. Grupo D5= P18. Grupo D9 = P22,1).

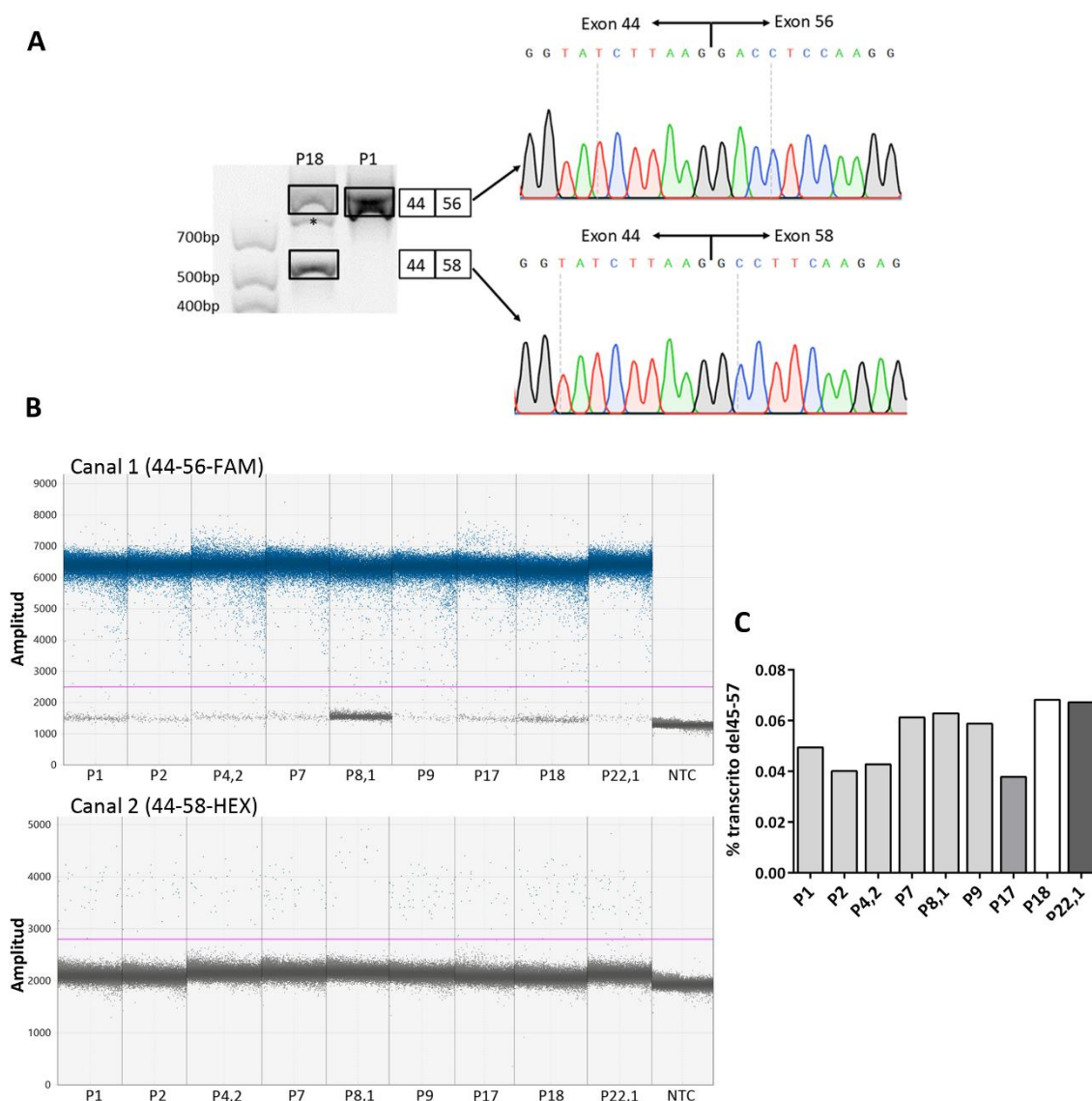


Figura 19. Análisis de expresión de distrofina en nueve muestras de ADNc de músculo de la serie del44–55. (A) Presencia de un transcrito alternativo en el ADNc del sujeto P18 (D5). Los productos de la RT-PCR anidada (del inglés, *reverse transcription PCR*) de las muestras P18 (D5) y P1 (D1) mostró la presencia de una banda superior, que corresponde al transcrito esperado para la del44–55. Además, en el

caso de la muestra P18 aparecía una banda inferior como resultado de un salto adicional de los exones 56 y 57. La banda intermedia que observamos en P18 marcada con un asterisco correspondía a la formación de un heterodúplex. La identidad de todas las bandas fue confirmada mediante secuenciación Sanger. **(B)** Graficas 1-D de amplitud de fluorescencia de los dos ensayos ddPCR utilizados para cuantificar los niveles del transcrito del45–55 (parte superior, utilizando una sonda marcada con FAM que hibrida en la unión de los exones 44–56) y del transcrito del45–57 (parte inferior, sonda marcada con HEX que hibrida en la unión de los exones 44–58) en las 9 muestras. Las líneas horizontales determinan el umbral establecido para discriminar las gotas positivas y negativas (por encima y debajo, respectivamente). Se llevaron a cabo tres replicados técnicos por cada muestra y se incluyó una muestra sin ADNc como control negativo (NTC). **(C)** Baja proporción de expresión del transcrito del45–57 en todas las muestras analizadas determinado: $[(\text{copias/ul } 44-58)/(\text{copias/ul } 44-58 + \text{copias/ul } 44-56)] * 100$. Los porcentajes representan la media de 3 réplicas. Las barras del mismo tono indican los sujetos que pertenecen al mismo subgrupo de delección (grupo D1 = P1; P2; P4,2; P7; P8,1; P9. Grupo D4 = P17. Grupo D5= P18. Grupo D9 = P22,1).

2.1.2. Efecto de los puntos de rotura y secuencias intrónicas sobre la severidad clínica

Con la intención de encontrar posibles elementos que condicionen la variabilidad clínica observada en nuestra cohorte de pacientes, nos centramos en una primera instancia en los intrones 44 y 55. Para ello realizamos un análisis estadístico de regresión bayesiana (**Tabla 3**).

Por un lado, evaluamos los distintos puntos de rotura, observando un efecto significativo de la delección D5 sobre la severidad muscular (OR: 10,82; IC: 1,31–98,23) y sobre la aparición de cardiopatía (OR: 44,30; IC: 2,07–2530,51).

Por otro lado, también se evaluaron los distintos patrones de preservación de lncRNA, no encontrando ningún efecto sobre la severidad clínica.

También se evaluó el efecto de la interrupción del promotor de la isoforma Dp140 (delecciones D4 y D8) sobre la severidad muscular y el desarrollo de cardiopatía; sin encontrar ninguna asociación, tal y como esperábamos. La relación de la isoforma Dp140 con las alteraciones cognitivas y de comportamiento no se evaluó mediante la aproximación estadística utilizada para el resto de las variables, debido a la limitación y el sesgo de los estudios cognitivos (principalmente llevados a cabo en la población pediátrica). Sin embargo, esta conexión está reflejada en la **Tabla A7, Anexo II**, donde puede observarse que ocho de los diez casos con alteraciones cognitivas preservaban el promotor de la Dp140 (Dp140+), mientras que los dos restantes no lo conservaban (Dp140-).

2.2. Factores modificadores en *trans*

Continuando con la búsqueda de elementos promotores de la variabilidad clínica, decidimos analizar otros factores no relacionados al propio gen *DMD*. Por un lado, evaluamos el efecto de tres conocidos factores genéticos modificadores estudiados en *DMD* (Bello and Pegoraro, 2019): *SPP1*, *LTBP4* y *ACTN3*. Este análisis se realizó en los 23 pacientes índice y 10 casos secundarios (n= 33) y no se encontró ningún efecto estadísticamente significativo asociado a la severidad muscular. Sin embargo, sí que encontramos que la ausencia del haplotipo IAAM/IAAM en *LTBP4*, se asociaba con la presencia de cardiopatía (OR: 40,83; IC: 1,99–1707,37) (**Tabla 3**).

Adicionalmente, evaluamos la presencia de mutaciones concurrentes en los casos índice (n= 23) que fueron secuenciados mediante secuenciación masiva con el panel de genes (que incluía 268 genes relacionados con enfermedades neuromusculares). Se detectaron mutaciones en heterocigosis (**Tabla A9, Anexo II**) en cinco sujetos (P1, P3, P8, P16 y P17) pero no se encontró ninguna relación con los síntomas que estos presentaban.

Tabla 3. Análisis de regresión bayesiana evaluando el efecto de la posición de las deleciones y los factores modificadores sobre la severidad muscular y la presencia de cardiopatía.

	Severidad Muscular ¹	Cardiopatía ²
Grupo Deleción (n= 55)		
D1 (n= 25)	Ref.	Ref.
D2 (n= 5)	0,525 (0,067-3,817)	0,396 (0,028-4,161)
D3 (n= 6)	2,098 (0,257-15,275)	2,915 (0,39-22,022)
D4^(DP140⁻) (n= 6)	1,957 (0,02-215,243)	0,876 (0,009-82,252)
D5 (n= 3)	10,824 (1,314-98,235)³	44,302 (2,075-530,511)³
D7 (n= 4)	0,196 (0,002-14,81)	4,656 (0,121-190,056)
D9 (n= 3)	0,33 (0,023-4,046)	0,047 (0,001-1,358)
D10 (n= 3)	0,09 (0,001-3,271)	0,085 (0,001-3,62)
lncRNA (n=55)		
PPPP (n= 4)	Ref.	Ref.
PPNN(n= 45)	9,835 (0,217-593,61)	2,112 (0,062-79,874)
NNPP (n= 6)	2,033 (0,024-206,376)	0,807 (0,009-68,4)

	Severidad Muscular ¹	Cardiopatía ²
Modificadores (n=33)		
<i>SPP1</i>	1,125 (0,135-8,59)	1,213 (0,132-10,35)
<i>LTBP4</i>	0,576 (0,065-6,127)	40,829 (1,996-1707,37)³
<i>ACTN3</i> modelo 1	0,639 (0,109-3,733)	0,486 (0,065-3,327)
<i>ACTN3</i> modelo 2	0,519 (0,151-1,53)	0,733 (0,223-2,177)
Edad	1,086 (1,029-1,155)³	1,072 (1,013-1,145)³

Como referencia (Ref.) utilizamos el grupo de delección D1 y el patrón que preserva todos los lncRNA (del inglés, *long non-coding RNA*) (PPPP). La edad se consideró como factor de confusión en los distintos análisis. Los grupos de delección y de patrón de lncRNA que contenían un solo individuo fueron eliminados del análisis (D6/PNNN y D8/NNNN). La edad se consideró como factor de confusión en todos los análisis. Para cada comparación se indica el *odd ratio* y entre paréntesis los intervalos de credibilidad.

Patrón de lncRNA, P=presencia y N=ausencia

¹Modelo de regresión ordinal bayesiano.

²Modelo de regresión logística bayesiano.

³**Estadísticamente significativo**

3. APROXIMACIÓN AL MODELO CELULAR

Tras la exhaustiva evaluación de los fenotipos asociados a la del45–55, así como de los potenciales factores modificadores, en este segundo objetivo nos centramos en la aproximación terapéutica de esta mutación. Para ello, decidimos reproducir la del45–55 específica de un subgrupo de sujetos estudiados en los objetivos anteriores mediante el sistema de edición génica CRISPR-Cas9 en mioblastos DMD y proceder a su caracterización celular y fenotípica.

3.1. Generación de un modelo celular *DMD* del45–55 mediante edición génica

Con el propósito de reproducir la del45–55 específica del subgrupo D1, es necesario realizar dos cortes de doble cadena en las inmediaciones de los puntos de rotura específicos en los intrones 44 y 55. Para ello diseñamos dos gRNAs dirigidos a cada uno de los puntos de rotura que fueron clonados en vectores independientes que expresaban la nucleasa Cas9 y el reportero GFP. El testado de cada uno de ellos se realizó introduciéndolos (individualmente) en las células HEK293, debido a su facilidad de manipulación y transfección. Sus respectivas eficiencias de corte se evaluaron mediante el ensayo T7E1 (**Figura 20**). En base a éstas, seleccionamos la gRNA_44.1 y la gRNA_55.2 (que hibridan en el intrón 44 y 55 respectivamente) que posteriormente se co-transfectaron en células HEK293 confirmando la producción de la del45–55. Las secuencias y diseño de los dos gRNAs pueden observarse en la **Figura 21A, B**.

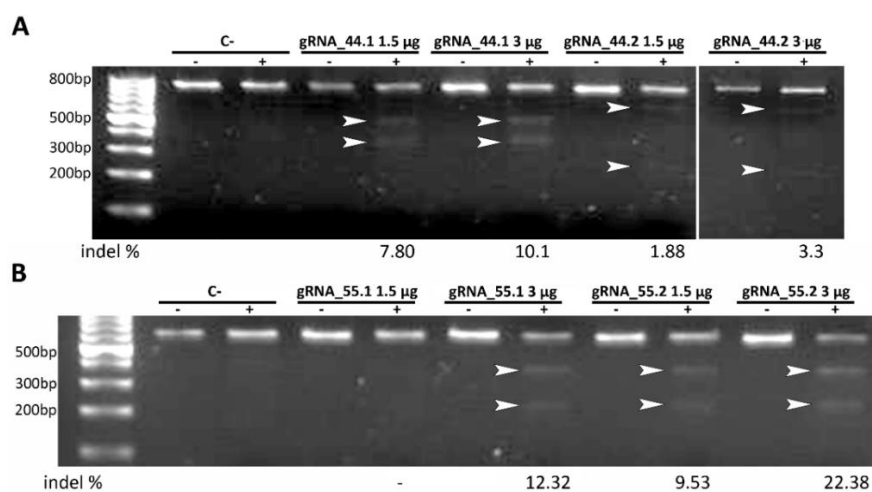


Figura 20. Análisis de las eficiencias de corte de los gRNAs diseñados mediante el ensayo de la T7E1 en células HEK293. Comparación de las distintas eficiencias de corte (en base al porcentaje de

inserciones/deleciones, indel %) generadas al transfectar células HEK293 con los vectores PX458 que contienen cada una de las gRNAs diseñadas dirigidas para el intrón 44 (A) y 55 (B). Por cada gRNA se utilizan 2 concentraciones de vector y una carrera con las muestras tratadas con la enzima T7 (+) y otra si esta (-). También se utiliza muestra de células no trasfectadas (C-). Las bandas generadas por la enzima se indican con flechas blancas.

A continuación, procedimos a introducir los dos vectores con los gRNAs seleccionadas en mioblastos inmortalizados DMD. Cuarenta y ocho horas después, el 14,42% de las células transfectadas expresaban el reportero GFP (significando que habían incorporado uno o los dos vectores) y se separaron mediante FACS para sembrarse individualmente en placas de 96 pocillos con el fin de obtener cultivos clonales homogéneos. Éstos se fueron expandiendo y mediante una PCR de cribado se determinó que aproximadamente en uno de cada diez clones analizados se había introducido la deleción, que se confirmó a nivel de ADN por secuenciación Sanger (**Figura 21C**). Uno de los clones positivos fue amplificado para posteriormente proceder a su caracterización funcional.

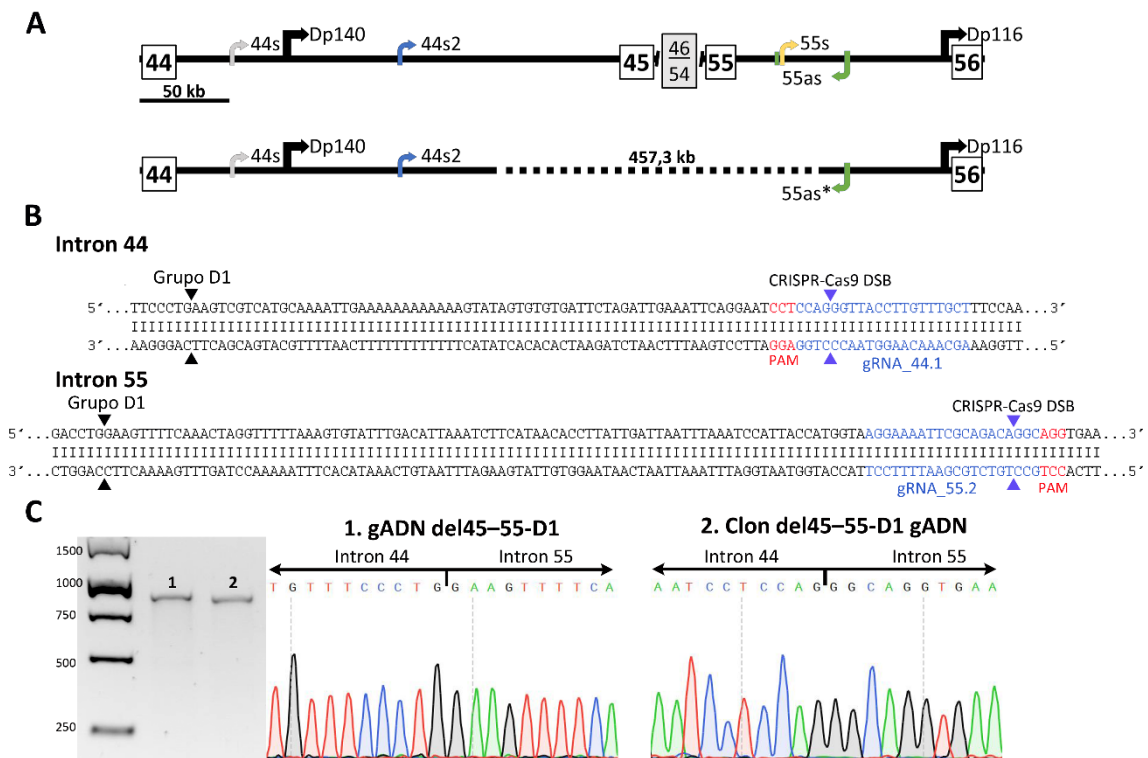


Figura 21. Diseño CRISPR-Cas9 para replicar la del45-55 del grupo D1. (A) En la parte superior está representada la arquitectura genómica de los intrones 44 y 55 del gen DMD, mostrando la localización del promotor de las isoformas de la distrofina Dp140 y Dp116 además de la posición de los lncRNA (*long non coding RNA*) 44s, 44s2, 55s and 55as. Debajo encontramos una representación de la posición de los puntos de rotura intrónicos específicos del grupo D1, así como su implicación sobre los elementos ahí localizados. La línea de puntos indica la región delecionada. (B) Secuencias genómicas de los intrones 44 y 55, donde

la posición del punto de rotura del grupo D1 en los intrones 44 y 55 se indica con flechas negras. La secuencia de las gRNAs_44.1 y 55.2 están representadas con letras azules y su secuencia PAM con letras rojas. Las flechas moradas indican el sitio de corte de la nucleasa Cas9 (DSB, del inglés *double strand break*). **(C)** Producto de PCR de la región de la delección, así como su secuenciación por Sanger del ADN genómico de un sujeto del grupo D1 (paciente P1) (1) y del clon editado seleccionado (2).

3.2. Análisis de la eficiencia de corte y de los potenciales *off-targets* mediante secuenciación masiva

Con el objetivo de conocer de forma precisa las eficiencias de corte de los gRNAs escogidos (*on-target*) y comprobar la éstos habían producido algún corte inespecífico (efectos *off-target*) utilizamos secuenciación masiva de última generación. Utilizamos dos predictores (Bae *et al.*, 2014; Oliveros *et al.*, 2016) para identificar los potenciales *off targets* de cada una de los gRNAs (3 para el gRNA_44.1 y 4 para el gRNA_55.2). Las secuencias y la localización genómica de los 7 potenciales *off-targets*, así como de los 2 *on-targets* pueden encontrarse en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Posición genómica y secuencias de las regiones *on-target* y potenciales regiones *off-target*.

Nombre	Localización ^a	Gen ^b	Secuencia (5'-3') ^c
gRNA_44.1	ChrX: 32038608-	<i>DMD</i>	AGCAAACAAGGTAACCCTGG AGG
On	32038631 (+)	(ENSG00000198947)	
gRNA_44.1	Chr2:105083351-	<i>MRPS9</i>	AGgAAAggAGGTAACCCTGG TGG
Off1	105083374 (-)	(ENSG00000135972)	
gRNA_44.1	Chr2: 14281851-	<i>LINC00276</i>	AtCcAAACAAGaTAACCCTGG GGG
Off2	14281874 (+)	(ENSG00000230448)	
gRNA_44.1	Chr9: 21835997-	<i>MTAP</i>	AGCAAAGgGGTAgCCCTGG GGG
Off3	21836020 (-)	(ENSG00000099810)	
gRNA_55.2	ChrX: 31581248-	<i>DMD</i>	AGGAAAATTCGCAGACAGGC AGG
On	31581271 (-)	(ENSG00000198947)	
gRNA_55.2	Chr5:	<i>HAVCR1</i>	AGGAAAATgaGCAGACAGGCT TGG
Off1	157057959- 157057982 (+)	(ENSG00000113249)	
gRNA_55.2	Chr11:	<i>lncRNA</i>	AGGAAAATTtaCAGACAGGa TGG
Off2	94916762- 94916785 (+)	(ENSG00000256469)	

Nombre	Localización	Gen	Secuencia (5´-3´)
gRNA_55.2 Off3	Chr6: 111393626- 111393649 (-)	<i>REV3L</i> (ENSG00000009413)	AGGAAgATaCGaAGACAGGCTGG
gRNA_55.2 Off4	Chr2: 238379513- 238379536 (-)	<i>TRAF3IP1</i> (ENSG00000204104)	AGGAAAATTCaCaAtACAGGaTGG

(a) Localización genómica en base al genoma humano de referencia GRCh38/hg38.

