



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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

Caracterización histológica, molecular y metabólica de la progresión fenotípica de la enfermedad de McArdle en el modelo murino

Autor: Alberto Real Martínez

Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR)

Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

Director: Dr. Tomás Pinós Figueres

Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Raras (CIBERER)

Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR)

1. Introducció	10
1.1 Músculo esquelético	10
1.1.1 Formació y desarrollo del músculo esquelético.....	11
1.1.2 Maquinaria de contracció del músculo esquelético	12
1.1.3 Fibras musculares del músculo esquelético.....	15
1.1.4 Afectació de las fibras musculares en la patología y con el envejecimiento	18
1.2 Mecanismos generales de la regeneración de las fibras musculares	18
1.2.1 Regeneración diferencial de los distintos tipos de músculos	23
1.2.2 Regeneración de las fibras musculares en patologías crónicas	24
1.2.3 Regeneración de las fibras musculares: envejecimiento	25
1.2.4 Susceptibilidad y resistencia de los distintos tipos de fibras musculares al daño en la enfermedad.....	27
1.3 Metabolismo del músculo esquelético	28
1.3.1 Glucogénesis	29
1.3.2 Glucogenolisis.....	30
1.3.3 Glucólisis.....	31
1.3.4 Oxidación de ácidos grasos	32
1.4 Mioquinas.....	35
1.5 “Crosstalk” músculo esquelético-tejido adiposo	37
1.5.1 Tejido adiposo	37
1.5.2 Captación y liberación de ácidos grasos libres por parte del músculo esquelético... 40	
1.6 “Crosstalk” músculo esquelético-hígado	41
1.7 Glucógeno fosforilasa.....	45
1.7.1 Dominios de la enzima glucógeno fosforilasa.....	46
1.7.2 Función y regulación de la enzima glucógeno fosforilasa.....	48
1.7.3 Isoformas de la glucógeno fosforilasa.....	49

1.8 Glucogenosis	50
1.8.1 Glucogenosis hepáticas	50
1.8.2 Glucogenosis musculares	50
1.9 Enfermedad de McArdle: visión general.....	52
1.9.1 Sintomatología	54
1.9.2 Histología.....	55
1.9.3 Diagnóstico.....	56
1.9.4 Modelos animales	58
1.9.5 Generación del modelo murino de la enfermedad de McArdle	59
1.9.6 Tratamientos	65
2. Objetivos	69
3. Materiales y Métodos	70
3.1 Aprobación ética	70
3.2 Ratones.....	70
3.3 Genotipaje del modelo murino de la enfermedad de McArdle.....	70
3.4 Curva de supervivencia	70
3.5 Mediciones anatómicas y bioquímicas de los ratones McA	71
3.6 Tinción de Hematoxilina/Eosina en tejido muscular.....	71
3.7 Tinción PAS en tejido muscular	72
3.8 Inmunofluorescencia de tejido muscular.....	72
3.8.1 Cuantificación del área fibrótica alrededor de las fibras musculares	73
3.8.2 Cuantificación de núcleos centrales de las fibras musculares	74
3.8.3 Cuantificación del tamaño promedio de las fibras musculares	76
3.8.4 Cuantificación del tamaño promedio para cada tipo de fibra muscular.....	76
3.8.5 Cuantificación de núcleos centrales de las fibras musculares específicas.....	77
3.8.6 Cuantificación de fibras musculares positivas para MHc	78

3.8.7 Cuantificación de la proporción de los distintos tipos de fibras	79
3.8.8 Cuantificación de la proporción de tipos de fibras oxidativas y glucolíticas.....	79
3.8.9 Cuantificación de fibras musculares positivas para el transportador de glucosa GLUT 4.....	80
3.9 Cuantificación bioquímica de glucógeno	80
3.10 Estudios de expresión de mRNA	81
3.11 Obtención de extractos proteicos de tejido hepático, tejido muscular y tejido adiposo	82
3.12 Medición cuantitativa de proteínas	82
3.13 Western blot	83
3.14 Actividad Glucógeno sintasa	85
3.15 Análisis estadístico	85
3.16 Bases de datos consultadas	85
4. Resultados	86
4.1 Desviación de la herencia Mendeliana en los ratones McArdle	86
4.2 Elevada tasa de mortalidad de los ratones McArdle	87
4.3 Diferencias fenotípicas y asociadas a la edad en la anatomía y la bioquímica de los ratones McArdle.....	88
4.4 Incremento de la desestructuración, la fibrosis y la nucleofilia a nivel histológico en los músculos de los ratones McArdle	92
4.5 Mayor proporción del área fibrótica en los músculos de los ratones McArdle.....	98
4.6 Diferencias en el grado de afectación de los distintos músculos de los ratones McArdle con la edad	102
4.7 Diferencias en el tamaño promedio de las fibras musculares de los distintos músculos de los ratones McArdle con la edad.....	105
4.8 Diferencias en el grado de afectación y tamaño promedio de los distintos tipos de fibras musculares, en los músculos de los ratones McArdle con la edad.....	106
4.9 Diferencias de la capacidad regenerativa de los distintos tipos de fibras musculares en los músculos de los ratones McArdle.....	109