(b) Nombre del gen y su código de acceso en Ensembl

(c) Los nucleótidos en minúscula indican que difieren de la secuencia original del gRNA (*mismatches*) y en negrita se muestra la secuencia PAM (*protoespacer adjacent motif*).

El ADN extraído de los mioblastos transfectadas con los dos gRNAs (para los *off-targets*), con cada uno de los gRNA independientemente (para el *on-target*) y sin transfectar (control negativo) se utilizó para generar la librería de secuenciación de amplicones.

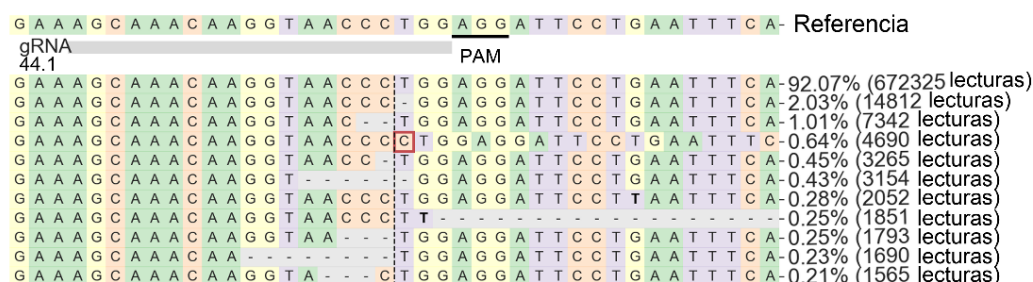
Los archivos generados por el secuenciador se analizaron con el programa CRISPResso2 (Clement *et al.*, 2019), que utiliza una estrecha ventana de cuantificación de los eventos encontrados (inserciones, deleciones y sustituciones) restringida al sitio de corte esperado de la nucleasa (3 pb aguas arriba de la secuencia PAM).

Todos los amplicones (tanto de las células control como de las transfectadas) presentaron una alta cobertura, por encima de las 400.000 lecturas correctamente alineadas exceptuando el *off-target* 3 del gRNA_44.2 donde obtuvimos muy baja cobertura y no se pudo realizar el análisis al no alcanzar los estándares requeridos por el programa. Probablemente ocurrió debido a una baja concentración de este amplicón en la mezcla final, originado por un error en la determinación de la concentración.

En la **Tabla A12, Anexo II** podemos observar el número de lecturas clasificadas por el programa CRISPResso2 según el tipo de modificación (inserciones, deleciones y sustituciones) para cada amplicón tanto en las muestras transfectadas como en las que no.

En cuanto al *on-target* observamos que el gRNA_44.1 producía un 5,50% de lecturas modificadas mientras que el gRNA_55.2 un 9,99%. En ambas, la mayoría de las modificaciones correspondían a inserciones o deleciones, características del mecanismo de reparación celular NHEJ. Las principales lecturas obtenidas (con sus respectivas modificaciones) de las muestras tratadas con cada uno de los gRNAs, así como su frecuencia pueden observarse en la **Figura 22**.

A



B

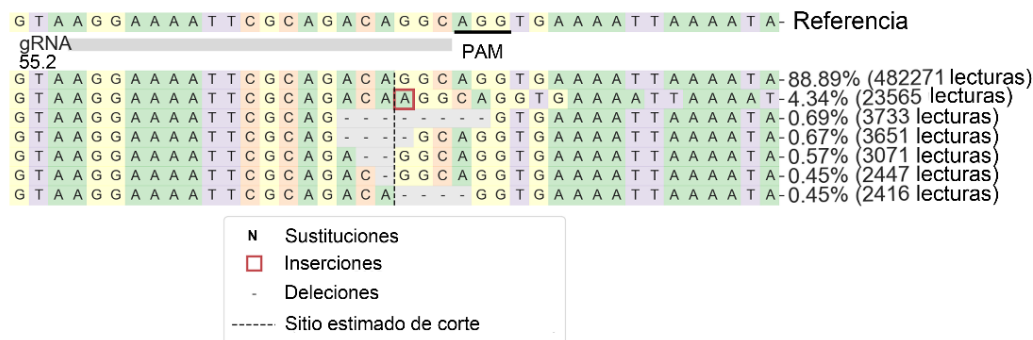


Figura 22. Principales frecuencias alélicas generadas tras el corte de los gRNAs. Representación de las lecturas obtenidas del análisis de secuenciación masiva derivadas de la transfección de mioblastos DMD con los guías gRNA_44.1 (A) y gRNA_55.2 (B). Se indica la secuencia de referencia, así como las secuencias con las principales modificaciones y su porcentaje respecto al total. La representación de las modificaciones y el sitio de corte de la Cas9 esta explicado en la leyenda. PAM (del inglés, *protospacer adjacent motif*) Imagen adaptada de los resultados obtenidos con el programa CRISPresso2.

Con el fin de profundizar en el estudio de los posibles *off-targets* generados por el sistema CRISPR-Cas9 utilizamos el programa bioinformático CRISPresso2 Compare, que analiza los resultados obtenidos de tanto de la muestra transfectada como la que no respecto a la secuencia de referencia. Los resultados pueden observarse en el **Figura A2, Anexo III**. En ninguna de las secuencias *off-targets* encontramos un aumento de la presencia de indels en la zona cercana al sitio teórico de corte de la Cas9 en la muestra transfectada con los gRNAs (principales modificaciones derivadas de la reparación de un DSB). Sin embargo, sí que encontramos la presencia de sustituciones, en algunos casos con más frecuencia en la muestra no transfectada (gRNA_44.1 *off-target* 1 y gRNA_55.2 *off-target* 4). Por ejemplo, en el caso del *off-target* 2 del gRNA_44.1 estas sustituciones eran más frecuentes en las células transfectadas, aunque aparecen muy alejadas del sitio teórico de corte por la Cas9 (**Tabla A12, Anexo II**).

Además del análisis mediante secuenciación masiva de los potenciales *off-targets* en el grupo de células transfectadas con los dos gRNAs, confirmamos con

secuenciación Sanger que no había ninguna modificación en esas regiones en el clon editado que se utilizó posteriormente para su caracterización funcional. Los cromatogramas con las secuencias de estas regiones en clon y en las células DMD sin transfectar pueden observarse en la **Figura A3, Anexo III**.

3.3. La expresión de distrofina es recuperada en el clon editado

El objetivo principal fue evaluar si la introducción de la del45–55-D1 en las células DMD es capaz de rescatar la expresión de distrofina. Para ello, comparamos el clon editado respecto a la línea no editada (DMD). Además, consideramos que podría ser interesante la comparación de los mioblastos editados con los propios del paciente P1 que tomamos como modelo. Los mioblastos primarios de este paciente se inmortalizaron con el fin de aumentar su capacidad proliferativa, permitiendo así realizar distintos análisis que de otra forma no se hubieran podido abordar.

En una primera instancia confirmamos mediante RT-PCR y secuenciación Sanger que el clon editado presentaba a nivel de ARN la delección de los exones 45–55, al igual que los miotubos del paciente P1. Con esto, comprobamos que ninguna de estas dos líneas presentaba alteraciones de *splicing*, como inclusión de pseudoexones o eventos de salto de exón adicionales (**Figura 23A**). Por otro lado, utilizando la ddPCR cuantificamos la expresión de distrofina en cuatro líneas de mioblastos diferenciados: control 1, clon editado, DMD y células del paciente P1. Observamos un aumento de transcritos *DMD* en las células editadas respecto a las no editadas, siendo incluso superior al que presentaban las otras dos líneas celulares **Figura 23B**.

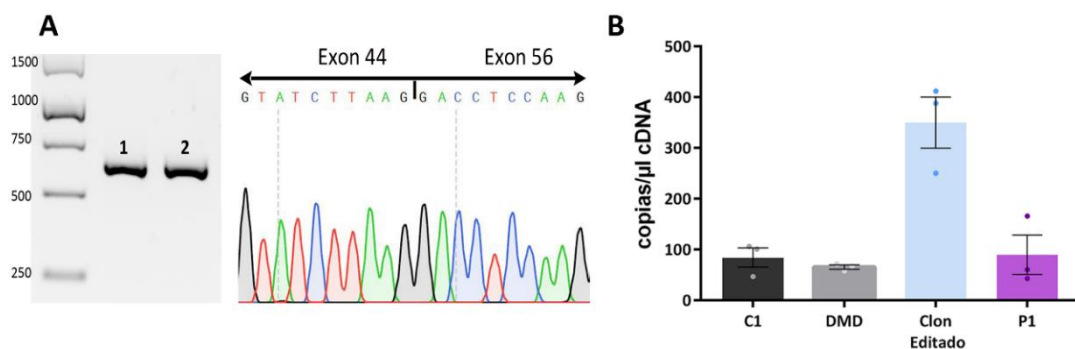


Figura 23. Análisis de la expresión de distrofina a nivel de ARN en el clon editado. (A) Confirmación de la del45–55 sobre el ARN de mioblastos diferenciados del paciente P1 (1) y del clon editado (2). En ambos se puede observar la secuencia del exón 56 yuxtapuesta a la del exón 44. (B) Cuantificación de la expresión de distrofina mediante ddPCR sobre el ADNc de miotubos diferenciados de líneas control 1

(C1), DMD, el clon editado y el paciente P1 (P1); observando el aumento de expresión tras la edición génica ($n=3$ réplicas). La gráfica representa la media \pm SEM (error estándar de la media).

A continuación, procedimos a evaluar la expresión de distrofina en el clon editado, a nivel proteico y compararlo frente líneas de mioblastos controles, DMD y del paciente P1.

En un primer lugar, mediante inmunofluorescencia observamos la recuperación de la expresión de distrofina en los miotubos del clon editado (**Figura 24A**). Además, realizamos una precisa cuantificación de distrofina mediante la técnica de *in-cell western*, observando un incremento de 22,13 veces de media respecto a los miotubos DMD no editados (**Figura 24B**).

Por otro lado, la cuantificación de distrofina también la realizamos mediante la técnica de *western blot* estándar, incluyendo para este análisis 2 líneas de mioblastos controles además de las ya comentadas anteriormente. Pudimos observar la recuperación de distrofina en los miotubos editados, presentando niveles incluso mayores a los controles sanos y al paciente modelo (**Figura 24C**).

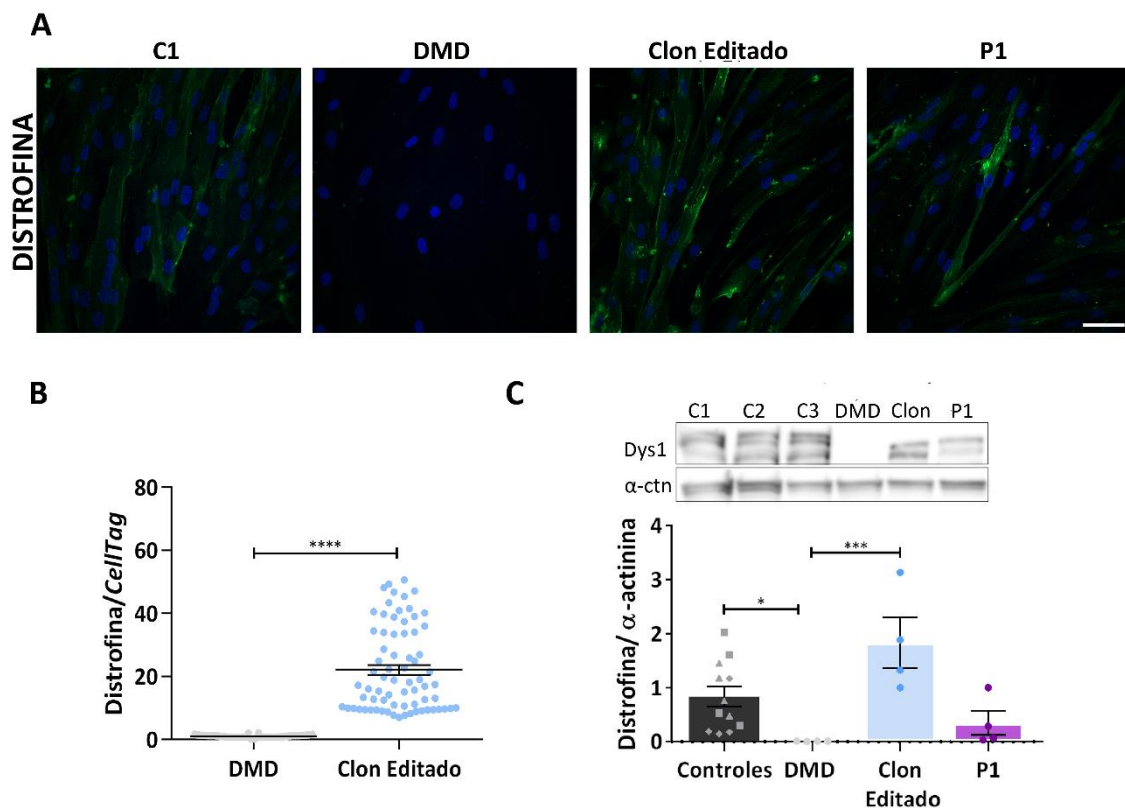


Figura 24. Evaluación de expresión de distrofina de en los mioblastos del clon editado. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal del inmunomarcaje de distrofina (verde) en miotubos diferenciados

de: Control 1 (C1), DMD, Clon editado y paciente P1 (P1). Los núcleos están marcados con DAPI (azul) y la escala es 50 μm . **(B)** Cuantificación de la expresión de distrofina mediante myoblot en los miotubos del clon editado frente a los de DMD no editados. Señal de distrofina normalizada respecto a la señal del CellTag ($n=72$ pocillos). **(C)** Cuantificación de distrofina mediante *western blot*, sobre extractos totales de proteínas de los miotubos diferenciados comentados anteriormente además de dos controles adicionales que se agruparon para su cuantificación (C1= \blacktriangle , C2= \blacklozenge , C3= \blacksquare). Los niveles de distrofina (Dys1) se normalizan respecto a la señal de α -actinina (α -actn) ($n=4$ por cada línea). *p-valor $< 0,05$; ***p-valor $< 0,001$; ****p-valor $< 0,0001$ de acuerdo con la prueba de Mann–Whitney U (B) y Kruskal-Wallis (C). Las gráficas representan la media \pm SEM (error estándar de la media).

3.4. La introducción de la del45–55-D1 rescata los defectos en la diferenciación de mioblastos DMD con ausencia de distrofina

Los mioblastos de sujetos DMD con mutaciones que rompen la pauta de lectura e impiden la producción de distrofina presentan defectos en su capacidad de diferenciación (Choi *et al.*, 2021; Soblechero-Martín *et al.*, 2021). Por tanto, llevamos a cabo la inmunofluorescencia de desmina, una proteína específica de músculo de tipo III de los filamentos intermedios esencial para mantener el apropiado soporte estructural de las células musculares, para analizar la capacidad de fusión de los miotubos de las distintas líneas celulares (control, DMD, clon editado y paciente modelo). Observamos que tras 7 días diferenciando, el índice de fusión de los miotubos DMD estaba reducido significativamente respecto a los controles sanos, mientras que este parámetro se recuperaba casi al completo en el clon editado. Por otro lado, no encontramos diferencias significativas entre las células editadas y las del paciente P1 o las del control sano **Figura 25A, B**.

Adicionalmente, evaluamos mediante inmunofluorescencia la cadena pesada de la miosina, MyHC, como marcador tardío de diferenciación (Chal and Pourquié, 2017) en los miotubos de las mismas líneas celulares. En este análisis observamos un defecto en la diferenciación tardía de las células DMD, donde solamente el 20% de los núcleos correspondían a células MyHC⁺, comparado con el 37% de los miotubos control tras 7 días de diferenciación. Al igual que ocurría con el índice de fusión, la introducción de la del45–55-D1 fue suficiente para mejorar significativamente este fenotipo con valores superiores (46,5% de los núcleos) a los del control sano y a los miotubos del paciente P1 (32% de los núcleos) (**Figura 25A y C**).

Además, cuantificamos la expresión de MyHC mediante *in-cell western* y observamos un aumento significativo (aproximadamente el doble) en los miotubos diferenciados del clon editado respecto a los de la línea DMD (**Figura 25D**).

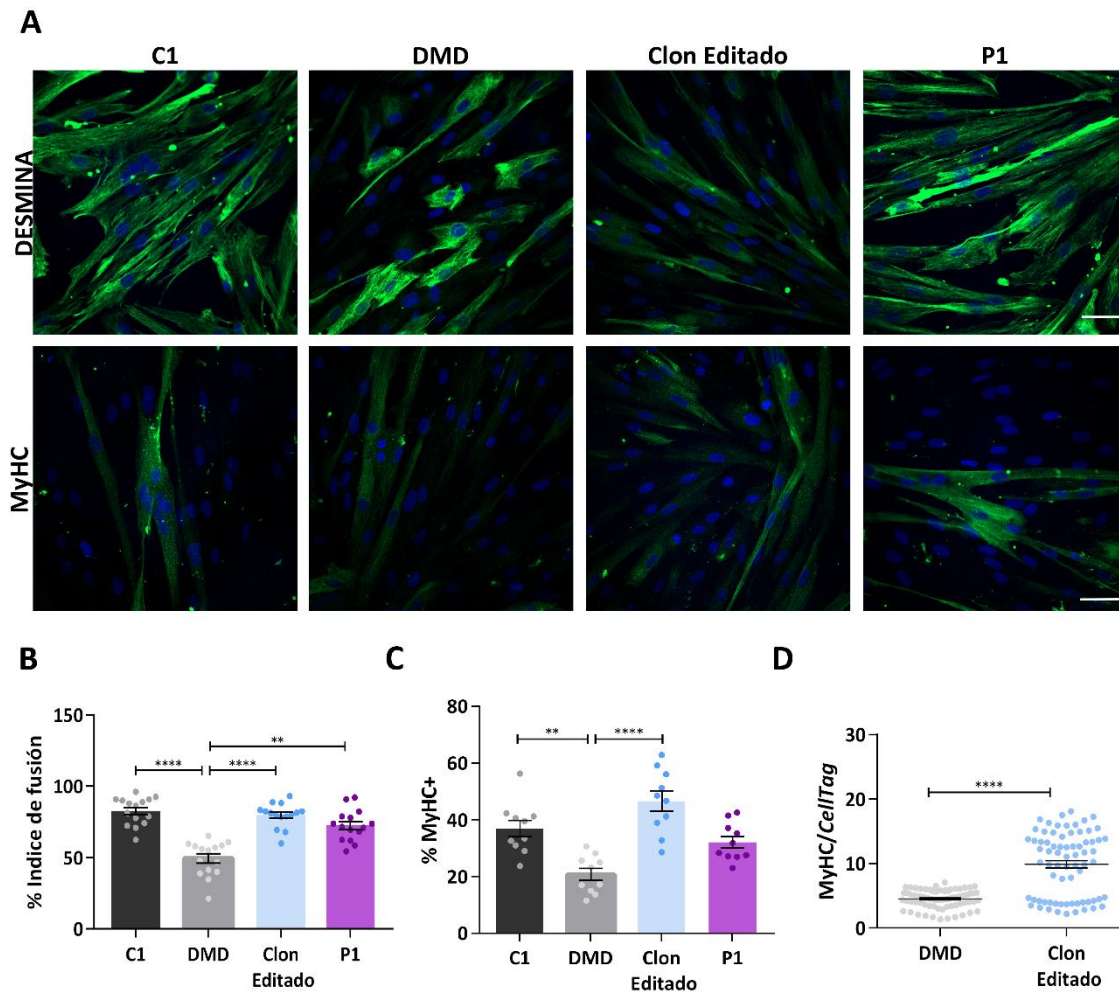


Figura 25. Los defectos en diferenciación de los mioblastos DMD se rescatan tras la introducción de la del45–55-D1 mediante edición génica. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal del inmunomarcaje de Desmina y MyHC (del inglés *myosin heavy chain*) (verde) en los miotubos diferenciados del Control 1 (C1), DMD, clon editado y del paciente P1 (P1). Los núcleos están marcados con DAPI (azul). Escala= 50 μ m. **(B)** Cuantificación del índice de fusión miogénico, utilizando las imágenes del marcaje de desmina (15 imágenes, 400-700 núcleos totales) en las líneas comentadas previamente. **(C)** Cuantificación del porcentaje de núcleos dentro de células MyHC+ en cada condición (10 imágenes, 300-500 núcleos totales). **(D)** Cuantificación de la expresión de MyHC mediante *in-cell western* en los miotubos diferenciados del clon editado y de la línea DMD no editada. **p-valor < 0,01; ****p-valor < 0,0001 de acuerdo con la prueba de Mann–Whitney U (B) y Kruskal–Wallis (C). Las gráficas representan la media \pm SEM (error estándar de la media).