4.10 Incremento de las proporciones de los tipos de fibras I y IIb y descenso de la de fibras tipo IIa con la edad en los músculos de ratones McArdle	114
4.11 Incremento de la proporción de fibras glucolíticas con la edad en el musculo <i>soleus</i> de los ratones McArdle	117
4.12 Ausencia de acumulación progresiva de glucógeno en los músculos de los ratones McArdle	119
4.13 La mayor afectación observada en las fibras musculares tipo IIa de los ratones McArdle se correlaciona a nivel histológico con una mayor acumulación de glucógeno en ellas	123
4.14 Las fibras musculares con marcaje positivo para la enzima COX II presentan una mayor afectación en los ratones McArdle	125
4.15 Mayor captación de glucosa en las fibras tipo I y IIb y menor captación en las tipo IIa, de los músculos de los ratones McArdle.....	128
4.16 Estudio metabólico del tejido muscular de ratones McArdle.....	130
4.16.1 Los ratones McArdle no presentan alteraciones en la regulación de la vía glucolítica muscular	130
4.16.2 Mayor captación y utilización de ácidos grasos en el tejido muscular de ratones McArdle	131
4.16.3 Déficit mitocondrial en la oxidación de ácidos grasos en el tejido muscular de los ratones McArdle.....	132
4.17 Estudio metabólico del hígado de ratones McArdle	133
4.17.1 Mayor formación de complejos UDP-glucosa en el hígado de los ratones McArdle jóvenes	134
4.17.2 Mayor formación y liberación de glucosa hepática en los ratones McArdle jóvenes	135
4.17.3 Menor síntesis de glucógeno hepático en los ratones McArdle jóvenes.....	136
4.17.4 Incremento de la utilización de glucógeno hepático con la edad en los ratones McArdle	138
4.17.5 Incremento de la actividad de la forma “activa” de la enzima GS-L en el hígado de ratones McArdle jóvenes	139
4.17.6 Fluctuación de la síntesis y la degradación de glucógeno hepático con la edad en los ratones McArdle	141
4.18 Estudio metabólico del tejido adiposo de ratones McArdle.....	143

4.18.1 Menor síntesis de glucógeno en el tejido adiposo de los ratones McArdle jóvenes	143
4.18.2 No hay mayor captación de glucosa en el tejido adiposo de los ratones McArdle jóvenes	144
4.18.3 Mayor utilización de ácidos grasos procedentes del tejido adiposo con la edad en los ratones McArdle	145
5. Discusión	148
6. Conclusiones.....	169
<i>Anexo: Artículo “Low survival rate and muscle fiber-dependent aging effects in the McArdle disease mouse model”</i>	<i>172</i>
<i>Bibliografía</i>	<i>197</i>

Abreviaturas

ADP: adenosin difosfato.	IGF-1: factor de crecimiento insulínico.
AGL: enzima desramificadora del glucógeno.	IMP: inosin monofosfato.
Akt: proteína quinasa B, codificada por el gen AKT.	IMTG: triacilglicéridos intramusculares.
ALT: alanina aminotransferasa.	IR: receptor de insulina.
AMP: adenosin mono fosfato.	LAM: laminina.
AMPK: 5' adenosina monofosfato activada por quinasa.	LDH: lactato deshidrogenasa.
AST: aspartato aminotransferasa.	MAG: monoacilglicéridos.
ATGL: lipasa de triacilglicéridos.	McA: ratones con la enfermedad de McArdle.
ATP: adenosina trifosfato.	MCT1: proteína transportadora de monocarboxilato.
BAIBA: ácido orgánico β-aminoisobutírico ácido pequeño.	METRNL: meteorina.
BDNF: factor neurotrófico de origen cerebral.	mFd: diámetro mínimo de Feret.
BSA: suero de albumina bovino.	MGL: monoacilglicerol lipasa.
CaMKII: calcio calmodulina quinasa 2.	MRFs: factores de regulación miogénica.
CFTD: miopatía congénita por desproporción de tipos de fibras.	Mrf4: factor regulador miogénico.
CDK: quinasa dependiente de ciclina.	MSTN: Miostatina.
CK: creatina quinasa.	mt-CK: creatina quinasa mitocondrial.
CNF: fibras con núcleos centrales.	MyoD: proteína 1 de diferenciación miogénica.
CPT1: carnitina palmitol transferasa 1.	Myf5: factor miogénico 5.
CPT2: carnitina palmitol transferasa 2.	MyHC-β/slow o MYH7: miosina encargada de la formación de fibras de contracción lenta.
COL I: colágeno tipo I.	MyHCe: isoforma embrionaria de la miosina.
COL II: colágeno tipo II.	MyHCneo: isoforma neonatal de la miosina.
COL IV: colágeno tipo IV.	NADH: nicotin amida deshidrogenasa.
COX II: enzima citocromo c oxidasa subunidad II.	NC: núcleos centrales.
CP: creatina fosfato.	NOS: óxido nítrico sintasa.
DAG: diacilglicéridos.	PAS: tinción de ácido periódico Schiff.
DMD: distrofia muscular de Duchenne.	PCB: piruvato carboxilasa.
DM1: distrofia miotónica tipo 1.	PDH: piruvato deshidrogenasa.
DM2: distrofia miotónica tipo 2.	PDHK: piruvato deshidrogenasa quinasa.
ECM: matriz extracelular.	PDK1: proteína quinasa-1 dependiente de 3-fosfoinositol.
EDL: <i>extensor digitorum longus</i> .	Pdp1: piruvato deshidrogenasa acetil transferasa fosfatasa 1.
FBN: fibronectina.	PEPCK: fosfoenol piruvato carboxiquinasa.
FCS: suero bovino fetal.	PFK: fosfofructoquinasa.
FGF21: factor de crecimiento de fibroblastos 21.	PGC1α: coactivador gamma del receptor activado por el proliferador de peroxisomas 1 alfa.
FSHD: distrofia facioescapulohumeral.	PGM-1: fosfoglucomutasa.
G-1-P: glucosa-1-fosfato.	PHK: fosforilasa quinasa.
G3PDH/GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.	Pi: fosfato inorgánico libre.
G-6-P: glucosa-6 fosfato.	PI3k: fosfoinositol 3-quinasa.
G6Pc: glucosa-6-fosfatasa catalítica.	PIP3: fosfoinositol 3 fosfato.
GAA: α-glucosidasa ácida.	PKA: proteína quinasa A.
GAST: <i>gastrocnemius</i> .	PKC: proteína quinasa C.
GBE: enzima ramificadora del glucógeno.	PKG: proteína quinasa G.
GLUT-2: transportador de glucosa isoforma 2.	PKL: piruvato quinasa isoforma hepática.
GLUT4: transportador de glucosa isoforma 4.	PLIN2: proteína relacionada con la diferenciación adipofilina/adipocito.
GP-B: glucógeno fosforilasa isoforma cerebral.	PLIN5: miembro de la familia de proteínas PAT (Perilipin/ADRP/TIP47) enriquecida en tejidos oxidativos.
Gpd2: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa.	PP1B: proteína fosfatasa 1.
GP-L: glucógeno fosforilasa isoforma hepática	PPARδ: receptor activado por proliferadores de peroxisomas delta.
GP-M: glucógeno fosforilasa isoforma muscular.	PTCs: codones prematuros de terminación.
GSK3: glucógeno sintasa quinasa 3.	QUAD: <i>quadriceps</i> .
GS-L: glucógeno sintasa isoforma hepática.	SDH: succinato deshidrogenasa.
GS-M: glucógeno sintasa isoforma muscular.	Smad3: miembro de la familia de proteínas reguladas por el receptor R-Smad.
GYG1: glucoquinasa.	TA: <i>tibialis anterior</i> .
HADHa: hidroxiacil-coenzima A deshidrogenasa.	TAG: triacilglicéridos.
H&E: tinción de hematoxilina/eosina.	TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos.
HK-1: hexoquinasa isoforma hepática.	TGF-β: factor de crecimiento transformante beta.
HK2: hexoquinasa isoforma muscular.	UGP-2: UDP-glucosa pirofosforilasa.
HSL: lipasa sensible a hormona.	WT: ratones <i>wild type</i> .
HTZ: heterocigoto.	