DISCUSIÓN

El trabajo desarrollado en la presente tesis doctoral ha supuesto un estudio integral de la delección de los exones 45–55 en el gen *DMD*, analizando a fondo los fenotipos asociados y la caracterización genética de una extensa cohorte de sujetos con esta mutación; la búsqueda de mecanismos responsables de la variabilidad, así como su reproducción en una línea de mioblastos DMD mediante el sistema de edición CRISPR-Cas9. A continuación se procede a discutir los resultados obtenidos en cada uno de los tres objetivos específicos obtenidos.

1. ESTUDIO DE UNA COHORTE DE SUJETOS CON LA del45–55

En este estudio analizamos la cohorte más numerosa de pacientes distrofinopáticos portadores de la delección de los exones 45–55 en el gen *DMD*, mediante la aplicación de un protocolo clínico sistemático y la aplicación de un cuestionario estandarizado, todo ello gracias a la colaboración de diversos centros especializados en enfermedades neuromusculares de todo el país. Según la literatura, la del45–55 es una mutación poco frecuente, representando menos del 2% de los casos registrados en los registros y bases de datos de DMD/BMD (Aartsma-Rus *et al.*, 2006a; Bérout *et al.*, 2007). Hasta donde nosotros tenemos conocimiento, no existe ningún trabajo que presente una muestra similar o superior de casos con esta mutación, que permita realizar rigurosos análisis clínico–genéticos. De hecho, la información disponible hasta la fecha está basada en la publicación de un número limitado de casos, o descripciones anecdóticas del trabajo de Echigoya y colaboradores (Echigoya *et al.*, 2019), que llegó a recopilar información de un total de 48 casos, previamente publicados. Como podemos observar en la **Figura 26** nuestros datos discrepan en gran medida de la colección de Echigoya, en cuanto a la proporción de la incidencia de los distintos fenotipos. Particularmente, la muestra aquí descrita presenta una mayor tasa de cardiopatía y una considerable alta tasa de alteraciones cognitivas y de comportamiento.

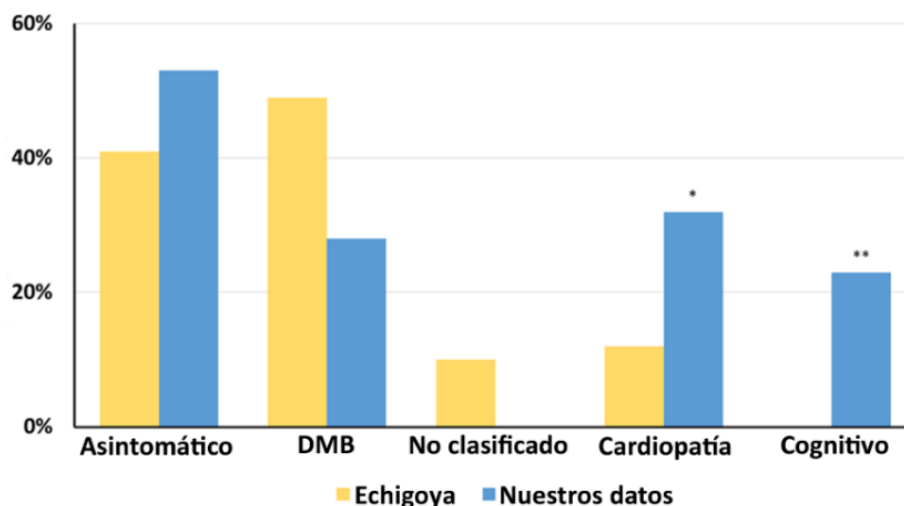


Figura 26. Comparación del perfil clínico de la del44–55 de la serie recogida en el trabajo de Echigoya (Echigoya *et al.*, 2019) respecto a nuestra cohorte. Nótese la presencia de una mayor proporción de sujetos asintomáticos/paucisintomáticos así como de casos de cardiopatía (*19% aislada y 13% asociada a fenotipo BMD) en nuestra serie. Las alteraciones cognitivas detectadas en nuestros casos siempre estaban asociadas a hiperCKemia, **; y éstas no se reportaron en el trabajo de Echigoya. La categoría “no clasificado” en la serie recogida por Echigoya corresponde a 5 sujetos con información clínica limitada.

Centrándonos en nuestra serie, cabe destacar algunos aspectos clínicos que nos pueden ayudar a dibujar la historia natural de esta mutación. En primer lugar, como norma general, la hiperCKemia y los síntomas pseudometabólicos pueden aparecer en la infancia temprana y pueden mantenerse como la única manifestación en un importante número de casos, incluso después de los 60 años. Segundo, aunque la incidencia del desarrollo de cardiopatía se sitúa en la media o el rango bajo de lo reportado en las series de DMB (Kaspar *et al.*, 2009, Bello *et al.*, 2016a), esta mutación presenta una elevada tendencia a desarrollar cardiopatía temprana así como la aparición de cardiopatía aislada. Tercero, esta mutación no parece ser tan benigna como se suponía debido que hasta el 40% de los pacientes con fenotipo DMB sufrieron pérdida de la deambulación o manifestaban un alto grado de discapacidad motora; mientras que un número sensible de casos desarrollaban cardiopatía severa requiriendo trasplante cardíaco, o sufrían problemas cardíacos agudos y muerte súbita, indicativo de la aparición de serias arritmias cardíacas. Además, la información recopilada de los casos afectos ya fallecidos, nos indica un acortamiento en la esperanza de vida de estos sujetos.

Finalmente, analizamos problemas relacionados con diversas áreas del aprendizaje y la función cognitiva, que son aspectos escasamente estudiados en sujetos con esta delección. En nuestra serie total, este tipo de alteraciones estaba presente en el 23% de

los sujetos, sin embargo, si nos centramos en la población pediátrica esta proporción se incrementa hasta el 90%, posiblemente debido a que este grupo pudo ser sujeto a una evaluación cognitiva mucho más rigurosa que la población adulta. Esa cifra se sitúa en el rango superior de lo reportado hasta ahora en las series de DMD y DMB (Ricotti *et al.*, 2016; Lambert *et al.*, 2020) y cabe la pena mencionar que estas manifestaciones escasamente han sido reportadas de forma aislada (North *et al.*, 1996).

El perfil cognitivo que presentan la mayoría de los pacientes evaluados, portadores de la mutación del45–55 está en sintonía con la literatura reportada en los estudios cognitivos llevados a cabo en sujetos DMD (Hinton *et al.*, 2007). La alta tasa de rasgos relacionados con el neurodesarrollo y el comportamiento también está en consonancia con lo publicado en los estudios realizados en series DMB (Young *et al.*, 2008; Lambert *et al.*, 2020). Sin embargo, nuestros datos discrepan con lo descrito en el trabajo de Young (Young *et al.*, 2008), donde observaron un perfil cognitivo distinto en los sujetos DMB, con completa preservación del IC y mayores alteraciones en la ejecución de las escalas verbales. Estas diferencias con los datos recogidos en nuestro estudio no pueden simplemente atribuirse a la utilización de distinta batería de test, sino también a diferencias en cuanto a la composición de la muestra. De hecho, los sujetos DMB evaluados por Young contienen distintas mutaciones, incluso algunos de ellos no están genéticamente caracterizados; mientras que todos los componentes de nuestra serie presentan la misma delección.

Otro de objetivo de este trabajo fue caracterizar los puntos de rotura intrónicos en sujetos portadores de la del45–55 y establecer su implicación sobre la variabilidad clínica. Debido al gran tamaño de los intrones 44 y 55, decidimos realizar este análisis mediante secuenciación masiva utilizando un panel de genes dirigido, diseñado para este propósito y complementarlo mediante secuenciación Sanger. Pudimos comprobar que esta aproximación es sumamente resolutive y precisa (llegando a nivel de nucleótido), comparado con las técnicas utilizadas previamente como realización de múltiples PCRs (Miyazaki *et al.*, 2009) o el uso de array-CGH (del inglés, *comparative genoma hybridization*) (Ishmukhametova *et al.*, 2012). Por otra parte, la nueva generación de secuenciación masiva (*third-generation long-read sequencing*) también ha demostrado ser capaz de identificar puntos de rotura a lo largo del intrón 44 de *DMD* (Geng *et al.*, 2021).

En conjunto se identificaron diez delecciones con puntos de rotura específicos en los intrones 44 y 55. El análisis de las secuencias cercanas a los puntos de rotura intrónicos de nuestros casos índice reveló la presencia de elementos repetitivos que

podrían promover inestabilidad genómica pero no se observó la presencia de homología extensiva (**Tabla A8, Anexo II**), descartando la recombinación homóloga no alélica (NAHR del inglés *non-allelic homologous recombination*) como el mecanismo responsable de estos reordenamientos, en consonancia con otros estudios similares en el gen *DMD* (McNaughton *et al.*, 1998; Nobile *et al.*, 2002, Sironi *et al.*, 2003b; Miyazaki *et al.*, 2009; Marey *et al.*, 2016; Geng *et al.*, 2021). Por otro lado, sí que encontramos en la zona cercana a los puntos de rotura de todas las deleciones, elementos que pueden producir roturas de doble cadena en el ADN (**Tabla A8, Anexo II y Figura A1, Anexo III**). Además, observamos en la zona de unión del neo-intrón 44–55 distintos rasgos que nos pueden indicar los mecanismos de reparación involucrados en estos reordenamientos: el NHEJ, debido a la presencia de pequeñas inserciones; unión de extremos mediada por microhomología (MMEJ, del inglés *micro-homology mediated end joining*) debido a la presencia de pequeñas microhomologías; replicación dependiente de recombinación mediada por microhomología (MMRDR, del inglés *microhomology-mediated replication-dependent*) e inicio aberrante de los orígenes de replicación y rescate de replicación incompleto, debido a la presencia de microhomología y la inserción en tándem de nucleótidos homólogos a la secuencia de referencia adyacente (**Tabla A8, Anexo II**). Conjuntamente todas estas observaciones nos muestran que la mutación del45–55 no se origina por un único mecanismo, sino que intervienen una variedad de factores que inducen inestabilidad y rotura del ADN, además de varios mecanismos genómicos de reparación (Marey *et al.*, 2016; Ling *et al.*, 2020; Geng *et al.*, 2021).

Centrándonos en la localización de los distintos puntos de rotura, no se encontró una zona específica que predisponga a su recurrencia, en concordancia con otro estudio que también analiza la los puntos de rotura en una serie de sujetos con la del45–55 (Gargaun *et al.*, 2021). De hecho, el análisis de haplotipos reveló que todas las deleciones con puntos de rotura intrónicos específicos compartidos por varios casos índice eran producto de distintas mutaciones fundadoras. La única excepción fue el grupo D1, compuesto por nueve casos índice, y en el que se identificaron dos subgrupos de sujetos con distintos haplotipos, indicando que esta deleción específica se originó a partir de dos eventos mutacionales independientes. La alta tasa de eventos fundadores que observamos en nuestra serie contrasta considerablemente con su extraña aparición en la población de sujetos con DMB, donde solo tenemos constancia de dos casos en los que se haya producido este evento (Gurvich *et al.*, 2009; Pons *et al.*, 2017). En cualquier caso, este fenómeno es indicativo de la preservación de la capacidad genésica de esta mutación (favorecida por la presentación tardía de los síntomas graves). Por

otro lado, esta observación nos ha permitido disponer de grupos con el suficiente tamaño muestral para evaluar el efecto de los distintos puntos de rotura intrónicos sobre las variables clínicas analizadas.

2. ANÁLISIS DE FACTORES MODIFICADORES DEL FENOTIPO

En la búsqueda de los potenciales factores modificadores del fenotipo evaluamos tanto distintos factores en *cis* como en *trans*.

Por un lado, la del45–55 da lugar a una repetición híbrida de la espectrina. Como hemos comentado, éstas reconstituyen la estructura nativa de triple hélice. Diversos trabajos se han centrado en analizar la severidad clínica en series de pacientes DMB con mutaciones en pauta que involucran al dominio central de la distrofina. Entre estas deleciones, aquellas que presentan los fenotipos más favorables (como las equiparables a las del salto del exón 51) son las que mantienen la estructura filamentosa de la proteína como es el caso de la del45–55. Por el contrario, aquellas deleciones que originan repeticiones de espectrina fraccionales en la proteína resultante (como las del45–47 y la del45–49) están asociadas a una mayor severidad clínica (Kaspar *et al.*, 2009; Findlay *et al.*, 2015; Nicolas *et al.*, 2015, Bello *et al.*, 2016a; Nakamura *et al.*, 2017).

Por otro lado, hasta la fecha existen escasos trabajos que analicen la variabilidad interna o potenciales factores modificadores de la severidad enfocados en sujetos DMB con una única mutación. Entre ellos, cabe comentar el trabajo llevado a cabo por Gentil y colaboradores donde observaron que la deslocalización sarcomérica de nNOS μ en biopsias musculares de sujetos con la mutación del45–55 se correlacionaba con una mayor severidad (Gentil *et al.*, 2012). En otro interesante estudio sobre biopsias musculares de sujetos DMB con la mutación del45–47, no observaron una correlación entre los niveles de distrofina y la severidad o el estado histopatológico de éstos; y aportaron datos que concordaban con un efecto umbral de niveles de distrofina (alrededor del 10% de niveles normales), indicando que pequeñas cantidades son suficientes para presentar fenotipos más leves (van den Bergen *et al.*, 2014). Respecto a este último punto, aunque el número de biopsias musculares analizadas en nuestro estudio era limitado ($n=9$), eran representativas de sujetos pertenecientes a distintos grupos de deleción y con distintos grados de severidad y todas ellas mostraron altos niveles de expresión de distrofina (67%–106%), sin encontrar una correlación con la gravedad fenotípica **Figura 18B**.

En nuestro análisis del efecto de los distintos puntos de rotura intrónicos, sólo encontramos una influencia significativa del grupo de deleción D5 sobre la severidad muscular y el desarrollo de cardiopatía. En una primera instancia, el análisis del ARN de un sujeto de este grupo mostró la presencia de un transcrito donde se había producido

un salto adicional de los exones 56 y 57, que podría haber sido promovido por cambios en las secuencias de *splicing* debido a estos puntos de rotura específicos (Tuffery-Giraud *et al.*, 2017). Sin embargo, posteriormente observamos que este transcrito estaba presente en todas las muestras disponibles (co-expresándose con el transcrito esperable tras la del45–55) pero en niveles marginales, lo que nos hizo descartar su implicación en la patogenicidad observada. Eventos alternativos de salto de exón en el gen *DMD* se han detectado previamente (incluyendo eventos de salto de múltiples exones) en distintas condiciones patológicas tanto en *DMD* y *DMB* como en otras distrofias no relacionadas con el gen *DMD*, como distrofia miotónica o distrofias originadas por mutaciones en *DYSF* o *CAPN3* (Sironi *et al.*, 2002, 2003a). Por otra parte, estos eventos también se han detectado en muestras de sujetos sanos (tanto en músculo esquelético como en mioblastos), entre los que interesantemente se encontraron eventos de salto múltiple de los exones 45–55 y 45–57, confirmado también por el estudio de los circRNA resultantes (del inglés *circular RNA*) (Aartsma-Rus *et al.*, 2006b; Suzuki *et al.*, 2016). Posteriormente, estudios mediante secuenciación masiva de ARN, demostraron que los eventos de salto de exón alternativos en el gen *DMD* (y particularmente los de múltiples exones) en condiciones sanas eran muy poco frecuentes y que la mayoría de los 79 exones eran constitutivamente procesados (Bougé *et al.*, 2017). En nuestro caso, el hecho que el transcrito del45–57 se encontrara en todas las muestras analizadas y con una expresión residual, nos sugiere que presumiblemente sea un subproducto derivado de eventos de salto multiexónico promovido por intrones post-transcripcionales (como los intrones 44 y 57) (Suzuki *et al.*, 2016). Además, por otra parte, no detectamos la presencia de ningún pseudoexón en las muestras de músculo analizadas, a pesar de las predicciones *in silico* favorables (**Tabla A10, Anexo II**).

Los distintos puntos de rotura en los intrones 44 y 55 de las diez delecciones identificadas en este trabajo, tienen distinto impacto sobre las secuencias de los lncRNAs ahí localizados (lncRNA 44s, 44s2, 55s y 55as), dando lugar a distintos patrones de preservación. En nuestro análisis no detectamos ningún efecto de los distintos patrones de lncRNA sobre la severidad clínica. Por ejemplo, en el trabajo llevado a cabo por Gargaun y colaboradores (Gargaun *et al.*, 2021) encontraron que el patrón de lncRNA PNNN (el cual solo preservaba el lncRNA 44s) tenía un efecto protector, sin embargo nosotros no pudimos confirmarlo puesto que este patrón estaba presente en un único sujeto (P19, grupo D6) (**Tabla A9, Anexo II**). Sin embargo, estas especulaciones deberían confirmarse a nivel de ARN, evaluando el efecto de los

distintos niveles de expresión de los lncRNAs sobre la transcripción de la distrofina (Bovolenta *et al.*, 2012).

Similarmente, de manera aproximativa, evaluamos la consecuencia de la localización de los puntos de rotura en el intrón 44 sobre la preservación del promotor de la isoforma Dp140. Como hemos comentado, la deficiencia de esta isoforma se han asociado con el riesgo de sufrir alteraciones cognitivas así como anormalidades cerebrales estructurales y funcionales (Felisari *et al.*, 2000; Doorenweerd *et al.*, 2014), pero nosotros no encontramos ninguna relación en los pacientes correctamente evaluados. Sin embargo, esta interpretación puede ser polémica debido a que en todos los casos, la del45–55 elimina el sitio de inicio de la traducción localizado en el exón 51. Bardoni y colaboradores (Bardoni *et al.*, 1999) propusieron la existencia de sitios de inicio alternativos localizados entre los exones 52 y 56 (siendo este último el único disponible en la del45–55); aunque esta hipótesis no ha sido experimentalmente demostrada.

Por último, en este objetivo se trató de evaluar la implicación de ciertos factores modificadores en *trans* que expliquen la variabilidad clínica observada.

Por un lado, el efecto de ciertos modificadores genéticos de la severidad ha sido ampliamente estudiado en sujetos con DMD, donde se han identificado algunos polimorfismos o haplotipos de riesgo asociados con una peor progresión de la enfermedad (con la edad de pérdida de la deambulación particularmente). Entre los genes estudiados se encuentran genes implicados en la respuesta inflamatoria a daño muscular, regeneración y fibrosis (como los aquí estudiados *SPP1* y *LTBP4*); o implicados en la fuerza y resistencia muscular (como *ACTN3*) (Bello and Pegoraro, 2019). Sin embargo, el papel de estos modificadores todavía no ha sido estudiado en DMB ni particularmente en una serie concreta de sujetos con la misma mutación en *DMD*. En nuestro trabajo estudiamos de manera exploratoria la influencia sobre la clínica de los polimorfismos en los tres genes comentados anteriormente, no observando ningún efecto sobre la severidad muscular. Por contra, sí que encontramos un efecto estadísticamente significativo de la ausencia del haplotipo IAAM/IAAM en *LTBP4* con la presencia de cardiopatía. Una de las principales limitaciones de este estudio es el escaso número de sujetos incluidos, lo que resta potencia al análisis estadístico realizado (n= 33; 23 índice y 10 secundarios adicionales), por lo que sería interesante realizar un esfuerzo cooperativo internacional y conseguir analizar un mayor número de sujetos portadores de la del45–55, lo que permitiría confirmar este hallazgo o descubrir

nuevos factores en *trans* aún no identificados, aprovechando la mayor accesibilidad a la secuenciación completa del genoma.

Por otro lado, a pesar de que encontramos en algunos de los pacientes índice secuenciados mutaciones concurrentes en genes relacionados con miopatías que podrían actuar como agravantes (Kerst *et al.*, 2000), no encontramos ninguna manifestación clínica compatible con éstas en ningún caso.

3. APROXIMACIÓN AL MODELO CELULAR

A pesar de que los factores que originan la variabilidad fenotípica asociada a la del45–55 en *DMD* prácticamente aún permanecen sin identificar, esta delección sigue siendo un atractivo modelo para la fatal *DMD*, porque la proteína resultante mantiene su estructura filamentosa y la funcionalidad (conformación híbrida) y por el elevado número de sujetos que podrían beneficiarse. Además, sería interesante a la hora de desarrollar la inducción de la del45–55 como terapia, tener en cuenta los factores localizados en los intrones 44 y 55 previamente analizados (lncRNAs, Dp140 y Dp116).

En este objetivo, utilizando el sistema de edición génica CRISPR-Cas9 decidimos replicar la del45–55 presente del subgrupo D1, con sus puntos de rotura intrónicos específicos, para restaurar la pauta de lectura y la expresión de distrofina de una línea de mioblastos inmortalizados *DMD*. Aunque en este subgrupo también encontramos formas severas y la proporción de sujetos asintomáticos es similar a la de la serie completa (alrededor del 50%) (**Figura 13B**), es el más numeroso (con 25 sujetos) y está compuesto por 9 casos índice independientes, producto de dos efectos fundadores distintos (**Figura 17**); indicativo de la preservación de la fertilidad de esta delección específica.

La delección D1 es una delección de 457,3 kb y preserva los promotores de las isoformas de la distrofina Dp140 y Dp116. La deficiencia de la isoforma Dp140 ha sido asociada con el desarrollo de alteraciones cognitivas y del neurodesarrollo (Felisari *et al.*, 2000; Doorenweerd *et al.*, 2014), aunque como hemos comentado previamente, esta hipótesis en el contexto de la del45–55 es difícil de interpretar. Por otro lado conserva los lncRNA 44 y 44s2, descritos como favorables por Gargaun y colaboradores (Gargaun *et al.*, 2021).

En los trabajos llevados a cabo por Ousterout y Young (Ousterout *et al.*, 2015; Young *et al.*, 2016) también utilizaron el sistema CRISPR-Cas9 para introducir la del45–55 con el fin de recuperar la expresión de distrofina. A diferencia de nuestro trabajo, estas delecciones no han sido observadas de forma natural en pacientes y son considerablemente mayores que en nuestro caso (688 kb y 725 kb respectivamente), con la justificación de poder ser aplicable a un mayor número de sujetos. Sin embargo, el inconveniente de éstas es que alteran las secuencias reguladoras localizadas en los intrones 44 y 55, cuya conservación podría ser relevante para el futuro desarrollo de esta delección como terapia para *DMD*.

En este trabajo se consiguió introducir satisfactoriamente la mutación del45–55-D1 en mioblastos DMD y aislar cultivos clonales con la delección. A pesar de esto, el posterior análisis mediante secuenciación masiva reveló que las eficiencias de corte de los dos gRNAs elegidos eran limitada, como previamente habíamos observado (Soblechero-Martín *et al.*, 2021). Esta baja eficiencia puede deberse en parte a la dificultad de transfección de los mioblastos (Ousterout *et al.*, 2015; Wojtal *et al.*, 2016), reflejándose en que solamente menos del 15% de los mioblastos transfectados habían incorporado los plásmidos que contenían los elementos CRISPR-Cas9 y el reportero GFP. Alternativamente, otra estrategia que en la actualidad es frecuentemente usada y consiste en introducir directamente el sistema CRISPR-Cas9 en forma de ribonucleoproteína (RNP, la proteína Cas9 asociada al gRNA sintetizado) sin la necesidad de tener que expresar estos elementos con un vector plasmídico. Esta estrategia ha demostrado mayores eficiencias de corte, así como menores efectos *off-targets* debido a la menor vida media del complejo (traducido en un menor periodo de actividad) en contraste con la expresión plasmídica de los elementos CRISPR-Cas9 (Kim *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2021). De hecho, con nuestra experiencia personal con las RNPs (para otros *loci* pero también en mioblastos inmortalizados) hemos comprobado esta ventaja, ya que hemos obtenido eficiencias de corte superiores al 87%.

A pesar del uso de plásmidos, no encontramos ningún efecto *off-target* en los datos analizados de secuenciación masiva, aunque sí que observamos la presencia de sustituciones. La presencia de estas sustituciones es difícil de interpretar, ya que aparecen incluso en las lecturas correspondientes a células no transfectadas y no se localizan preferentemente cerca del sitio estimado de corte de la Cas9 (**Figura A2, Anexo III**). Curiosamente, en todas los casos las sustituciones encontradas son transiciones (A>G o T>C) lo que concuerda con el error típico de la polimerasa Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (McInerney *et al.*, 2014) que es la que se ha empleado para este estudio. Además, la frecuencia de las sustituciones está por debajo del límite de error teórico de la polimerasa utilizada (**Tabla A12, Anexo II; Figura A2, Anexo III**) (McInerney *et al.*, 2014).

El análisis mediante secuenciación Sanger en el clon utilizado en la caracterización funcional no identificó ningún efecto *off-target*.

Por otro lado, sería conveniente realizar los análisis de *off-targets* mediante métodos no sesgados como la secuenciación completa del genoma por secuenciación masiva, previo a la aplicación del sistema CRISPR-Cas9 en clínica.

En el presente objetivo demostramos que la introducción de la mutación del45–55-D1 mediante CRISPR-Cas9 sobre una línea de mioblastos DMD es capaz de restaurar la pauta de lectura de *DMD* y la expresión de distrofina.

La generación de grandes deleciones, como este caso, tienen un gran impacto sobre la arquitectura genómica ya que pueden acercar o exponer secuencias de *splicing* que de forma natural se encontrarían muy alejadas; o eliminar ciertas secuencias reguladoras de *splicing* como potenciadores o silenciadores. Como consecuencia pueden originar alteraciones del proceso de *splicing* como la inclusión de pseudoexones o la producción de eventos de saltos adicionales de exones, que en conjunto pueden conllevar a la generación de transcritos con la pauta de lectura alterada y evitar la expresión de distrofina (o en el caso de que generen transcritos con la pauta conservada, dar lugar a distrofina que pueda presentar menor funcionalidad) (Tuffery-Giraud *et al.*, 2017). Por ello, previo a la aplicación de la del45–55 como terapia para DMD, es importante caracterizar los puntos de rotura intrónicos y asegurarse de que no ocurren estas alteraciones. En nuestro caso, en las muestras de ARN de músculo analizadas pertenecientes al subgrupo D1, no observamos ninguna alteración de *splicing* salvo la presencia de un transcrito concurrente con la del45–57 que estaba presente indistintamente en todas las muestras de distintos subgrupos de forma muy marginal, por lo que descartamos su posible implicación patogénica. Debido a los requisitos de selección de los gRNAs, los puntos de rotura intrónicos en el clon editado difieren ligeramente de los encontrados en los sujetos del subgrupo D1; sin embargo, al analizar su ARN no observamos ninguna alteración (**Figura 23A**). Tampoco encontramos la presencia del transcrito del45–57 por ddPCR, detectado con una mínima expresión en las biopsias musculares analizadas en el objetivo 2. Además, mediante ddPCR observamos el aumento de expresión de distrofina respecto a las células DMD no transfectadas siendo incluso superior que en los mioblastos del paciente del grupo D1 (**Figura 23B**).

El análisis de la recuperación de distrofina a nivel proteico lo realizamos mediante distintas técnicas. Mediante inmunofluorescencia observamos que la distrofina expresada en los miotubos del clon editado se localizaba correctamente (**Figura 24A**). También observamos su aumento de expresión respecto a los miotubos DMD no editados mediante la técnica de *in-cell western* (**Figura 24B**). Esta técnica permite realizar una cuantificación más precisa, sensible y reproducible; además de no estar sujeta a los problemas derivados de la cuantificación de proteínas de gran tamaño por medio de técnica de *western blot* estándar; y permite la incorporación de un mayor número de replicados utilizando un menor número de células (Ruiz-Del-Yerro *et al.*,

2018; Soblechero-Martín *et al.*, 2021). Además, también cuantificamos la expresión de distrofina del clon editado mediante *western blot*, observando la recuperación de proteína con un peso molecular inferior a la presentada por 3 líneas de mioblastos control (**Figura 24C**). En este caso, decidimos incluir varias líneas control cuya señal fue agrupada para reducir la variabilidad, debido a que como previamente diversos estudios han reportado, los niveles de distrofina pueden variar incluso entre distintos individuos sanos (Arechavala-Gomez *et al.*, 2009).

Adicionalmente, evaluamos el efecto de la introducción de la del45–55-D1 sobre el proceso de diferenciación miogénica, observando un rescate en la capacidad de fusión de los miotubos, así como del número de miotubos MyHC⁺ y la expresión de este marcador, respecto a las células DMD no editadas (**Figura 25**).

En general, aunque todavía se desconoce las causas de la variabilidad fenotípica alrededor de la del45–55 en *DMD*, como prueba de concepto, evaluamos si fuera ventajoso mimetizar la delección con los puntos de rotura intrónicos específicos de un subgrupo de pacientes con esta mutación previamente analizados, como una posible aproximación terapéutica para *DMD*. Además, confirmamos la capacidad del sistema de edición génica CRISPR-Cas9 para introducir delecciones a medida, así como para recuperar la expresión de distrofina, así como los fenotipos alterados. Por otro lado, como previamente demostramos, el sistema CRISPR-Cas9 puede servir de gran ayuda para generar modelos celulares que de otra forma serían muy difícil de obtener (debido a la necesidad de extraer mioblastos primarios a partir de biopsia muscular, o que no existan sujetos accesibles válidos para nuestro objetivo) (Soblechero-Martín *et al.*, 2021).

A pesar de que la edición génica todavía necesita superar algunos inconvenientes previamente comentados (problemas *off-target*, respuesta inmune frente a la nucleasa o vector, distribución...) supondría un salto de nivel frente a las estrategias existentes, debido a que los cambios producidos a nivel genómico son permanentes y no sería necesario su administración periódica. Además, es esencial conseguir métodos para administrar eficientemente el sistema CRISPR-Cas9 a las células satélite, como el uso de serotipos específicos de AAV con un mayor tropismo hacia estas células o la nueva generación de vectores (MyoAAV); favoreciendo de esta forma la regeneración sostenida con células que expresan distrofina (Kwon *et al.*, 2020; Tabebordbar *et al.*, 2021). De hecho, importantes avances *in vivo* se han obtenido para el tratamiento de *DMD*, demostrando una recuperación de la expresión de distrofina tanto en músculo esquelético como cardíaco incluso un año tras su administración (Nelson *et al.*, 2016,

2019; Amoasii *et al.*, 2018). Sin embargo, también hay que tener en cuenta las posibles implicaciones éticas que conlleva la edición del genoma humano, especialmente en la línea germinal y embriones. De hecho, este tema ha ganado relevancia tras el nacimiento en China de unas gemelas modificadas genéticamente, lo que produjo (a parte del shock internacional de la comunidad científica) la firma de una moratoria para retrasar la aplicación de la edición génica en las líneas germinales que impliquen la posterior transferencia del embrión a una persona (Lander *et al.*, 2019).

En conclusión, el trabajo desarrollado mediante esta tesis doctoral confirma que la delección de los exones 45–55 en el gen *DMD* es una mutación capaz de segregar una gran cantidad de casos asintomáticos o benignos y es responsable de diversos efectos fundadores. Sin embargo, también puede dar lugar a casos graves con importantes limitaciones funcionales, serias complicaciones cardíacas y alteraciones cognitivas, todo ello ocasionando cierto acortamiento en la esperanza de vida. A pesar de la extensiva búsqueda de factores modificadores realizada en este estudio, los mecanismos patológicos responsables de la variabilidad permanecen en gran parte desconocidos. La identificación de estos mecanismos, así como su resolución serviría para consolidar a esta mutación como uno de los modelos de terapia génica para DMD con mayor potencial, comparable a las terapias de salto único exón, pero con la ventaja de ser aplicable a un mayor número de sujetos con distintas mutaciones en DMD. Además, la proteína resultante mantiene los dominios esenciales y su funcionalidad en gran medida, un importante aspecto a resolver en la terapia de adición génica mediante μ Dys (Duan, 2018; Verhaart and Aartsma-Rus, 2019). Sin embargo, para que este modelo se convierta en una alternativa terapéutica real, es necesario superar los puntos oscuros del salto muletixónico, ya sea mediante el uso de cócteles de AONs o mediante el sistema de edición génica CRISPR-Cas9, como previamente hemos comentado.

CONCLUSIONES

Las conclusiones que se obtienen del trabajo llevado a cabo en la presente tesis doctoral son las siguientes:

1. La delección de los exones 45–55 en el gen *DMD* (del45–55) está asociada a formas de distrofinopatía asintomáticas o con síntomas menores (52% de la serie).
2. La del45–55 también ocasiona una miopatía tipo Becker que puede llegar a ser grave con pérdida de deambulación, en algunos de los casos a edad tardía.
3. La del45–55 puede originar complicaciones cardíacas, por un lado, en forma de cardiopatía dilatada que puede ser grave y requerir trasplante cardíaco; o causar trastornos de la conducción o del ritmo cardíaco que demandan la implantación de marcapasos o causan la muerte súbita.
4. En una notable proporción de casos, existe una disociación entre las alteraciones cardíacas y la afectación muscular.
5. En su conjunto la del45–55 es responsable de una apreciable reducción de la esperanza de vida.
6. Se han identificado alteraciones cognitivas, del comportamiento y del neurodesarrollo en la mayoría de los pacientes pediátricos. Estas alteraciones pueden ocurrir como manifestación independiente, aunque siempre asociada a hiperCKemia.
7. Un panel de genes de secuenciación masiva diseñado *ad hoc* para este estudio demostró ser resolutivo para identificar de forma precisa los puntos de rotura en los intrones 44 y 55 del gen *DMD*.
8. El análisis de las secuencias cercanas a los puntos de rotura reveló que la del45–55 se origina como consecuencia de la combinación de diversos elementos promotores de inestabilidad y rotura de ADN junto con la intervención de distintos mecanismos de reparación genómica.
9. Se identificaron cinco efectos fundadores (uno recurrente) asociados a esta delección localizados en diversas regiones españolas, indicativo de la preservación de la capacidad genésica. Este hecho nos ha permitido realizar correlaciones clínico-genéticas que de otra manera hubiesen sido inalcanzables.

10. Los puntos de rotura intrónicos identificados no alteran el patrón de *splicing*, quedando excluida su influencia como factor causante de la variabilidad en la expresión clínica.
11. La alteración de los elementos reguladores localizados en los intrones 44 y 55 (lncRNA y Dp140) por los distintos puntos de rotura tampoco contribuyeron *a priori* a la variabilidad clínica observada.
12. Los niveles proteicos de distrofina en las biopsias de sujetos del45–55 analizadas no justificaban la variabilidad clínica observada.
13. Entre los potenciales factores modificadores en *trans* analizados, la ausencia del haplotipo beneficioso en *LTBP4* podría condicionar la presencia de cardiopatía.
14. El sistema de edición CRISPR-Cas9 es capaz de reproducir la del45–55 del subgrupo D1 en una línea de mioblastos DMD.
15. La generación de la del45–55 mediante CRISPR-Cas9 no produce cambios significativos en las potenciales regiones *off-targets* asociadas a las gRNA_44.1 y 55.2.
16. La introducción de la del45–55 mediante CRISPR-Cas9 en mioblastos DMD recupera la expresión de distrofina y rescata los defectos en la diferenciación de esta línea celular.

BIBLIOGRAFÍA

Aartsma-Rus A, Van Deutekom JCT, Fokkema IF, Van Ommen G-JB, Den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: An overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 2006; 34: 135–44.

Aartsma-Rus A, Fokkema I, Verschuuren J, Ginjaar I, van Deutekom J, van Ommen G-J, et al. Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat* 2009; 30: 293–9.

Aartsma-Rus A, Kaman WE, Weij R, den Dunnen JT, van Ommen G-JB, van Deutekom JCT. Exploring the Frontiers of Therapeutic Exon Skipping for Duchenne Muscular Dystrophy by Double Targeting within One or Multiple Exons. *Mol Ther* 2006; 14: 401–7.

Alderton JM, Steinhardt RA. How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10: 268–72.

Alderton JM, Steinhardt RA. Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *J Biol Chem* 2000; 275: 9452–60.

Amann KJ, Renley BA, Ervasti JM. A cluster of basic repeats in the dystrophin rod domain binds F-actin through an electrostatic interaction. *J Biol Chem* 1998; 273: 28419–23.

Amosii L, Hildyard JCW, Li H, Sanchez-Ortiz E, Mireault A, Caballero D, et al. Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* (80-) 2018; 362: 86–91.

Anderson JT, Rogers RP, Jarrett HW. Ca²⁺-calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *J Biol Chem* 1996; 271: 6605–10.

Anthony K, Arechavala-Gomez V, Ricotti V, Torelli S, Feng L, Janghra N, et al. Biochemical Characterization of Patients With In-Frame or Out-of-Frame DMD Deletions Pertinent to Exon 44 or 45 Skipping. *JAMA Neurol* 2014; 71: 32.

Anthony K, Arechavala-Gomez V, Taylor LE, Vulin A, Kaminoh Y, Torelli S, et al. Dystrophin quantification: Biological and translational research implications. *Neurology* 2014; 83: 2062–9.

Anthony K, Cirak S, Torelli S, Tasca G, Feng L, Arechavala-Gomez V, et al. Dystrophin quantification and clinical correlations in Becker muscular dystrophy: Implications for clinical trials. *Brain* 2011; 134: 3544–56.

Aoki Y, Yokota T, Nagata T, Nakamura A, Tanihata J, Saito T, et al. Bodywide skipping of exons 45–55 in dystrophic mdx52 mice by systemic antisense delivery. *Proc Natl Acad Sci* 2012; 109: 13763–8.

Aránega AE, Lozano-velasco E, Rodriguez-outeiriño L, Ramírez de Acuña F, Franco D, Hernández-torres F. MiRNAs and Muscle Regeneration: Therapeutic Targets in Duchenne Muscular Dystrophy. *Int J Mol Sci* 2021; 22[cited 2022 Oct 10] Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33921834/>

Arechavala-Gomez V, Kinali M, Feng L, Brown SC, Sewry C, Morgan JE, et al. Immunohistological intensity measurements as a tool to assess sarcolemma-associated protein expression. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2009; 36: 265–74.

Arechavala-Gomez V, Kinali M, Feng L, Guglieri M, Edge G, Main M, et al. Revertant fibres and dystrophin traces in Duchenne muscular dystrophy: Implication for clinical trials. *Neuromuscul Disord* 2010; 20: 295–301.

- Aslesh T, Maruyama R, Yokota T. Skipping Multiple Exons to Treat DMD—Promises and Challenges. *Biomedicines* 2018; 6: 1.
- Bae S, Park J, Kim J-S. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* 2014; 30: 1473–5.
- Bardoni A, Felisari G, Sironi M, Comi G, Lai M, Robotti M, et al. Loss of Dp140 regulatory sequences is associated with cognitive impairment in dystrophinopathies. *Neuromuscul Disord* 2000; 10: 194–9.
- Bardoni A, Sironi M, Felisari G, Comi GP, Bresolin N. Absence of brain Dp140 isoform and cognitive impairment in Becker muscular dystrophy. *Lancet* 1999; 353: 897–8.
- Beggs AH, Hoffman EP, Snyder JR, Arahata K, Specht L, Shapiro F, et al. Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 54–67.
- 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.
- Bello L, Kesari A, Gordish-Dressman H, Cnaan A, Morgenroth LP, Punetha J, et al. Genetic modifiers of ambulation in the cooperative international Neuromuscular research group Duchenne natural history study. *Ann Neurol* 2015; 77: 684–96.
- Bello L, Pegoraro E. The “Usual Suspects”: Genes for Inflammation, Fibrosis, Regeneration, and Muscle Strength Modify Duchenne Muscular Dystrophy. *J Clin Med* 2019; 8: 649.
- Bello L, Punetha J, Gordish-Dressman H, Giri M, Hoffman EP, Barp A, et al. Association Study of Exon Variants in the NF- κ B and TGF β Pathways Identifies CD40 as a Modifier of Duchenne Muscular Dystrophy. *Am J Hum Genet* 2016; 99: 1163–71.
- van den Bergen JC, Hiller M, Böhringer S, Vijfhuizen L, Ginjaar HB, Chaouch A, et al. Validation of genetic modifiers for Duchenne muscular dystrophy: a multicentre study assessing SPP1 and LTBP4 variants. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2015; 86: 1060–5.
- van den Bergen JC, Wokke BH, Janson AA, van Duinen SG, Hulsker MA, Ginjaar HB, et al. Dystrophin levels and clinical severity in Becker muscular dystrophy patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014; 85: 747–53.
- Bérout C, Tuffery-Giraud S, Matsuo M, Hamroun D, Humbertclaude V, Monnier N, et al. Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mutat* 2007; 28: 196–202.
- Bhat HF, Adams ME, Khanday FA. Syntrophin proteins as Santa Claus: Role(s) in cell signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70: 2533–54.
- Bhosle RC, Michele DE, Campbell KP, Li Z, Robson RM. Interactions of intermediate filament protein synemin with dystrophin and utrophin. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346: 768–77.
- Blake DJ, Tinsley JM, Davies KE, Knight AE, Winder SJ, Kendrick-Jones J. Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 133–5.
- Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* 2002; 82: 291–329.