1. Introducción

El músculo es un tejido altamente especializado, responsable del movimiento de los órganos y organismos a través de la producción de tensión y, en última instancia, de la generación de fuerza, originadas a su vez por la capacidad de contraerse que presentan sus células, denominadas miocitos o fibras musculares.^[1, 2] Puede clasificarse en tres tipos distintos: **a) el músculo liso**, formado por células fusiformes no ramificadas cuyo núcleo presenta una posición central; y que se localiza en todas aquellas estructuras corporales que no precisan de movimientos voluntarios, como el aparato digestivo, algunas glándulas, los vasos sanguíneos, el útero, etc; **b) el músculo cardíaco**, formado por células cortas, ramificadas y mononucleadas denominadas cardiomiocitos, unidas entre sí por los llamados discos intercalares y cuya función es la de bombear sangre desde el corazón; y **c) el músculo esquelético**, involucrado en los movimientos voluntarios y asociado al esqueleto, que se compone de células musculares esqueléticas que se asocian formando fascículos musculares, cuya unión forma el músculo.^[3]

1.1 Músculo esquelético

El músculo esquelético representa el 45 % de la masa corporal de un individuo adulto.^[4] Está formado por fibras musculares, que son células multinucleadas procedentes de la fusión de varias células mononucleadas precursoras de las mismas y denominadas mioblastos. Durante el desarrollo se produce un descenso constante de la población de mioblastos y en su lugar, aparecen sincitios alargados con gran presencia basofílica en su citoplasma con cadenas centrales de núcleos conocidos como miotubos.^[5-10] El núcleo de estas células presenta una posición central y posteriormente, durante el proceso de maduración de las mismas, será desplazado hacia la periferia debido a que la maquinaria de contracción, y más concretamente el **sarcómero**, ocupará la práctica totalidad del citoplasma de las mismas. Sin embargo, los núcleos de los miotubos embrionarios son incapaces de dividirse para contribuir al desarrollo del músculo después de su fusión, por lo que el incremento, tanto en tamaño como en número de éstos se debe a la proliferación de mioblastos. En etapas posteriores del desarrollo, perinatal y posnatal, el aumento de tamaño de los músculos se debe a la adición de núcleos desde las poblaciones de células satélite.^[5] Estas células son las células madre del músculo esquelético y se sitúan en la superficie de las fibras, entre la membrana plasmática y la lámina basal, siendo su número muy elevado en las primeras etapas de la vida, llegando a representar entre el 20 y el 30 % del total de los núcleos presentes en las fibras, aunque en un individuo adulto este porcentaje se ve reducido hasta un 5 %.^[11, 12]

1.1.1 Formación y desarrollo del músculo esquelético

La formación del músculo esquelético se inicia a partir del mesodermo paraxial durante la embriogénesis y su desarrollo depende de la pareja de factores de transcripción Pax3 y Pax7 que estimulan la activación de otros factores de transcripción miogénicos tales como la proteína 1 de diferenciación miogénica (MyoD), el factor miogénico 5 (Myf5), el factor regulador miogénico (Mrf4) y la miogenina (**Fig. 1**).^[4, 13-15]

Este proceso de formación del músculo puede dividirse en dos etapas, la primera de ellas tiene lugar durante la embriogénesis y es en la que se producen los miotubos primarios a partir de la proliferación y fusión de mioblastos, correspondiendo a la segunda etapa la fusión y alineamiento de varios mioblastos a lo largo de los miotubos primarios, para formar miotubos secundarios, y en músculos grandes terciarios. Estas dos últimas estructuras se forman en las regiones vecinas a las zonas de inervación de los miotubos primarios e inicialmente no suelen alcanzar la longitud íntegra del músculo como sí lo hacen los primarios.^[16-18]

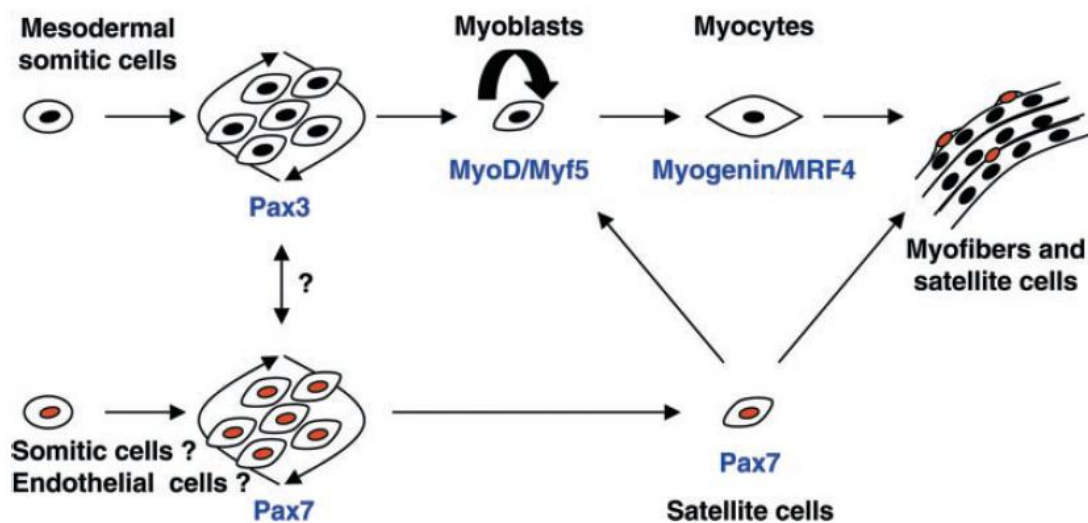


Figura 1. Generación y expansión de las células precursoras miogénicas. La expresión de Pax3 en células precursoras contribuye a la expansión de las células miogénicas. Posteriormente, la inducción de Myf5 y/o MyoD compromete a las células somáticas del mesodermo para dirigirse al linaje miogénico (mioblastos). Seguidamente, la sobreexpresión de factores de regulación miogénica (MRFs) secundarios (miogenina y MRF4) induce la diferenciación de los mioblastos a miofibras. Finalmente, estas miofibras se fusionan dando lugar a miofibras multinucleadas. Durante la última fase de la embriogénesis muscular, los mioblastos que derivan de células satélite, se fusionan con miofibras ya existentes para permitir su crecimiento. Algunas células satélite permanecen asociadas a miofibras en un estado de quiescencia. Pax7 es esencial para la expansión/especificación de la población de células satélite. Chargé, S.B.P y Rudnicki, M.A. (2004). "Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration".

Las fibras musculares se originan a partir de estas estructuras secundarias y terciarias, estando su número prácticamente determinado en el momento del nacimiento.^[19] Inicialmente son multi-inervadas y las unidades motoras de formación temprana para cada tipo específico de fibra son prácticamente homogéneas durante el periodo de inervación polineuronal.^[19] A partir

de las 12 semanas de gestación en humanos, y entorno a los 16 días en el caso de los ratones, los miotubos comienzan a expresar la cadena pesada de la miosina, concretamente su isoforma embrionaria (MyHCe), y a su vez la cadena pesada beta de la miosina, encargada de la formación de fibras de contracción lenta (MyHC- β /slow o *MYH7*), aunque parte de ellos perderá la expresión de esta última isoforma y adquirirán la isoforma neonatal (MyHCneo), si bien todos ellos se diferenciarán posteriormente en fibras lentas y rápidas.^[20]

El proceso de desarrollo muscular es regulado por varias señales entre las que se encuentra la familia de proteínas de señalización Wnt, compuesta por 21 glicoproteínas secretadas que actúan como ligandos, y que regula la especificación de los mioblastos en el mesodermo paraxial y facilita la expresión específica de los factores reguladores del músculo esquelético.^[21, 22]