- Bodensteiner JB, Engel AG. Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: A study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. *Neurology* 1978; 28: 439–46.
- Bonne G, Rivier F, Hamroun D. The 2018 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscul Disord* 2017; 27: 1152–83.
- Bougé A-L, Murauer E, Beyne E, Miro J, Varilh J, Taulan M, et al. Targeted RNA-Seq profiling of splicing pattern in the DMD gene: exons are mostly constitutively spliced in human skeletal muscle. *Sci Rep* 2017; 7: 39094.
- Bovolenta M, Erriquez D, Valli E, Brioschi S, Scotton C, Neri M, et al. The DMD Locus Harbours Multiple Long Non-Coding RNAs Which Orchestrate and Control Transcription of Muscle Dystrophin mRNA Isoforms. *PLoS One* 2012; 7: e45328.
- Buono R, Vantaggiato C, Pisa V, Azzoni E, Bassi MT, Brunelli S, et al. Nitric Oxide Sustains Long-Term Skeletal Muscle Regeneration by Regulating Fate of Satellite Cells Via Signaling Pathways Requiring Vangl2 and Cyclic GMP. *Stem Cells* 2012; 30: 197–209.
- Burghes AHM, Logan C, Hu X, Belfall B, Worton RG, Ray PN. A cDNA clone from the Duchenne/Becker muscular dystrophy gene. *Nature* 1988; 328: 434–7.
- Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol* 2010; 9: 77–93.
- Bushby KMD. Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. *Brain* 1999; 122: 1403–20.
- Bushby KMD, Gardner-Medwin D. The clinical, genetic and dystrophin characteristics of Becker muscular dystrophy - I. Natural history. *J Neurol* 1993; 240: 98–104.
- Byers TJ, Lidov HGW, Kunkel LM. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat Genet* 1993; 4: 77–81.
- Cacchiarelli D, Incitti T, Martone J, Cesana M, Cazzella V, Santini T, et al. MiR-31 modulates dystrophin expression: New implications for Duchenne muscular dystrophy therapy. *EMBO Rep* 2011; 12: 136–41.
- Cacchiarelli D, Martone J, Girardi E, Cesana M, Incitti T, Morlando M, et al. MicroRNAs involved in molecular circuitries relevant for the duchenne muscular dystrophy pathogenesis are controlled by the dystrophin/nNOS pathway. *Cell Metab* 2010; 12: 341–51.
- Chal J, Pourquié O. Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development* 2017; 144: 2104–22.
- Chamova T, Guergueltcheva V, Raycheva M, Todorov T, Genova J, Bichev S, et al. Association between loss of Dp140 and cognitive impairment in Duchenne and Becker dystrophies. *Balk J Med Genet* 2013; 16: 21–30.
- Chan YM, Bönemann CG, Lidov HGW, Kunkel LM. Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture. *J Cell Biol* 1998; 143: 2033–44.
- Charlesworth CT, Deshpande PS, Dever DP, Camarena J, Lemgart VT, Cromer MK, et al. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nat Med* 2019; 25: 249–54.
- Choi IY, Lim HT, Che YH, Lee G, Kim YJ. Inhibition of the Combinatorial Signaling of Transforming Growth Factor-Beta and NOTCH Promotes Myotube Formation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Skeletal Muscle Progenitor Cells [Internet]. 2021 Available from: <https://doi.org/10.3390/cells10071649>

- Clement K, Rees H, Canver MC, Gehrke JM, Farouni R, Hsu JY, et al. CRISPResso2 provides accurate and rapid genome editing sequence analysis. *Nat Biotechnol* 2019; 37: 224–6.
- Comi GP, Prelle A, Bresolin N, Moggio M, Bardoni A, Gallanti A, et al. Clinical variability in Becker muscular dystrophy Genetic, biochemical and immunohistochemical correlates. *Brain* 1994; 117: 1–14.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* (80-) 2013; 339: 819–23.
- Coote DJ, Davis MR, Cabrera M, Needham M, Laing NG, Nowak KJ. CUGC for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Eur J Hum Genet* 2018; 26: 749–57.
- Cossu G, Previtali SC, Napolitano S, Cicalese MP, Tedesco FS, Nicastro F, et al. Intra-arterial transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol Med* 2015; 7: 1513–28.
- Daoud F, Angeard N, Demerre B, Martie I, Benyaou R, Leturcq F, et al. Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 3779–94.
- Darras BT, Urion DK, Ghosh PS. Dystrophinopathies. *GeneReviews*® 2022: 35.
- Davies KE, Nowak KJ. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 762–73.
- Davies KE, Pearson PL, Harper PS, Murray JM, O'brien T, Sarfarazi M, et al. Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. *Nucleic Acids Res* 1983; 11: 2303–12.
- Dent KM, Dunn DM, von Niederhausern AC, Aoyagi AT, Kerr L, Bromberg MB, et al. Improved molecular diagnosis of dystrophinopathies in an unselected clinical cohort. *Am J Med Genet Part A* 2005; 134A: 295–8.
- Desmet F-O, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: e67–e67.
- Doorenweerd N, Mahfouz A, Van Putten M, Kaliyaperumal R, T'Hoën PAC, Hendriksen JGM, et al. Timing and localization of human dystrophin isoform expression provide insights into the cognitive phenotype of Duchenne muscular dystrophy. *Sci Rep* 2017; 7: 1–12.
- Doorenweerd N, Straathof CS, Dumas EM, Spitali P, Ginjaar IB, Wokke BH, et al. Reduced cerebral gray matter and altered white matter in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2014; 76: 403–11.
- Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [Internet]. *Science* (80-) 2014; 346[cited 2021 Dec 5] Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1258096>
- Duan D. Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther* 2018; 26: 2337–56.
- Dudley RWR, Danialou G, Govindaraju K, Lands L, Eidelman DE, Petrof BJ. Sarcolemmal damage in dystrophin deficiency is modulated by synergistic interactions between mechanical and oxidative/nitrosative stresses. *Am J Pathol* 2006; 168: 1276–87.
- Echigoya Y, Aoki Y, Miskew B, Panesar D, Touznic A, Nagata T, et al. Long-Term Efficacy of

- Systemic Multiexon Skipping Targeting Dystrophin Exons 45–55 With a Cocktail of Vivo-Morpholinos in Mdx52 Mice. *Mol Ther - Nucleic Acids* 2015; 4: e225.
- Echigoya Y, Lim KRQ, Melo D, Bao B, Trieu N, Mizobe Y, et al. Exons 45–55 Skipping Using Mutation-Tailored Cocktails of Antisense Morpholinos in the DMD Gene. *Mol Ther* 2019; 27: 2005–17.
- Ehmsen J, Poon E, Davies K. The dystrophin-associated protein complex. 2002
- Emery AEH. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases-A world survey. *Neuromuscul Disord* 1991; 1: 19–29.
- Emery AEH, Muntoni F, Quinlivan RCM. *Duchenne Muscular Dystrophy*. OUP Oxford; 2015
- England SB, Nicholson LVB, Johnson MA, Forrest SM, Love DR, Zubrzycka-Gaarn EE, et al. Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nat* 1990 3436254 1990; 343: 180–2.
- Esposito G, Tremolaterra MR, Marsocci E, Tandurella IC, Fioretti T, Savarese M, et al. Precise mapping of 17 deletion breakpoints within the central hotspot deletion region (introns 50 and 51) of the DMD gene. *J Hum Genet* 2017; 62: 1057–63.
- Fairclough RJ, Wood MJ, Davies KE. Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. *Nat Rev Genet* 2013; 14: 373–8.
- Felisari G, Boneschi FM, Bardoni A, Sironi M, Comi GP, Robotti M, et al. Loss of Dp140 dystrophin isoform and intellectual impairment in Duchenne dystrophy. *Neurology* 2000; 55: 559–64.
- Ferreiro V, Giliberto F, Muñoz GMN, Francipane L, Marzese DM, Mampel A, et al. Asymptomatic Becker muscular dystrophy in a family with a multiexon deletion. *Muscle Nerve* 2009; 39: 239–43.
- Findlay AR, Wein N, Kaminoh Y, Taylor LE, Dunn DM, Mendell JR, et al. Clinical phenotypes as predictors of the outcome of skipping around DMD exon 45. *Ann Neurol* 2015; 77: 668–74.
- Flanigan KM, Ceco E, Lamar KM, Kaminoh Y, Dunn DM, Mendell JR, et al. LTBP4 genotype predicts age of ambulatory loss in duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2013; 73: 481–8.
- Flanigan KM, Dunn DM, Von Niederhausern A, Soltanzadeh P, Gappmaier E, Howard MT, et al. Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: Application of modern diagnostic techniques to a large cohort. *Hum Mutat* 2009; 30: 1657–66.
- Fortunato F, Farnè M, Ferlini A. The DMD gene and therapeutic approaches to restore dystrophin. *Neuromuscul Disord* 2021; 31: 1013–20.
- Fortunato F, Rossi R, Falzarano MS, Ferlini A. Innovative Therapeutic Approaches for Duchenne Muscular Dystrophy. *J Clin Med* 2021; 10: 820.
- Franco-Obregón A, Lansman JB. Mechanosensitive ion channels in skeletal muscle from normal and dystrophic mice. *J Physiol* 1994; 481: 299–309.
- Franco A, Lansman JB. Calcium entry through stretch-inactivated ion channels in mdx myotubes. *Nature* 1990; 344: 670–3.
- Gargaun E, Falcone S, Solé G, Durigneux J, Urtizbera A, Cuisset JM, et al. The lncRNA 44s2 Study Applicability to the Design of 45-55 Exon Skipping Therapeutic Strategy for DMD. *Biomedicines* 2021; 9: 219.
- Geng C, Tong Y, Zhang S, Ling C, Wu X, Wang D, et al. Sequence and Structure Characteristics of 22 Deletion Breakpoints in Intron 44 of the DMD Gene Based on Long-Read Sequencing. *Front*

Genet 2021; 0: 587.

Gentil C, Leturcq F, Ben Yaou R, Kaplan J-C, Laforet P, Pénisson-Besnier I, et al. Variable phenotype of del45-55 Becker patients correlated with nNOS μ mislocalization and RYR1 hypernitrosylation. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 3449–60.

González-Romero E, Martínez-Valiente C, García-Ruiz C, Vázquez-Manrique RP, Cervera J, Sanjuan-Pla A. CRISPR to fix bad blood: a new tool in basic and clinical hematology. *Haematologica* 2019; 104: 881–93.

Gowers WR. Pseudo-hypertrophic muscular paralysis: a clinical lecture. J. & A. Churchill; 1879

Greer K, Mizzi K, Rice E, Kuster L, Barrero RA, Bellgard MI, et al. Pseudoexon activation increases phenotype severity in a Becker muscular dystrophy patient. *Mol Genet Genomic Med* 2015; 3: 320–6.

Guilbaud M, Gentil C, Peccate C, Gargaun E, Holtzmann I, Gruszczynski C, et al. miR-708-5p and miR-34c-5p are involved in nNOS regulation in dystrophic context. *Skelet Muscle* 2018; 8: 15.

Guiraud S, Aartsma-Rus A, Vieira NM, Davies KE, van Ommen G-JB, Kunkel LM. The Pathogenesis and Therapy of Muscular Dystrophies. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2015; 16: 281–308.

Gurvich OL, Maiti B, Weiss RB, Aggarwal G, Howard MT, Flanigan KM. DMD exon 1 truncating point mutations: Amelioration of phenotype by alternative translation initiation in exon 6. *Hum Mutat* 2009; 30: 633–40.

Guschin DY, Waite AJ, Katibah GE, Miller JC, Holmes MC, Rebar EJ. A rapid and general assay for monitoring endogenous gene modification. *Methods Mol Biol* 2010; 649: 247–56.

Happi Mbakam C, Lamothe G, Tremblay JP. Therapeutic Strategies for Dystrophin Replacement in Duchenne Muscular Dystrophy. *Front Med* 2022; 9: 774.

Hinton V, Fee RJ, Goldstein EM, De Vivo DC. Verbal and memory skills in males with Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol* 2007; 49: 123–8.

Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin: The protein product of the duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; 51: 919–28.

Hoffman EP, Kunkel LM. Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron* 1989; 2: 1019–29.

Hogarth MW, Houweling PJ, Thomas KC, Gordish-Dressman H, Bello L, Pegoraro E, et al. Evidence for ACTN3 as a genetic modifier of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun* 2017; 8: 1–13.

Horak M, Novak J, Bienertova-Vasku J. Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. *Dev Biol* 2016; 410: 1–13.

Huang X, Poy F, Zhang R, Joachimiak A, Sudol M, Eck MJ. Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with β -dystroglycan. *Nat Struct Biol* 2000; 7: 634–8.

Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 1992; 355: 696–702.

Ishmukhametova A, Van Kien PK, Méchin D, Thorel D, Vincent M-C, Rivier F, et al. Comprehensive oligonucleotide array-comparative genomic hybridization analysis: new insights

- into the molecular pathology of the DMD gene. *Eur J Hum Genet* 2012; 20: 1096–100.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* (80-) 2012; 337: 816–21.
- Kaspar RW, Allen HD, Ray WC, Alvarez CE, Kissel JT, Pestronk A, et al. Analysis of Dystrophin Deletion Mutations Predicts Age of Cardiomyopathy Onset in Becker Muscular Dystrophy. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; 2: 544–51.
- Keegan NP. Pseudoexons of the DMD Gene. *J Neuromuscul Dis* 2020; 7: 77–95.
- Keegan NP, Wilton SD, Fletcher S. Breakpoint junction features of seven DMD deletion mutations. *Hum Genome Var* 2019; 6
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 2002; 12: 996–1006.
- Kerr TP, Sewry CA, Robb SA, Roberts RG. Long mutant dystrophins and variable phenotypes: Evasion of nonsense-mediated decay? *Hum Genet* 2001; 109: 402–7.
- Kerst B, Mennerich D, Schuelke M, Stoltenburg-Didinger G, von Moers A, Gossrau R, et al. Heterozygous myogenic factor 6 mutation associated with myopathy and severe course of Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2000; 10: 572–7.
- Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim JS. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res* 2014; 24: 1012–9.
- Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, et al. The molecular basis for duchenne versus becker muscular dystrophy: Correlation of severity with type of deletion. 1989; 45: 498–506.
- 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; 50: 509–17.
- Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988; 53: 219–28.
- Krawczak M, Cooper D. Gene deletions causing human genetic disease: mechanisms of mutagenesis and the role of the local DNA sequence environment. *Hum Genet* 1991; 86: 425–41.
- Kwon JB, Etyreddy AR, Vankara A, Bohning JD, Devlin G, Hauschka SD, et al. In Vivo Gene Editing of Muscle Stem Cells with Adeno-Associated Viral Vectors in a Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy [Internet]. 2020[cited 2022 Sep 21] Available from: <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.09.016>.
- Labun K, Montague TG, Gagnon JA, Thyme SB, Valen E. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Res* 2016; 44: W272–6.
- Lai Y, Thomas GD, Yue Y, Yang HT, Li D, Long C, et al. Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy. *J Clin Invest* 2009; 119: 624–35.
- Lambert JT, Darmahkasih AJ, Horn PS, Rybalsky I, Shellenbarger KC, Tian C, et al. Neurodevelopmental, behavioral, and emotional symptoms in Becker muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2020; 61: 156–62.

- Lambrescu I, Popa A, Manole E, Ceafalan LC, Gaina G. Application of Droplet Digital PCR Technology in Muscular Dystrophies Research. *Int J Mol Sci* 2022, Vol 23, Page 4802 2022; 23: 4802.
- Lander ES, Baylis F, Zhang F, Charpentier E, Berg P, Bourgain C, et al. Adopt a moratorium on heritable genome editing. *Nature* 2019; 567: 165–8.
- Lee J, Echigoya Y, Duddy W, Saito T, Aoki Y, Takeda S, et al. Antisense PMO cocktails effectively skip dystrophin exons 45-55 in myotubes transdifferentiated from DMD patient fibroblasts. *PLoS One* 2018; 13: e0197084.
- Li X, Li Y, Zhao L, Zhang D, Yao X, Zhang H, et al. Circulating muscle-specific miRNAs in duchenne muscular dystrophy patients. *Mol Ther - Nucleic Acids* 2014; 3: e177.
- Lidov HGW, Selig S, Kunkel LM. Dp140: A novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 329–35.
- Ling C, Dai Y, Fang L, Yao F, Liu Z, Qiu Z, et al. Exonic rearrangements in DMD in Chinese Han individuals affected with Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Hum Mutat* 2020; 41: 668–77.
- Liquori A, Vaché C, Baux D, Blanchet C, Hamel C, Malcolm S, et al. Whole USH2A Gene Sequencing Identifies Several New Deep Intronic Mutations. *Hum Mutat* 2016; 37: 184–93.
- Long C, Amoasii L, Mireault AA, McAnally JR, Li H, Sanchez-Ortiz E, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science* (80-) 2016; 351: 400–3.
- de Luna N, Gallardo E, Soriano M, Dominguez-Perles R, de la Torre C, Rojas-García R, et al. Absence of Dysferlin Alters Myogenin Expression and Delays Human Muscle Differentiation “in Vitro”. *J Biol Chem* 2006; 281: 17092–8.
- De Luna N, Gallardo E, Soriano M, Dominguez-Perles R, De La Torre C, Rojas-García R, et al. Absence of Dysferlin Alters Myogenin Expression and Delays Human Muscle Differentiation “in Vitro”. *J Biol Chem* 2006; 281: 17092–8.
- Mah J, Selby K, Campbell C, Nadeau A, Tarnopolsky M, McCormick A, et al. A population-based study of dystrophin mutations in Canada. *Can J Neurol Sci* 2011; 38: 465–74.
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science* (80-) 2013; 339: 823–6.
- Mamchaoui K, Trollet C, Bigot A, Negroni E, Chaouch S, Wolff A, et al. Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skelet Muscle* 2011; 1: 34.
- Marey I, Ben Yaou R, Deburgrave N, Vasson A, Nectoux J, Leturcq F, et al. Non Random Distribution of DMD Deletion Breakpoints and Implication of Double Strand Breaks Repair and Replication Error Repair Mechanisms. *J Neuromuscul Dis* 2016; 3: 227–45.
- Matsuo M, Awano H, Matsumoto M, Nagai M, Kawaguchi T, Zhang Z, et al. Dystrophin dp116: A yet to be investigated product of the duchenne muscular dystrophy gene. *Genes (Basel)* 2017; 8
- Matthews E, Brassington R, Kuntzer T, Jichi F, Ay M. Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy (Review) SUMMARY OF FINDINGS FOR THE MAIN COMPARISON. *Cochrane Database Syst Rev* 2016
- McInerney P, Adams P, Hadi MZ. Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. *Mol Biol Int* 2014; 2014: 1–8.

- McNaughton JC, Cockburn DJ, Hughes G, Jones WA, Laing NG, Ray PN, et al. Is gene deletion in eukaryotes sequence-dependent? A study of nine deletion junctions and nineteen other deletion breakpoints in intron 7 of the human dystrophin gene. *Gene* 1998; 222: 41–51.
- Mendell JR, Lloyd-Puryear M. Report of MDA muscle disease symposium on newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2013; 48: 21–6.
- Meng J, Counsell JR, Reza M, Laval SH, Danos O, Thrasher A, et al. Autologous skeletal muscle derived cells expressing a novel functional dystrophin provide a potential therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Sci Reports* 2016 61 2016; 6: 1–12.
- Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: Insights into functions. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 155–9.
- Millay DP, Sargent MA, Osinska H, Baines CP, Barton ER, Vuagniaux G, et al. Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy. *Nat Med* 2008; 14: 442–7.
- Min Y-L, Li H, Rodriguez-Caycedo C, Mireault AA, Huang J, Shelton JM, et al. CRISPR-Cas9 corrects Duchenne muscular dystrophy exon 44 deletion mutations in mice and human cells. *Sci Adv* 2019; 5: eaav4324.
- Miyazaki D, Yoshida K, Fukushima K, Nakamura A, Suzuki K, Sato T, et al. Characterization of deletion breakpoints in patients with dystrophinopathy carrying a deletion of exons 45–55 of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene. *J Hum Genet* 2009; 54: 127–30.
- Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 2005; 60: 174–82.
- Mojica FJM, Díez-Villasenor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* 2000; 36: 244–6.
- Mojica FJM, Juez G, Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloflex* mediterranei sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol* 1993; 9: 613–21.
- Mojica FJM, Montoliu L. On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends Microbiol* 2016; 24: 811–20.
- Mokri B, Engel AG. Duchenne dystrophy: Electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology* 1975; 25: 1111–20.
- Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988; 2: 90–5.
- Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 1986; 323: 646–50.
- Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* 2003; 2: 731–40.
- Nakamura A. X-linked dilated cardiomyopathy: A cardiospecific phenotype of dystrophinopathy. *Pharmaceuticals* 2015; 8: 303–20.
- Nakamura A, Shiba N, Miyazaki D, Nishizawa H, Inaba Y, Fueki N, et al. Comparison of the phenotypes of patients harboring in-frame deletions starting at exon 45 in the Duchenne muscular dystrophy gene indicates potential for the development of exon skipping therapy. *J Hum Genet*

2017; 62: 459–63.

Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, Thakore PI, Moreb EA, Rivera RMC, et al. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* (80-) 2016; 351: 403–7.

Nelson CE, Wu Y, Gemberling MP, Oliver ML, Waller MA, Bohning JD, et al. Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med* 2019; 25: 427–32.

Newey SE, Howman E V., Ponting CP, Benson MA, Nawrotzki R, Loh NY, et al. Syncoilin, a Novel Member of the Intermediate Filament Superfamily That Interacts with α -Dystrobrevin in Skeletal Muscle. *J Biol Chem* 2001; 276: 6645–55.