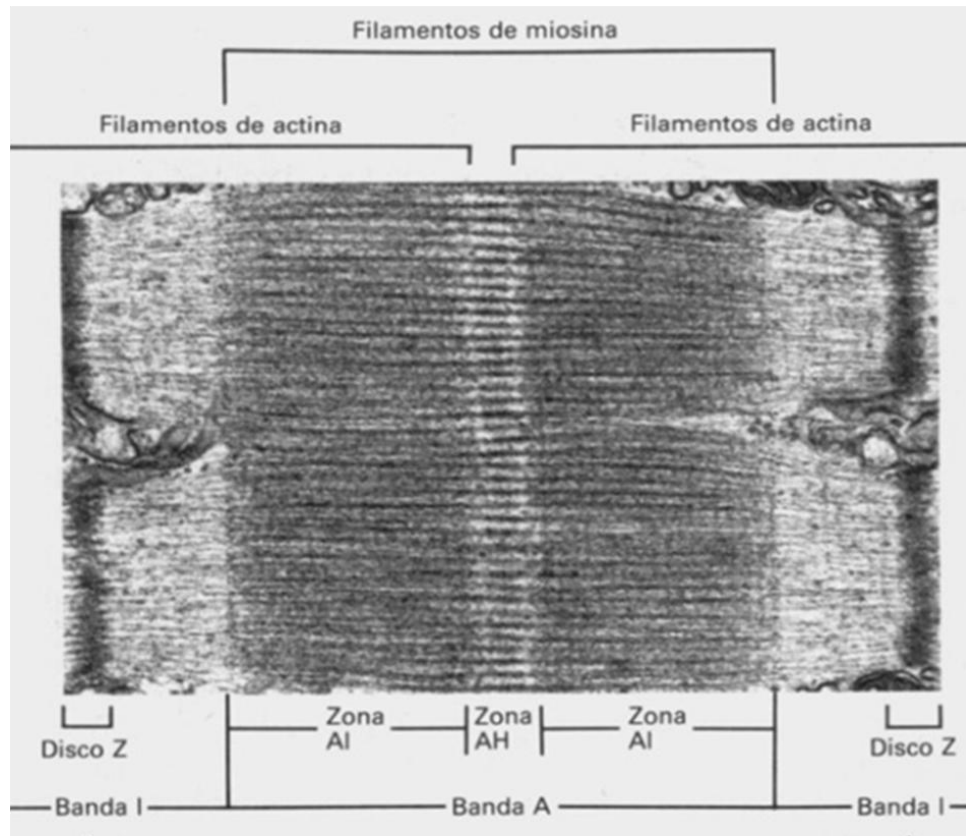
1.1.2 Maquinaria de contracción del músculo esquelético

Cada fibra muscular está compuesta por varios haces de miofibras, siendo cada una de ellas a su vez un agregado de sarcómeros, que constituyen la unidad básica de la maquinaria de contracción. Los sarcómeros están formados por una banda de forma hexagonal compuesta por filamentos de **miosina**, constituida a su vez por fragmentos de **meromiosina ligera** que forma filamentos, carece de actividad ATPasa y no se une a actina, y **meromiosina pesada** que presenta unión a actina, cataliza la hidrólisis de ATP y no forma filamentos; así ambas se distribuyen en forma de bastones flexibles dando lugar a la **banda A**. La distribución de las moléculas hace que las meromiosinas ligeras se opongan unas a otras apuntando sus cabezas hacia el extremo del filamento y reposando éstas sobre su superficie. La región donde se fusionan estas meromiosinas ligeras recibe el nombre de **zona o banda H** y se encuentra en el centro de la banda A (**Figs. 2 A y B**). Ocupando la posición central de la banda H se encuentra la **línea M**, que se compone de las proteínas M, miomesina, esquelemina y una fracción de creatina quinasa, y que juega el papel de conector de los filamentos de miosina, dando estabilidad a la banda A (**Fig. 2**).^[23] En esta estructura encontramos también la **banda I**, compuesta por delgados filamentos de polímeros de actina unidos en forma de doble hélice y en cuyos surcos se encuentra a su vez una hélice de tropomiosina a la que se une cada ciertos intervalos. Los extremos de los filamentos de actina por un lado quedan unidos a la **línea Z** y por el otro interaccionan con los filamentos de miosina formando un entramado donde cada filamento de miosina es rodeado por seis filamentos de actina (**Figs. 2 A y B**).^[23]

Finalmente, en la estructura sarcomérica existen otras dos proteínas con función estructural, la proteína gigante **titina**, que se extiende desde la línea Z hasta la región de la línea M y su

función es la de servir como andamiaje durante la unión de las miofibras, y la proteína **nebulina**, que se ancla a la línea Z extendiéndose por toda la longitud de los filamentos delgados y que presenta una estrecha asociación con la actina (**Figs. 2 A y B**), siendo sus funciones las de estabilización de los filamentos, regulación de la contracción muscular y homeostasis del calcio.^[24-26]