Nicolas A, Raguénès-Nicol C, Ben Yaou R, Ameziane-Le Hir S, Chéron A, Vié V, et al. Becker muscular dystrophy severity is linked to the structure of dystrophin. *Hum Mol Genet* 2015; 24: 1267–79.

Nobile C, Toffolatti L, Rizzi F, Simionati B, Nigro V, Cardazzo B, et al. Analysis of 22 deletion breakpoints in dystrophin intron 49. *Hum Genet* 2002; 110: 418–21.

North KN, Miller G, Iannaccone ST, Clemens PR, Chad DA, Bella I, et al. Cognitive dysfunction as the major presenting feature of Becker's muscular dystrophy. *Neurology* 1996; 46: 461–4.

Oliveros JC, Franch M, Tabas-Madrid D, San-León D, Montoliu L, Cubas P, et al. Breaking-Cas—interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. *Nucleic Acids Res* 2016; 44: W267–71.

Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Majoros WH, Reddy TE, Gersbach CA. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun* 2015; 6: 6244.

Pane M, Lombardo ME, Alfieri P, D'Amico A, Bianco F, Vasco G, et al. Attention deficit hyperactivity disorder and cognitive function in duchenne muscular dystrophy: Phenotype-genotype correlation. *J Pediatr* 2012; 161: 705-9.e1.

Park J, Bae S, Kim J-S. Cas-Designer: a web-based tool for choice of CRISPR-Cas9 target sites. *Bioinformatics* 2015; 31: btv537.

Pasternak C, Wong S, Elson EL. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J Cell Biol* 1995; 128: 355–61.

Pegoraro E, Hoffman E, Piva L, Gavassini MB, Cagnin S, Ermani M, et al. SPP1 genotype is a determinant of disease severity in Duchenne muscular dystrophy. 2011

Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 3710–4.

Politano L. Read-through approach for stop mutations in Duchenne muscular dystrophy. An update. *Acta Myol* 2021; 40: 43–50.

Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J* 2016; 37: 2129-2200m.

Pons R, Kekou K, Gkika A, Papadimas G, Vogiatzakis N, Svingou M, et al. Single amino acid loss in the dystrophin protein associated with a mild clinical phenotype. *Muscle Nerve* 2017; 55: 46–50.

Poon E, Howman E V., Newey SE, Davies KE. Association of syncoilin and desmin: Linking

intermediate filament proteins to the dystrophin-associated protein complex. *J Biol Chem* 2002; 277: 3433–9.

Poplin R, Ruano-Rubio V, DePristo MA, Fennell TJ, Carneiro MO, Van der Auwera GA, et al. Scaling accurate genetic variant discovery to tens of thousands of samples. *bioRxiv* 2017: 201178.

Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 2013; 8: 2281–308.

Rando TA. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle and Nerve* 2001; 24: 1575–94.

Rando TA, Disatnik MH, Yu Y, Franco A. Muscle cells from mdx mice have an increased susceptibility to oxidative stress. *Neuromuscul Disord* 1998; 8: 14–21.

Ricotti V, Mandy WPL, Scoto M, Pane M, Deconinck N, Messina S, et al. Neurodevelopmental, emotional, and behavioural problems in Duchenne muscular dystrophy in relation to underlying dystrophin gene mutations. *Dev Med Child Neurol* 2016; 58: 77–84.

Rodriguez-Outeiriño L, Hernandez-Torres F, Ramirez de Acuña F, Rastrojo A, Creus C, Carvajal A, et al. miR-106b is a novel target to promote muscle regeneration and restore satellite stem cell function in injured Duchenne dystrophic muscle [Internet]. *Mol Ther Nucleic Acids* 2022; 29[cited 2022 Oct 10] Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36159592/>

Rugowska A, Starosta A, Konieczny P. Epigenetic modifications in muscle regeneration and progression of Duchenne muscular dystrophy. *Clin Epigenetics* 2021 131 2021; 13: 1–25.

Ruiz-Del-Yerro E, Garcia-Jimenez I, Mamchaoui K, Arechavala-Gomez V. Myoblots: dystrophin quantification by in-cell western assay for a streamlined development of Duchenne muscular dystrophy (DMD) treatments. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2018; 44: 463–73.

Sadoulet-Puccio HM, Rajala M, Kunkel LM. Dystrobrevin and dystrophin: An interaction through coiled-coil motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 12413–8.

Sanchez-Arjona MB. Spanish family with myalgia and cramps syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 286–9.

Singh GB, Kramer JA, Krawetz SA. Mathematical model to predict regions of chromatin attachment to the nuclear matrix. Oxford University Press; 1997

Sironi M, Cagliani R, Comi GP, Pozzoli U, Bardoni A, Giorda R, et al. Trans-acting factors may cause dystrophin splicing misregulation in BMD skeletal muscles. *FEBS Lett* 2003; 537: 30–4.

Sironi M, Cagliani R, Pozzoli U, Bardoni A, Comi GP, Giorda R, et al. The dystrophin gene is alternatively spliced throughout its coding sequence. *FEBS Lett* 2002

Sironi M, Pozzoli U, Cagliani R, Giorda R, Comi GP, Bardoni A, et al. Relevance of sequence and structure elements for deletion events in the dystrophin gene major hot-spot. *Hum Genet* 2003; 112: 272–88.

Smit AFA, Hubley R, Green P. RepeatMasker Open-4.0. 2013–2015. 2015

Soblechero-Martín P, Albiasu-Arteta E, Anton-Martinez A, de la Puente-Ovejero L, Garcia-Jimenez I, González-Iglesias G, et al. Duchenne muscular dystrophy cell culture models created by CRISPR/Cas9 gene editing and their application in drug screening. *Sci Rep* 2021; 11: 18188.

Spencer MJ, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K, Tidball JG. Helper (CD4+) and cytotoxic (CD8+) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. *Clin Immunol* 2001; 98:

235–43.

Spencer MJ, Tidball JG. Do immune cells promote the pathology of dystrophin-deficient myopathies? *Neuromuscul Disord* 2001; 11: 556–64.

Sun C, Serra C, Lee G, Wagner KR. Stem cell-based therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Exp Neurol* 2020; 323: 113086.

Suzuki H, Aoki Y, Kameyama T, Saito T, Masuda S, Tanihata J, et al. Endogenous Multiple Exon Skipping and Back-Splicing at the DMD Mutation Hotspot. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 1722.

Tabebordbar M, Lagerborg KA, Stanton A, King EM, Ye S, Tellez L, et al. Directed evolution of a family of AAV capsid variants enabling potent muscle-directed gene delivery across species. *Cell* 2021; 184: 4919-4938.e22.

Tabebordbar M, Zhu K, Cheng JKW, Chew WL, Widrick JJ, Yan WX, et al. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science* (80-) 2016; 351: 407–11.

Taglia A, Petillo R, D'Ambrosio P, Picillo E, Torella A, Orsini C, et al. Clinical features of patients with dystrophinopathy sharing the 45-55 exon deletion of DMD gene. *Acta Myol myopathies cardiomyopathies Off J Mediterr Soc Myol* 2015; 34: 9–13.

Tandon A, Jefferies JL, Villa CR, Hor KN, Wong BL, Ware SM, et al. Dystrophin Genotype–Cardiac Phenotype Correlations in Duchenne and Becker Muscular Dystrophies Using Cardiac Magnetic Resonance Imaging. *Am J Cardiol* 2015; 115: 967–71.

Tuffery-Giraud S, Miro J, Koenig M, Claustres M. Normal and altered pre-mRNA processing in the DMD gene. *Hum Genet* 2017; 136: 1155–72.

Vallejo-Illarramendi A, Toral-Ojeda I, Aldanondo G, López de Munain A. Dysregulation of calcium homeostasis in muscular dystrophies. *Expert Rev Mol Med* 2014; 16: e16.

Vandebrouck C, Martin D, Schoor MC Van, Debaix H, Gailly P. Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 2002; 158: 1089–96.

Verhaart IEC, Aartsma-Rus A. Therapeutic developments for Duchenne muscular dystrophy. *Nat Rev Neurol* 2019 157 2019; 15: 373–86.

Verheul RC, van Deutekom JCT, Datson NA. Digital Droplet PCR for the Absolute Quantification of Exon Skipping Induced by Antisense Oligonucleotides in (Pre-)Clinical Development for Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS One* 2016; 11: e0162467.

Vignos PJ, Archibald KC. Maintenance of ambulation in childhood muscular dystrophy. *J Chronic Dis* 1960; 12: 273–90.

van Vliet L, de Winter CL, van Deutekom JC, van Ommen G-JB, Aartsma-Rus A. Assessment of the feasibility of exon 45–55 multiexon skipping for duchenne muscular dystrophy. *BMC Med Genet* 2008; 9: 105.

Wang H, Marrosu E, Brayson D, Wasala NB, Johnson EK, Scott CS, et al. Proteomic analysis identifies key differences in the cardiac interactomes of dystrophin and micro-dystrophin. *Hum Mol Genet* 2021; 30: 1321–36.

Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, et al. One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell* 2013; 153: 910–8.

Webster C, Silberstein L, Hays AP, Blau HM. Fast muscle fibers are preferentially affected in

Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1988; 52: 503–13.

Weiss RB, Vieland VJ, Dunn DM, Kaminoh Y, Flanigan KM. Long-range genomic regulators of THBS1 and LTBP4 modify disease severity in duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2018; 84: 234–45.

Wojtal D, Kemaladewi DU, Malam Z, Abdullah S, Wong TWY, Hyatt E, et al. Spell Checking Nature: Versatility of CRISPR/Cas9 for Developing Treatments for Inherited Disorders. *Am J Hum Genet* 2016; 98: 90–101.

Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R. One-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell* 2013; 154: 1370–9.

Yazaki M, Yoshida K, Nakamura A, Koyama J, Nanba T, Ohori N, et al. Clinical Characteristics of Aged Becker Muscular Dystrophy Patients with Onset after 30 Years. *Eur Neurol* 1999; 42: 145–9.

Yoshida M, Hama H, Ishikawa-Sakurai M, Imamura M, Mizuno Y, Araishi K, et al. Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. 2000

Young CS, Hicks MR, Ermolova N V., Nakano H, Jan M, Younesi S, et al. A Single CRISPR-Cas9 Deletion Strategy that Targets the Majority of DMD Patients Restores Dystrophin Function in hiPSC-Derived Muscle Cells. *Cell Stem Cell* 2016; 18: 533–40.

Young CS, Mokhonova E, Quinonez M, Pyle AD, Spencer MJ. Creation of a Novel Humanized Dystrophic Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy and Application of a CRISPR/Cas9 Gene Editing Therapy. *J Neuromuscul Dis* 2017; 4: 139–45.

Young HK, Barton BA, Waisbren S, Portales Dale L, Ryan MM, Webster RI, et al. Cognitive and Psychological Profile of Males With Becker Muscular Dystrophy. *J Child Neurol* 2008; 23: 155–62.

Yuasa K, Ishii A, Miyagoe Y, Takeda S. Introduction of rod-deleted dystrophin cDNA, delta DysM3, into mdx skeletal muscle using adenovirus vector. *Nihon Rinsho* 1997; 55: 3148–53.

Zhang S, Shen J, Li D, Cheng Y. Strategies in the delivery of Cas9 ribonucleoprotein for CRISPR/Cas9 genome editing. *Theranostics* 2021; 11: 614–48.

Orphanet: Distrofia muscular de Becker [Internet]. [cited 2022 Oct 2] Available from: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=98895&Ing=ES

Press release: The Nobel Prize in Chemistry 2020 - NobelPrize.org [Internet]. [cited 2022 Oct 2] Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/press-release/>

EMBOSS: palindrome [Internet]. [cited 2022 Oct 3] Available from: <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/palindrome>

ANEXOS

ANEXO I. Dictamen del Comité de Ética



FPNT-CEIB-04 (B)

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS

Dña. María Tordera Baviera, titular de la Secretaría Técnica del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha **27 de junio de 2018**, el Proyecto de Investigación:

Título: **"TRATAMIENTO DE LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE INDUCIENDO UNA MEGADELECIÓN DE EXONES 45-55 EN EL GEN DYS UTILIZANDO EL SISTEMA CRISPR-CASE9."**

Nº de registro: **2018/0200**

Versión/fecha de la memoria del proyecto: **21 de junio de 2018**

Versión/fecha de la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado:

- **ASENTIMIENTO DE MENORES ENTRE 12-18 AÑOS, v02 de fecha 21/06/2018**
- **HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO para los ADULTOS, v2.0 de fecha 21/06/2018**
- **HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO para los PADRES/TUTORES, v2.0 de fecha 21/06/2018**

Que dicho proyecto se ajusta a las normativas éticas sobre investigación biomédica con sujetos humanos y es viable en cuanto al planteamiento científico, objetivos, material y métodos, etc, descritos en la solicitud, así como la Hoja de Información al Paciente y el Consentimiento Informado.

En consecuencia, este Comité acuerda emitir **INFORME FAVORABLE** de dicho Proyecto de Investigación que será realizado en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe por el/la **Dr. / Dra. Juan Jesús Vilchez Padilla** del servicio/unidad/grupo de investigación de **NEUROLOGÍA** como Investigador Principal.

Que el CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que, en el caso de que algún miembro participe en el estudio o declare algún conflicto de interés, no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del estudio clínico.

Lo que firmo en Valencia, a 27 de junio de 2018

Fdo.: Dra. María Tordera Baviera
Secretaría Técnica del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos



ANEXO II. Tablas adicionales

Tabla A1. Secuencias de *primers* para la identificación de los puntos de rotura y de los *long non-coding RNA*.

Nombre	Directo (5'-3')	Reverso (5'-3')
D1	CCTCTGCCACACACGACTTA	AAGCTGATCCAAGTGACACGA
D2	GATAGTTTGGTTACTGGGCAC	AGAAGAAAGCCCTCATTCGGTC
D3	TGTGCAATGCGTCACCTTGG	CCTTGGCACATATTCTAGCTG
D4	TTGCCTGGTTTTCTTCAGCTG	ACCTGTGACTCCAACCTTCTGG
D5	CATCTGCTAGCCAAAACAGTCA	AGCTCTGCCAATAATGCTCTCA
D6	GGCATTTCATGAGTGTAACG	GGAAGTGAAGCTTTGTGTGACAG
D7	GCCACTGTTACGTACTCTATGC	AAGCTGAAGTGTGGACTGTG
D8	CCACTTGATGACAGCAGTATCC	GTTTCGTGCTTTGTTTTATGCC
D9	CATTACTATCCTCCACTGCAGG	GTGCACATAGATCTGGTCGC
D10	CAGCAAATGGCAGATACTCC	TCAGTAGCCCTGGAGTCTTTG
ncINT44s	GTGACCCTGAATGACCTTCC	AGACAGCACCGTGAACCTTCC
ncINT44S2	GTTAGCGCCAATGAGCAAGAC	GCAGAAACAGCTATGCAGTGG
ncINT55s	CCTTCCAGATTCAGCATGTG	GTGACCCATAATGCAAGGTGC
ncINT55as(1)	TCTGCTCCACAGCTACAAGC	AGCGCCAAAAGATTAGCAGC
ncINT55as(2)	CTCCATCACTCAGTTAAGAGC	TCTACAGGACAAGGAGCACC

Tabla A2. Secuencias de *primers* utilizados para RT-PCR y ddPCR sobre ADNc.

Nombre	Aplicación	Secuencia (5'-3')
E41D	RT-PCR (PCR1)	ATGCAGTGCCTAGGCAAGC
E60R	RT-PCR (PCR1)	GCAATTTCTCCTCGAAGTGC
E43D	RT-PCR [PCR2 (1)]	TCTCTCCCAGCTTGATTTCC
E58R	RT-PCR [PCR2 (1)]	CTTCAAAGGCTGCTCTGTC
E44-58D	RT-PCR [PCR2 (2)]	TAAGGCCTTCAAGAGGGAATTG
E59R	RT-PCR [PCR2 (2)]	GTGCCTTGACTTTCTCGAGG
ddE44D	Ensayo ddPCR 44-56	CCTGAGAATTGGGAACATGC
Sonda 44-56-FAM	Ensayo ddPCR 44-56	TGGTATCTTAAGGACCTCCAAGGTG
ddE45R	Ensayo ddPCR 44-56	GTAACAGGACTGCATCATCG
ddE44D	Ensayo ddPCR 44-58	CCTGAGAATTGGGAACATGC
Sonda 44-58-HEX	Ensayo ddPCR 44-58	AATGGTATCTTAAGGCCTTCAAGAGG
ddE58R	Ensayo ddPCR 44-58	TTCAAAGGCTGCTCTGTC

Secuencias utilizadas para RT-PCR y ddPCR. El número indica el exón en el que hibridan ya sea el *primer* directo (D) o reverso (R)

Tabla A3. Secuencias de los gRNA y *primers* para el ensayo T7EI utilizadas.

Nombre	Hibridación	Secuencia (5'-3')
gRNA_44.1	Intrón 44	AGCAAACAAGGTAACCCTGG
gRNA_44.2	Intrón 44	GTGAAGAGTATCTCTGGGCG
gRNA_55.1	Intrón 55	GGTAAGGAAAATTCGCAGAC
gRNA_55.2	Intrón 55	AGGAAAATTCGCAGACAGGC
Nombre	Primer Directo (5'-3')	Primer Reverso (5'-3')
T7EI_Intron 44	CGTCTGGGAAAGGTCTGGTG	ATTCACCCTGTAAGGAAGGCT
T7EI_Intron 55	CCTCTGCCACACACGACTTA	ATCCCACTGGAATGTCTTGTGA

Tabla A4. Secuencias para la generación de librería de amplicones para secuenciación masiva

PCR1		
Nombre	Secuencia (5'-3')	
Adaptador <i>primer</i> directo	TACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	
Adaptador <i>primer</i> reverso	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	
Nombre	Primer Directo (5'-3')	Primer Reverso (5'-3')
gRNA_44.1 On	TATCTCTGGGCGAGGTCATC	GGCATGTTTCCCTGAAGTCCG
gRNA_44.1 Off1	GGACCTTCACAACTGAACC	GTGAAGGAGGGGGAAGAATG
gRNA_44.1 Off2	GGACTATGTTTGAGGTGAGAAC	GTGTTGCTCTGCACTTCTCC
gRNA_44.1 Off3	GCCCAGATAACTCATAGCAGC	GCTGGGCAAATAAGAGGTG
gRNA_55.2 On	CACCATGGGTTAAGCCACAC	GCTGGGACTTTATGGGAAGC
gRNA_55.2 Off1	CCCATTCTCTGGCTTCTAACC	GCTGCAGGGAACAAACAGAGC
gRNA_55.2 Off2	TACACCACCATGCAGATTGC	TTGTTCTGAAAGGGGCACTG
gRNA_55.2 Off3	CAGGAGGATTGCTTGAGTCCAG	AGGATGCCATCAGCCAAAC
gRNA_55.2 Off4	AAGTGGCCATGAGGTCAGAG	AGGGAAGAGTGAGGAGTGCC
PCR2		
Nombre	Secuencia (5'-3')	
TruSeq Universal Adapter Directo	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	
TruSeqAdapter5 Control negativo	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCACTGTGTGACTGGAGTTCAGACGCTGTGCTCTTCCGATCT	
TruSeqAdppter 20 Transfección	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAAGGCCACGTGACTGGAGTTCAGACGCTGTGCTCTTCCGATCT	

En la PCR1 se indican las secuencias de los adaptadores y la de los *primers* específicos de cada región a analizar que se acoplan. Los nucleótidos en verde de las secuencias de la PCR2 representan la región homóloga a los adaptadores de la PCR1. En rojo se indica la secuencia *index* para diferenciar el tipo de muestra.