A)



B)

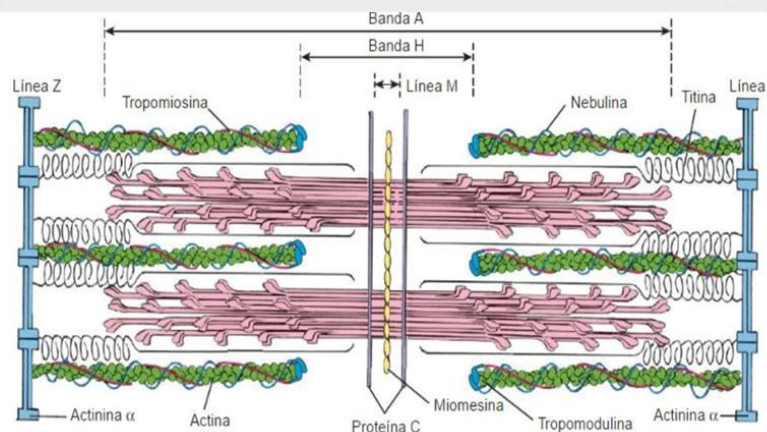


Figura 2. A) Imagen de microscopía electrónica de la estructura sarcomérica: principales proteínas y componentes. Martínez, J. "La Lesión Muscular Menor en el deporte. Concepto, clasificación y tratamiento".^[27] B) Representación esquemática de la estructura sarcomérica. Montuschi, B. "Tema 7: Tejido Muscular".^[28]

La contracción del músculo esquelético se produce cuando los filamentos delgados de actina se deslizan a lo largo de los filamentos gruesos de miosina, de esta forma queda disponible el sitio de unión de ATP en la cabeza de la miosina uniéndose así dicha molécula (**Fig. 3**).^[23, 29] Posteriormente, la ATPasa localizada en esta misma región hidroliza la molécula de ATP produciendo ADP y Pi, y la miosina se balancea uniéndose a otra molécula de actina (**Fig. 3**) Este proceso se debe a que la liberación de Pi genera un impulso de energía que permite a la miosina “saltar” a la siguiente molécula de actina (**Fig. 3**). Finalmente, una vez producido el impulso se libera el ADP y las moléculas de actina y miosina quedan unidas firmemente (**Fig. 3**).^[29]