Tabla A5. Resumen de los datos clínicos de los 57 sujetos de la serie

Paciente	Grupo Delección	Región	Edad actual (años)	Edad inicio (años)	Historia familiar	Niveles CK (UI/L)	Escala Vignos ¹	Alteración Cardíaca	Alteración Cognitiva	Pérdida Deambulación	Inicio Debilidad Muscular	Fenotipo
P1*	1	Valencia	37	8	SI	2400	0	SI	NO	NO		CARDIOPATIA ASILADA
P1,1**	1	Valencia	60 † ▪	ND	SI		0	NO	NO	NO		ASINTOMATICO
P2*	1	Valencia	30	2	SI	780	0	NO	NO	NO		ASINTOMATICO
P2,1*	1	Valencia	12	ND	SI		0	NO	SI	NO		ASINTOMATICO + COGNITIVO
P2,2*	1	Valencia	61	ND	SI		0	NO	NO	NO		ASINTOMATICO
P2,3*	1	Valencia	78	>40	SI		4	SI	NO	NO	>40	DMB INICIO TARDIO + CARDIOPATIA
P3*	1	Valencia	53	25	SI	1500	7	NO	NO	NO	39	DMB
P3,1*	1	Valencia	42	20	SI		5	NO	NO	NO	?	DMB
P3,2**	1	Valencia	63 † ▪	>40	SI		6	SI	NO	NO	>40	DMB INICIO TARDIO + CARDIOPATIA
P3,3**	1	Valencia	33	ND	SI		0	NO	NO	NO		ASINTOMATICO
P4*	1	Valencia	72	40	SI	1000	6	SI	NO	NO	60	DMB INICIO TARDIO + CARDIOPATIA
P4,1*	1	Valencia	70	25	SI		9	NO	NO	SI	?	DMB
P4,2*	1	Valencia	60	>40	SI		5	NO	NO	NO	>40	DMB INICIO TARDIO
P4,3**	1	Valencia	70 † ◦	>40	YES		9	NO	NO	SI	>40	DMB INICIO TARDIO

Paciente	Grupo Deleción	Región	Edad actual (años)	Edad inicio (años)	Historia familiar	Niveles CK (UI/L)	Escala Vignos ¹	Alteración Cardíaca	Alteración Cognitiva	Pérdida Deambulaci3n	Inicio Debilidad Muscular	Fenotipo
P5*	1	Valencia	12	4	SI	6000	0	NO	SI	NO		ASINTOMATICO + COGNITIVO
P5,1**	1	Valencia	52 † ◻	ND	SI		0	NO	NO	NO		ASINTOMATICO
P6*	1	Valencia	19	9	SI	9000	1	NO	SI	NO		ASINTOMATICO + COGNITIVO
P6,1**	1	Valencia	88 † ◻	ND	SI		0	SI	NO	NO		CARDIOPATIA AISLADA
P7*	1	Valencia	23	5	SI	600	1	NO	NO	NO		ASINTOMATICO
P7,1*	1	Valencia	19	6	SI		1	NO	SI	NO		PAUCISINTOMATICO + COGNITIVO
P7,2*	1	Valencia	70 † ◻	ND	SI		0	SI	NO	NO		CARDIOPATIA AISLADA
P8*	1	Valencia	12	8	SI	6400	1	NO	SI	NO		PAUCISINTOMATICO + COGNITIVO
P8,1*	1	Valencia	62	ND	SI		1	SI	NO	NO		CARDIOPATIA AISLADA
P9*	1	Valencia	14	7	SI	8000	1	NO	SI	NO		PAUCISINTOMATICO + COGNITIVO
P9,1*	1	Valencia	74 † ◻	ND	SI		0	SI	NO	NO		CARDIOPATIA AISLADA
P10*	2	Catalu3a	35	29	SI	5000	0	NO	NO	NO		ASINTOMATICO
P10,1*	2	Catalu3a	73	>40	SI		4	NO	NO	NO	>40	DMB INICIO TARDIO
P11*	2	Catalu3a	76 † ◻	22	SI	1200	0	SI	NO	NO		CARDIOPATIA AISLADA
P11,1*	2	Catalu3a	37	ND	SI		0	NO	NO	NO		ASINTOMATICO
P12*	2	Catalu3a	42	17	NO	7000	0	NO	NO	NO		ASINTOMATICO
P13*	3	País Vasco	73	40	NO	2500	7	SI	NO	SI	40	DMB INICIO TARDIO + CARDIOPATIA

Paciente	Grupo Delección	Región	Edad actual (años)	Edad inicio (años)	Historia familiar	Niveles CK (U/L)	Escala Vignos ¹	Alteración Cardíaca	Alteración Cognitiva	Pérdida Deambulación	Inicio Debilidad Muscular	Fenotipo
P14*	3	País Vasco	32	22	SI	800	1	SI	NO	NO		CARDIOPATIA AISLADA
P14,1**	3	País Vasco	55 † •	ND	SI		0	SI	NO	NO		CARDIOPATIA AISLADA
P14,2**	3	País Vasco	36	ND	SI		0	NO	NO	NO		ASINTOMATICO
P15*	3	País Vasco	18	8	SI	12291	1	NO	NO	NO		PAUCISINTOMATICO
P15,1**	3	País Vasco	73 † ◦	>40	SI		9	NO	NO	SI	>40	DMB INICIO TARDIO
P16*	4	Valencia	15	5	SI	5000	1	NO	SI	NO		PAUCISINTOMATICO + COGNITIVO
P16,1**	4	Valencia	66 † ◦	>40	SI		9	NO	NO	SI	>40	DMB INICIO TARDIO
P17*	4	Valencia	36	27	SI	1000	0	SI	SI	NO		CARDIOPATIA AISLADA + COGNITIVO
P17,1**	4	Valencia	80 † ◦	ND	SI		0	NO	NO	NO		ASINTOMATICO
P17,2**	4	Valencia	38	ND	SI		0	NO	NO	NO		ASINTOMATICO
P17,3**	4	Valencia	36	ND	SI		0	NO	NO	NO		ASINTOMATICO
P18*	5	Valencia	40	10	SI	1900	6	SI	NO	NO	30	DMB + CARDIOPATIA
P18,1*	5	Valencia	47	20	SI		4	SI	NO	NO	?	DMB + CARDIOPATIA
P18,2**	5	Valencia	65 † •	20	SI		9	SI	NO	SI	?	DMB + CARDIOPATIA
P19*	6	Cataluña	55	30	NO	900	0	NO	NO	NO		ASINTOMATICO
P20*	7	Rioja	43	28	SI	1000	1	SI	NO	NO		CARDIOPATIA AISLADA

Paciente	Grupo Deleción	Región	Edad actual (años)	Edad inicio (años)	Historia familiar	Niveles CK (UI/L)	Escala Vignos ¹	Alteración Cardíaca	Alteración Cognitiva	Pérdida Deambulaci3n	Inicio Debilidad Muscular	Fenotipo
P20,1*	7	Rioja	41	ND	SI		0	NO	NO	NO		ASINTOMATICO
P20,2**	7	Rioja	84	ND	SI		0	SI	NO	NO		CARDIOPATIA AISLADA
P20,3*	7	Rioja	38	ND	SI		0	NO	NO	NO		ASINTOMATICO
P21*	8	Catalu3a	39	28	NO	800	1	NO	NO	NO		PAUCISINTOMATICO
P22*	9	Murcia	16	12	SI	3500	1	NO	NO	NO		PAUCISINTOMATICO
P22,1*	9	Murcia	65	ND	SI		4	NO	NO	NO	55	DMB INICIO TARDIO
P22,2**	9	Murcia	87 † ◻	ND	SI		1	NO	NO	NO		ASINTOMATICO
P23*	10	Andaluc3a	11	4	SI	900	0	NO	SI	NO		ASINTOMATICO + COGNITIVO
P23,1*	10	Andaluc3a	8	ND	SI		0	NO	SI	NO		ASINTOMATICO + COGNITIVO
P23,2*	10	Andaluc3a	78	ND	SI		0	NO	NO	NO		ASINTOMATICO

Los casos 3ndice aparecen representados con n3meros en negrita sin un n3mero adicional (ej. 1), y sombreados en gris. Los n3meros sin negrita, con un n3mero adicional seguido de una coma (ej 1,1) y sin sombrear representan a un familiar de ese caso 3ndice. Adem3s, contiene el identificativo P (paciente).

*Evaluaci3n presencial **Evaluaci3n mediante cuestionario † ◻ Muerte debido a origen card3aco o muerte s3bita. † ◻ Causa de la Muerte no conocida ND: no disponible.

Escala de Vignos modificada¹: grado 0= hiperCKemia y desarrollo de todas las actividades con normalidad; grado 1= deambulaci3n normal pero incapacidad para correr; grado 2= incapacidad de andar de puntillas y marcha andarina; grado 3= debilidad muscular evidente, marcha en estepaje y uso de pasamanos para subir escaleras; grado 4= dificultad para levantarse del suelo, signo de Gowers; grado 5= incapacidad para subir escaleras; grado 6= incapacidad para la incorporaci3n desde una silla; grado 7= marcha con ayuda o uso de bast3n; grado 8= uso de silla de ruedas; grado 9= incapacidad para comer, beber o permanecer sentado sin asistencia; grado 10= confinado en cama.

Tabla A6. Evaluación cardiaca

Paciente	Primera manifestación (edad)	Ecocardiografía			Edad	ECG/Holter ^d (edad)	Tratamiento		Información adicional
		FEVI ^a (%)	DTDVI/DTSVI ^b (mm)	VDFVI ^c (ml/m ²)			Farmacológico	Intervención (edad)	
P1	37	51	50/41	50,9	37	Normal	Ramipril	--	--
P2	NO	61	58/45	60,6	28	Normal	--	--	--
P2,3	66	45	>58/ --	--	67	BAV FA (66)	Acenocumarol Bisoprolol Ramipril Furosemida Simvastatina	Marcapasos (MCP) (66)	Cardiopatía isquémica- STENT (66)
P3	NO	56	38/28	37,1	52	Normal	--	--	--
P3,1	NO	60	46/25	34	41	Normal	--	--	--
P4	60	55	54/38	--	70	BRDHH (70)	Candersartan	--	--
P4,1	NO	68	48/39	87,3ml (NI)*	69	Normal	--	--	--
P4,2	NO	63	48/26	50,4	60	Normal	--	--	--
P5	NO	68	42/22	--	12	Normal	--	--	--
P6	NO	57	48/34	48,5	17	Normal	--	--	--

Paciente	Primera manifestación (edad)	Ecocardiografía			Edad	ECG/Holter ^d (edad)	Tratamiento		Información adicional
		FEVI ^a (%)	DTDVI/DTSVI ^b (mm)	VDFVI ^c (ml/m ²)			Farmacológico	Intervención (edad)	
P6,1	55	ND	ND	ND	ND	ND	ND	--	Insuficiencia cardiaca reportada en los archivos de atención primaria
P7	NO	63	44/29	48,6	23	Normal	--	--	--
P7,1	NO	70	49/33	--	16	Normal	--	--	--
P7,2	53	25	65/ --	--	69	BRIHH (63) FA	Bisoprolol Furosemida Amiodarona Espironolactona Anticoagulante	Desfibrilador Automático Implantable (DAI) (63)	Fallecimiento en lista de espera para trasplante cardiaco (70)
P8	NO	72	41/24	--	9	Normal	--	--	--
P8,1	61	25	64/ --	--	61	BAV (61)	Sacubitrilo Valsartan Carvedilol Ivabradina Torasemida Rosuvastatina	Desfibrilador Automático Implantable (DAI) (61)	En lista de espera para trasplante cardiaco
P9	NO	63	57/37	--	13	Normal	--	--	--

Paciente	Primera manifestación (edad)	Ecocardiografía			Edad	ECG/Holter ^d (edad)	Tratamiento		Información adicional
		FEVI ^a (%)	DTDVI/DTSVI ^b (mm)	VDFVI ^c (ml/m ²)			Farmacológico	Intervención (edad)	
P9,1	29	ND	ND	ND	ND	BAV (29)	--	Marcapasos (MCP) (29) Trasplante cardiaco (62)	Fallecimiento por insuficiencia cardiaca (74)
P10	NO	68	51/31	--	32	Normal	--	--	--
P11	51	55	46/31	--	74	BB (74)	AAS Bisoprolol Simvastatina Insulina	--	Insuficiencia cardiaca y cirugía revascularización coronaria. Fallecimiento por descompensación diabética
P13	73	55	54/38	126,6ml (NI)*	73	BRDHH (73)	--	--	--
P14	29	40	60/ --	80	32	Normal	ND	--	--
P15	NO	60	55/39	--	18	Normal	--	--	--
P16	NO	72	42/24	--	15	Normal	--	--	--
P17	36	54	59/ --	60 (I)	36	Normal	--	--	--
P18	35	47	58/47	66,6	39	Normal	Enalaprilol	--	--
P18,1	38	52	--	--	44	Normal	Enalaprilol Bisoprolol	--	--

Paciente	Primera manifestación (edad)	Ecocardiografía				Edad	ECG/Holter ^d (edad)	Tratamiento		Información adicional
		FEVI ^a (%)	DTDVI/DTSVI ^b (mm)	VDFVII ^c (ml/m ²)	Farmacológico			Intervención (edad)		
P20	39	59	--	70	41	BAV BRDHH (39)	--	Marcapasos (MCP) (39)	--	
P20,1	NO	57	--	--	39	Normal	--	--	--	
P20,2	75	ND	ND	ND	ND	BAV (75)	ND	Marcapasos (MCP) (75)	ND	
P20,3	NO	60	47/ --	--	35	Normal	--	--	--	
P22	NO	67	45/-	--	12	Normal	--	--	--	
P22,1	NO	65	39/26	31,3	65	Normal	--	--	--	
P23	NO	60	40/30	--	11	Normal	--	--	--	
P23,1	NO	60	38/26	--	6	Normal	--	--	--	
P23,2	NO	ND	ND	ND	ND	ND	--	--	Información de atención primaria	

(a) Fracción Eyección Ventrículo Izquierdo (**FEVI**). Valores de normalidad $\geq 55\%$.

(b) Diámetro telediastólico/telesistólico Ventrículo Izquierdo (**DTDVI/DTSVI**). Valores de normalidad < 54 mm.

(c) Volumen Diastólico Final Ventrículo Izquierdo (**VDFVII**). Valores de normalidad 54 ± 10 ml/m². *Los valores de los pacientes 4,1 and 13 corresponden a valores no indexados (**NI**), donde los valores de normalidad son 105 ± 20 ml.

(d) Alteraciones detectadas por electrocardiograma (ECG) y Holter: bloqueo atrioventricular (**BAV**), fibrilación auricular (**FA**), bloqueo de rama derecha/izquierda del haz de His (**BRDHH/BRIHH**), bloqueo bifascicular (**BB**).

AAS: ácido acetil salicílico

La edad se refleja en años

ND: no disponible

Tabla A7. Evaluación cognitiva

ID	Delección	Edad	CI ^a %	Déficits neurodesarrollo ^b	Digit Span ^c %	PF ^d %	FV ^e %	FFEE ^f	CBCLI ^g	CBCLE ^h
P2,1	1 (Dp140+)	8	61	RHL	5	9	50	1 (4-5)	68	76
P5	1 (Dp140+)	8	72	RHL	5	0,4	1	7 (4-5)	71	70
P6	1 (Dp140+)	15	75	DA/NNEE	25	9	37	8 (7-8)	66	63
P7,1	1 (Dp140+)	15	78	TDAH	0,1	0,1	2	3 (7-8)	54	64
P8	1 (Dp140+)	8	69	-	0,4	50	75	1 (4-5)	79	75
P9	1 (Dp140+)	10	55	RHL	2	16	84	4 (5-6)	72	54
P16	4 (Dp140-)	12	78	RHL	9	2	25	5 (6-7)	66	62
P22	9 (Dp140+)	15	83	-	50	16	50	8 (7-8)	54	53
P23	10 (Dp140+)	10	89	RHL	5	1	9	5 (5-6)	77	15
P23,1	10 (Dp140+)	6	47	DA/NNEE + RHL	-	1	2	-	68	75

Pacient e	Delección	Edad	CI %	Déficits neurodesarrollo ^b	MT ⁱ %	CIV ^j %	FFEE
P17	4 (Dp140 -)	36	80	TDAH	43.75	16	3 (9)

^aCoficiente Intelectual (CI%).

^bDéficits del Neurodesarrollo: Dificultades de Aprendizaje/Necesidades Educativas Especiales (DA/NNEE); Retraso en el Habla y Lenguaje (RHL); Trastorno Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH).

Formal: prueba ^cDigit Span para evaluar la Memoria de Trabajo (Batería NEPSY-II, % percentiles); ^dProcesamiento Fonológico (Batería NEPSY-II, % percentiles) (PF), puntuación test ^eFluidez Verbal (Batería NEPSY-II, % percentiles) (FV). Para esta batería de test, los percentiles (%) que se encuentran entre el rango de 26 a 75 representan los niveles esperados de rendimiento para la mayoría de los niños del mismo grupo de edad.

Prueba de Torre de Londres para la evaluación de la ^fFunciones Ejecutivas (FFEE). La puntuación relativa a controles del mismo rango de edad está indicada entre paréntesis.

Cuestionario *Child Behavior CheckList* de Achenbach (CBCL) para la evaluación de los problemas emocionales y de comportamiento. Se evalúan los problemas de ^ginternalización (CBCLI) y ^hexternalización (CBCLE). Los valores de normalidad son los <60.

En la parte inferior de la tabla aparecen los datos de la evaluación del individuo adulto (pruebas específicas además de algunas comentadas anteriormente): ⁱMemoria de Trabajo (prueba WAIS, *Wechsler Adult Intelligence Scale*) (MT) ^jCoficiente intelectual verbal (CIV).

Tabla A8. Caracterización genómica de las diez del45–55 específicas encontradas

ID	Puntos de Rotura (GRCh37//Hg19) ^a		HGVS nomenclatura ^b	Tamaño ^c (bp)	Elementos Repetitivos ± 500bp ^d		Secuencias inestabilidad genómica ^e	MH ^f	Mecanismo ^g
	Intron 44-45	Intron 55-56			Punto Rotura 44-45	Punto Rotura 55-56			
D1	32056814 (18)	31599476 (80)	c.6439-70183_8217+4 6314del	457.338	MIRb (SINE/MIR) L2d (LINE/L2)	L1ME2z (LINE/L1)	Palindromos TTAAAA	CCTG	MMEJ/NHEJ
D2	31991661 (62)	31612973 (74)	c.6439-5030_8217+32 817del	378.688	Repetición simple (TCC) _n L1P4 (LINE/L1)	-	Palindromos TG(A/G)(A/G)(G/T)(A/C)	G	NHEJ
D3	32055944	31597199	c.6439-69313_8217+4 8591delinsGC	458.745	L2/b (LINE/L2)	Charlie17a (DNA/hAT-Charlie) MER113A (DNA/hAT-Charlie)	TTAAAA TG(A/G)(A/G)(G/T)(A/C)	-	NHEJ
D4	32205338 (41)	31626657 (60)	c.6438+29695_8217+19133del	578.681	-	MLT1H (LTR/ERVL-MaLR)	Palindromos	TTT	MMEJ/NHEJ

ID	Puntos de Rotura (GRCh37//Hg19) ^a		HGVS nomenclatura ^b	Tamaño ^c (bp)	Elementos Repetitivos ± 500bp ^d		Secuencias inestabilidad genómica ^e	MH ^f	Mecanismo ^g
	Intron 44-45	Intron 55-56			Punto Rotura 44-45	Punto Rotura 55-56			
D5	31994640	31620647	c.[6439-8288_6439-7654dup;6439-8009_8217+25143delinsA]	373.993	L2 (LINE/L2)	MLT1I (LTR/ERVL-MaLR)	Palindromos TTATAA	-	NHEJ
D6	32123454 (60)	31607994 (8000)	c.6438+111579_8217+37796delinsCTTTGTTAATATAAGCTTTGTAATATAAGCTTTGTAA G	515.460	MER20 (DNA/hAT-Charlie) MIRb (SINE/MIR)	L1PB4 (LINE/L1) Repetición simple (A) _n y (AAACA) _n	Palindromos	GTATAA	MMRDR/IAORRI
D7	32016449 (50)	31622981 (82)	c.6439-29818_8217+22809del	393.468	-	GA-rica (baja complejidad)	Palindromos TG(A/G)(A/G)(G/T)(A/C)	A	NHEJ
D8	32205737 (42)	31590083 (88)	c.[8217+55722G>A;6438+29296_8217+55707del;8217+55716_8217+55717insAATTTTTC AAATAATTTT TAGCAAT]	615.654	-	L2/c (LINE/L2) MER3 (DNA/hAT-Charlie) MER20 (DNA/hAT-Charlie) L1PA14 (LINE/L1) A-rica (baja complejidad)	Palindromos TTATAA	AATTT	MMRDR/IAORRI

ID	Puntos de Rotura (GRCh37//Hg19) ^a		HGVS nomenclatura ^b	Tamaño ^c (bp)	Elementos Repetitivos ± 500bp ^d		Secuencias inestabilidad genómica ^e	MH ^f	Mecanismo ^g
	Intron 44-45	Intron 55-56			Punto Rotura 44-45	Punto Rotura 55-56			
D9	32050796 (800)	31592524 (28)	c.6439- 64165_8217+5 3266del	458.272	L1MB1 (LINE/L1) MER115 (DNA/hAT- Tip100)* L1MA4 (LINE/L1) A-rich (baja complejidad)	AluY (SINE/Alu)* MIRb (SINE/MIR)	Palíndromos TG(A/G)(A/G)(G/T)(A/C)	AGCA	MMEJ/NHEJ
	32043933 (35)	31618673 (75)	c.6439- 57302_8217+2 7117delinsATC CA		MIRc (SINE/MIR)* MER3 (DNA/hAT- Charlie)	LTR33 (LTR/EVLR)* Repetición simple (A) _n AluJb (SINE/Alu)	TG(A/G)(A/G)(G/T)(A/C)	GG	NHEJ

(a) Posiciones de los puntos de rotura de acuerdo con el primer nucleótido deleciónado en los intrones 44 y 55 (según las posiciones GRCh37//Hg19). La posición puede variar en los casos que existe microhomología.

(b) Descripción de las mutaciones de acuerdo a la nomenclatura de HGSV (del inglés, *Human Genome Variation Society*), tomando como referencia el primer nucleótido del codón de inicio a la traducción ATG (+1), del transcrito NM_004006.2.

(c) Tamaño de las distintas deleciones en pb.

(d) Elementos repetitivos en los 500 pb aguas arriba y abajo del punto de rotura de cada deleción.

(e) Secuencias capaces de inducir la rotura del ADN cercano al neo-intrón 44–55 en cada deleción: palíndromos de 6 o más pares de bases, la secuencia TTTAAA conocida por inducir la curvatura del ADN y la secuencia consenso de deleción TG(A/G)(A/G)(G/T)(A/C).

(f) Presencia de microhomologías (MH) en el punto de unión del neo-intrón.

(g) Mecanismos genómicos propuestos como responsables del origen de cada del45–55 específica según los elementos observados en el neo-intrón: MMEJ (del inglés, *micro-homology end joining*), NHEJ (del inglés, *non-homologous end joining*), MMRDR (del inglés, *microhomology-mediated replication-dependent*) e IAORRI (inicio aberrante del origen de replicación y rescate incompleto de la replicación).

***Elementos repetitivos englobando el punto de rotura**

ID: grupo de deleción

Tabla A9. Genotipo de los factores modificadores estudiados, presencia de mutaciones concurrentes y perfil de preservación de los *long non-coding RNAs* en los casos estudiados.

Paciente	Delección	<i>SPP1</i>	<i>LTBP4</i>	<i>ACTN3</i>	Mutaciones adicionales*	<i>Long non-coding RNA</i>			
		rs28357094	rs2303729 rs1131620 rs1051303 rs10880	rs1815739		ncINT44s chrX:32202950 -32205549	ncINT44s2 chrX:32109630 - 32112347	ncINT55as chrX:31582143 -31624008	ncINT55s chrX:31618919 -31621347
P1	1	G G	VTTT/VTTT	TT	ANO5 c.692G>T	P	P	N*	N
P2	1	T T	VTTT/VTTT	CC	-	P	P	N*	N
P2,1	1	T T	OTRO	TC	NE	P	P	N*	N
P3	1	T T	IAAM/IAAM	TT	PYGM c.148C>T	P	P	N*	N
P3,1	1	T T	IAAM/IAAM	TC	NE	P	P	N*	N
P4	1	T G	VTTT/VTTT	TC	-	P	P	N*	N
P4,2	1	T G	OTRO	TT	NE	P	P	N*	N
P5	1	T T	OTRO	TT	-	P	P	N*	N
P6	1	T T	VTTT/VTTT	CC	-	P	P	N*	N
P7	1	T T	IAAM/IAAM	TT	-	P	P	N*	N
P8	1	T T	OTRO	CC	GYG1 c.304G>C	P	P	N*	N
P8,1	1	T T	VTTT/VTTT	TT	NE	P	P	N*	N
P9	1	T T	VTTT/VTTT	TT	-	P	P	N*	N

Paciente	Delección	<i>SPP1</i>	<i>LTBP4</i>	<i>ACTN3</i>	Mutaciones adicionales*	<i>Long non-coding RNA</i>			
		rs28357094	rs2303729 rs1131620 rs1051303 rs10880	rs1815739		ncINT44s	ncINT44s2	ncINT55as	ncINT55s
						chrX:32202950 -32205549	chrX:32109630- 32112347	chrX:31582143 -31624008	chrX:31618919 -31621347
P10	2	T T	OTRO	TC	-	P	P	N*	N
P11	2	T G	VTTT/VTTT	CC	-	P	P	N*	N
P12	2	T G	IAAM/IAAM	CC	-	P	P	N*	N
P13	3	G G	OTRO	CC	-	P	P	N*	N
P14	3	T T	VTTT/VTTT	TT	-	P	P	N*	N
P14,2	D3	T G	OTRO	TC	NE	P	P	N*	N
P15	D3	T T	OTRO	CC	-	P	P	N*	N
P16	D4	T T	IAAM/IAAM	TC	CPT2 c.338C>T	N	N	P	P
P17	D4	T G	OTRO	CC	CLCN1 c.409T>G	N	N	P	P
P18	D5	T T	OTRO	CC	-	P	P	N*	N
P18,1	D5	T T	VTTT/VTTT	CC	NE	P	P	N*	N
P19	D6	T T	OTRO	CC	-	P	N	N*	N
P20	D7	T T	OTRO	TC	-	P	P	P	P
P20,1	D7	T T	OTRO	TT	NE	P	P	P	P
P21	D8	T T	IAAM/IAAM	TC	-	N	N	N*	N

Paciente	Delección	<i>SPP1</i>	<i>LTBP4</i>	<i>ACTN3</i>	Mutaciones adicionales*	<i>Long non-coding RNA</i>			
		rs28357094	rs2303729 rs1131620 rs1051303 rs10880	rs1815739		ncINT44s chrX:32202950 -32205549	ncINT44s2 chrX:32109630- 32112347	ncINT55as chrX:31582143 -31624008	ncINT55s chrX:31618919 -31621347
P22	D9	T T	IAAM/IAAM	CC	-	P	P	N*	N
P22,1	D9	T G	OTRO	TC	NE	P	P	N*	N
P23	D10	T T	OTRO	CC	-	P	P	N*	N
P23,1	D10	T T	OTRO	TC	NE	P	P	N*	N
P23,2	D10	T T	IAAM/IAAM	TT	NE	P	P	N*	N

El análisis de los modificadores genéticos (*SPP1*, *LTBP4* y *ACTN3*), así como la presencia de mutaciones concurrentes en otros genes se realizó en los 23 casos índice analizados por secuenciación masiva. En el caso de los modificadores se estudiaron 10 casos secundarios por secuenciación Sanger. En el caso del haplotipo *LTBP4*, los casos catalogados como “OTRO” contienen haplotipos mixtos.

Respecto al patrón de *long non-coding RNA* (lncRNA): P= presencia, N=ausencia; N*= ausencia parcial. El patrón de lncRNA es extensivo a todos los individuos con la misma delección.

NE: No Evaluado

Tabla A10. Predicciones *in silico* de la formación de pseudoexones.

ID	Aceptor ^a	MaxEnt ^c	HSF ^d	Dador ^b	MaxEnt ^c	HSF ^d	PE ^e (bp)	ARN ^f
D1	TTCTCTATTCAGGA	6,40	94,03	ATGGTAAGG	9,33	92,36	344	SI (P1; P2; P4,2; P7; P8,1; P9)
D2	ACAACCTAACAGTA	3,42	78,14	ATGGTAAAT	6,41	82,13	215	NO
D3	GCTCTGCCACAGTC	7,04	83,99	CAGGTAAGC	9,88	97,88	208	NO
D4	TTTTCCCACAAGTA	4,66	81,99	TTTGTAAGT	7,4	82,40	267	SI (P17)
D5	TTTAACTAATAGGT	8,40	81,73	TGGGTAAGA	8,91	90,83	244	SI (P18)
D6	TTTCTGTTTAAGCT	7,53	80,72	CCGGTACTA	4,42	71,79	240	NO
D7	TTTCTCCACCAGAA	10,03	90,75	AGAGTACGT	6,58	74,81	411	NO
D8	TCTTTTCTCCAGGA	11,15	96,35	TAAGTCAGT	-	82,19	292	NO
D9	TTGGTCCTACAGAC	6,76	86,59	GCGGTGAGC	8,02	86,94	218	SI (P22,1)
D10	ACATTCATCCAGAT	6,10	81,80	ATAGTAAGA	4,74	81,35	269	NO

Todos los elementos asociados en el reconocimiento de un pseudoexón (PE) putativo están indicados. Las potenciales secuencias aceptoras (a) y dadoras (b) de *splicing* fueron seleccionadas en base a sus puntuaciones obtenidas de los algoritmos MaxEnt (c) y HSF (d) (Human Splicing Finder V.3.1). El tamaño del potencial PE está indicado (e), además de si la potencial activación del PE ha sido comprobada a nivel de ARN, en los casos en los que había disponible biopsia muscular de algún sujeto del grupo de delección indicado entre paréntesis (f).

Tabla A11. Análisis de las secuencias potenciadoras y silenciadoras de *splicing* en la zona de unión del neo-intrón 44–55.

Delección	ESE totales ^a	ESS totales ^b	Ratio ESE/ESS
D1	569	536	1,06
D2	759	474	1,60
D3	571	540	1,06
D4	539	635	0,85
D5	688	508	1,35
D6	510	509	1,00
D7	547	628	0,87
D8	604	598	1,01
D9	661	532	1,24
D10	591	520	1,14

Número de todos los elementos reguladores de *splicing* encontrados en una región de 1 kb alrededor del punto de unión del neo-intrón 45–55. Específicamente reportamos el número de secuencias potenciadoras (ESE, a, del inglés, *Exonic Splicing Enhancer*) y silenciadoras (ESS, b, del inglés, *Exonic Splicing Silencer*).

Tabla A12. Resumen de las lecturas detectadas con las principales modificaciones tras el análisis de secuenciación masiva.

Muestra Transfectada									
Nombre	Total n	Inserciones		Deleciones		Sustituciones		%	
		n	%	n	%	n	%	total	indel
gRNA_44.1 On	730258	5715	0,78	33041	4,52	1418	0,19	5,50	5,31
gRNA_44.1 Off1	557517	2	0	6	0,00	334	0,06	0,06	0
gRNA_44.1 Off2	403879	1	0	2	0	592	0,15	0,15	0
gRNA_55.2 On	542575	29538	5,44	24117	4,44	584	0,11	9,9	9,89
gRNA_55.2 Off1	620319	0	0	2	0	212	0,03	0,03	0
gRNA_55.2 Off2	550139	0	0	4	0	504	0,09	0,09	0
gRNA_55.2 Off3	641643	0	0	1	0	389	0,06	0,06	0
gRNA_55.2 Off4	666149	0	0	2	0	230	0,03	0,03	0
Control Negativo									
Nombre	Total n	Inserciones		Deleciones		Sustituciones		%	
		n	%	n	%	n	%	total	indel
gRNA_44.1 On	669056	4	0	276	0,04	2413	0,36	0,40	0,04
gRNA_44.1 Off1	505658	1	0	14	0,	1243	0,25	0,25	0
gRNA_44.1 Off2	478442	0	0	3	0	288	0,06	0,06	0
gRNA_55.2 On	522597	220	0,04	303	0,06	1118	0,21	0,31	0,10
gRNA_55.2 Off1	508399	0	0	1	0	222	0,04	0,04	0
gRNA_55.2 Off2	604006	0	0	1	0	395	0,07	0,07	0
gRNA_55.2 Off3	759976	0	0	5	0	629	0,08	0,08	0
gRNA_55.2 Off4	578689	0	0	7	0	1209	0,21	0,21	0

En la tabla se indican el número de lecturas (n) totales alineadas, así como con la presencia de inserciones, deleciones y sustituciones; representándose el porcentaje (%) de lecturas modificadas respecto al total. Se indica el % de modificaciones totales y de indel (inserciones/deleciones). Información tanto de las regiones *on-target* (On) como *off-target* (Off) asociados a cada gRNA. Aparece encuadrado las dos regiones *On-target* de la muestra transfectada. Esta información se muestra de células DMD transfectadas con los plásmidos que contienen los elementos CRISPR-Cas9 así como en células DMD no transfectadas (control negativo).

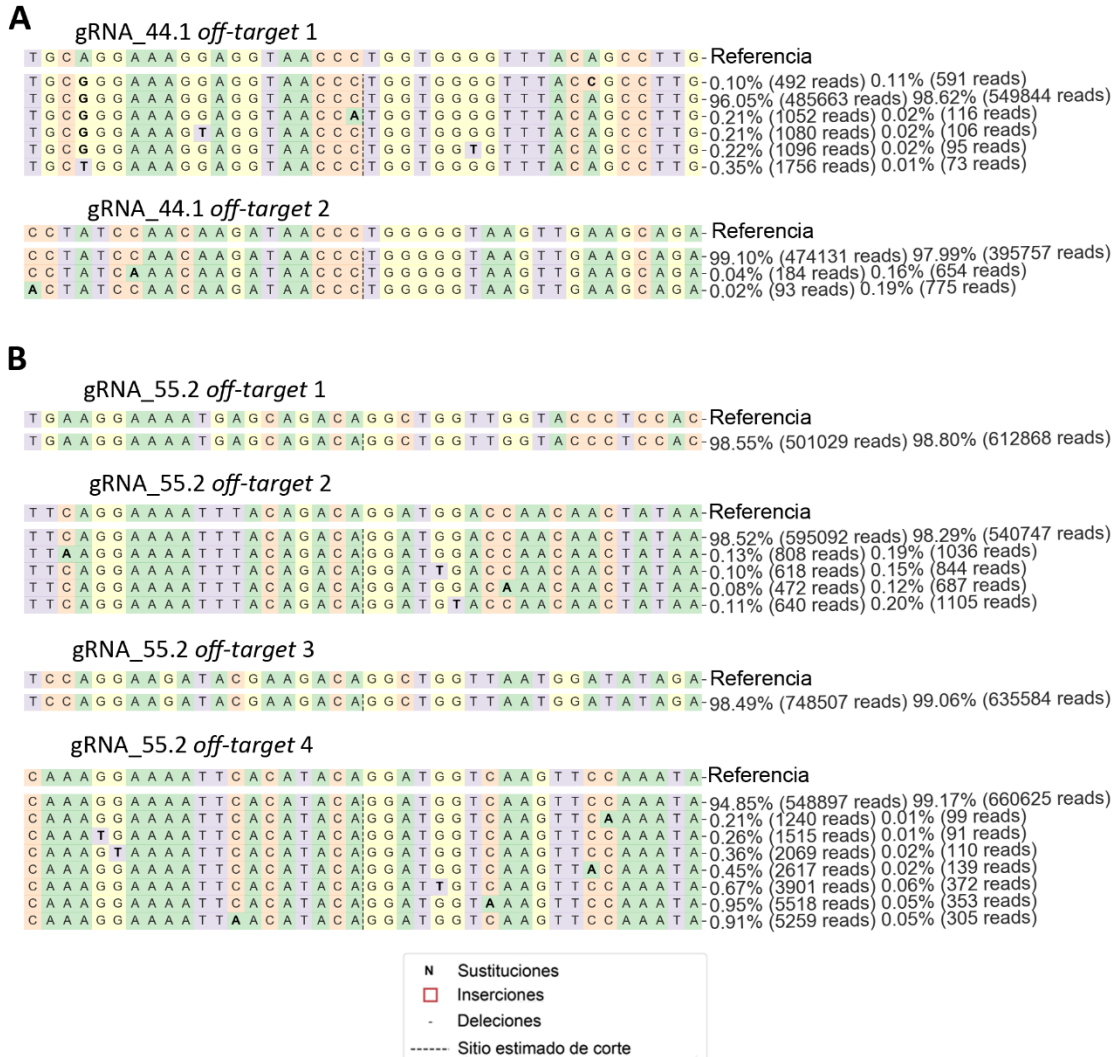


Figura A2. Uso de la herramienta CRISPresso Compare para el análisis de los *off-targets*. Representación de las lecturas obtenidas del análisis de secuenciación masiva en las potenciales regiones *off-targets* asociados a los gRNA_44.1 (A) y gRNA_55.2 (B) Para cada región se indica la secuencia de referencia, así como las principales modificaciones y los porcentajes de lecturas (*reads*) para cada una de ellas tanto en la muestra sin transfectar (valores de la izquierda) como en las muestras transfectadas con los dos gRNAs (valores derecha). La representación de las modificaciones y el sitio de corte de la Cas9 esta explicado en la leyenda. Imagen adaptada de los resultados obtenidos con el programa CRISPresso2 Compare.

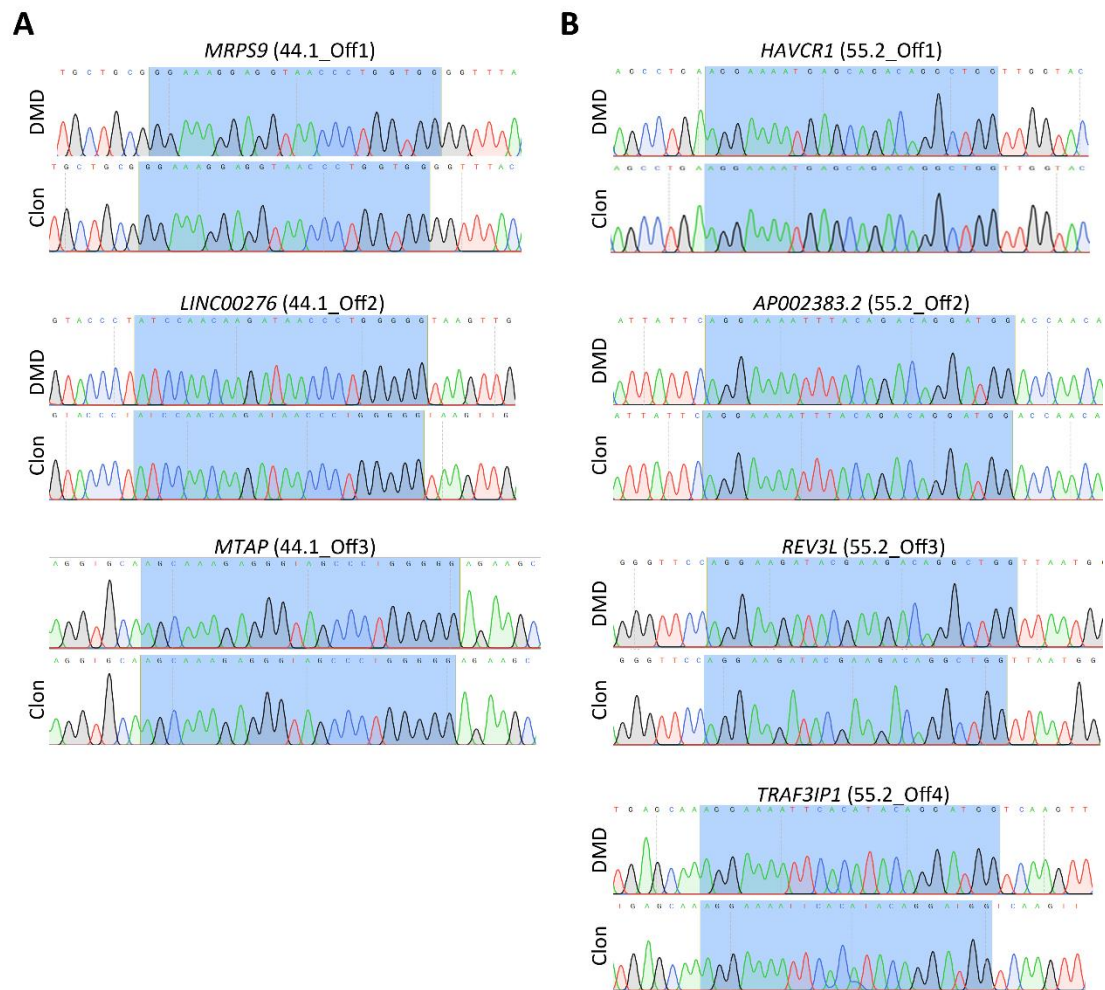


Figura A3. Análisis de los sitios *off-target* en el clon editado. Secuenciación Sanger de los sitios *off-target* predichos, asociados a los gRNAs_44.1 (A) y 55.2 (B), indicando el nombre del gen. No se encontraron diferencias en las secuencias de las regiones de los *off-target* predichos entre las células DMD no editadas y el Clon Editado con la del45–55-D1.

PUBLICACIONES

Los resultados obtenidos en el desarrollo de los objetivos 1 y 2 de la presente tesis doctoral vienen recogidos en la siguiente publicación:

Poyatos-García J, Martí P, Liquori A, Muelas N, Pitarch I, Martínez-Dolz L, Rodríguez B, Gonzalez-Quereda L, Damiá M, Aller E, Selva-Gimenez M, Vilchez R, Diaz-Manera J, Alonso-Pérez J, Barcena JE, Jauregui A, Gámez J, Aladrén JA, Fernández A, Montolio M, Azorin I, Hervás D, Casasús A, Nieto M, Gallano P, Sevilla T, Vilchez JJ. Dystrophinopathy Phenotypes and Modifying Factors in *DMD* Exon 45-55 Deletion. *Ann Neurol*. 2022 Jul 27. doi: 10.1002/ana.26461. Epub ahead of print. PMID: 35897138.

Los resultados derivados del objetivo 3 están pendientes de publicar, pero en relación a este punto y en colaboración con grupo de Enfermedades Neuromusculares de la Dra. Virginia Arechavala mediante una estancia doctoral, se ha obtenido la siguiente publicación:

Soblechero-Martín P, Albiasu-Arteta E, Anton-Martinez A, de la Puente-Ovejero L, Garcia-Jimenez I, González-Iglesias G, Larrañaga-Aiestaran I, López-Martínez A, **Poyatos-García J**, Ruiz-Del-Yerro E, Gonzalez F, Arechavala-Gomez V. Duchenne muscular dystrophy cell culture models created by CRISPR/Cas9 gene editing and their application in drug screening. *Sci Rep*. 2021 Sep 14;11(1):18188. doi: 10.1038/s41598-021-97730-5. PMID: 34521928; PMCID: PMC8440673.