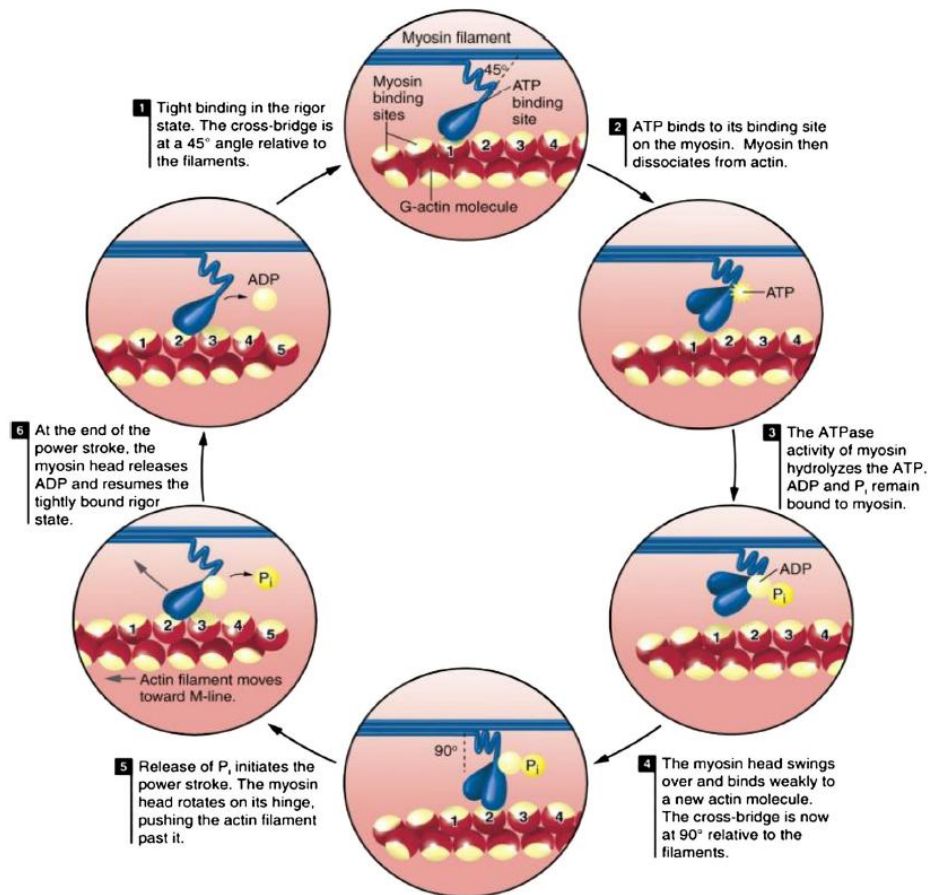


Figura 3. Proceso de contracción muscular. 1) Unión firme entre la miosina y la actina antes de la contracción. El puente de unión se posiciona a 45° de los filamentos. 2) La molécula de ATP se adhiere a su sitio de unión en la miosina. La miosina se disocia de la actina. 3) La actividad ATPasa de la miosina hidroliza el ATP. Las moléculas de ADP y Pi se mantienen unidas a la miosina. 4) La cabeza de la miosina se balancea y se une débilmente a una nueva molécula de actina. El puente de unión se encuentra en un ángulo de 90° con respecto a los filamentos. 5) Se produce la liberación de Pi y se inicia el impulso. La cabeza de la miosina rota sobre sí empujando el filamento de actina hacia atrás. 6) Al finalizar el impulso la cabeza de la miosina libera el ADP y se une firmemente a la actina. Frontera, W. y Ochala, J. (2014). “Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function”.^[30]

1.1.3 Fibras musculares del músculo esquelético

El músculo esquelético es un tejido que presenta una gran diversidad y heterogeneidad en relación con su contenido de tipos de fibras, cualidades que le permiten tener una gran capacidad de especialización y que a su vez sientan las bases de su plasticidad funcional.^[31]

Las fibras musculares presentan diferencias tanto estructurales, en el sarcómero y en el retículo endoplasmático, como metabólicas que permiten una clasificación diferencial de las mismas en distintos tipos.^[32-36]

De esta forma, pueden diferenciarse de acuerdo a dos propiedades:

-Actividad *ATPasa*: permite clasificar las fibras musculares en dos tipos que difieren en la capacidad específica de sus miosinas para activar la función *ATPasa* a través de la activación de la actina y mediante señalización calcio-dependiente. Estas diferencias también se correlacionan con propiedades de contracción distintas en cada tipo de fibra, dando lugar así a su clasificación en fibras Tipo I, de contracción lenta, y fibras Tipo II, de contracción rápida.^[37-45]

-Actividad metabólica: el criterio que extiende la clasificación de los tipos de fibras I y II se basa en la capacidad que presentan las fibras para utilizar mayoritariamente un metabolismo aeróbico oxidativo o anaeróbico glucolítico.^[42, 46] Con esta diferenciación puede establecerse la siguiente clasificación de los principales tipos de fibras musculares en mamíferos:

- **Tipo I:** fibras de contracción lenta con baja actividad *ATPasa* y actividad enzimática metabólica oxidativa.^[43-45] Su isoforma de la miosina predominante es la *Myh7*.^[47]
- **Tipo IIa:** fibras de contracción rápida con alta actividad *ATPasa* y actividad enzimática metabólica mixta oxidativa-glucolítica, pero preferentemente oxidativa. En ellas predomina la isoforma *Myh2*.^[31, 47]
- **Tipo IIx:** fibras de contracción rápida con alta actividad *ATPasa* y actividad enzimática metabólica mixta oxidativa-glucolítica, pero preferentemente glucolítica. La isoforma con mayor presencia en estas fibras es la *Myh1*.^[31, 47]
- **Tipo IIb:** fibras de contracción rápida con alta actividad *ATPasa* y actividad enzimática metabólica glucolítica. Su isoforma mayoritaria es la *Myh4*.^[31, 47]

Además de los tipos de fibras puras descritos existen fibras híbridas entre estos tipos principales, así entre fibras tipo I y IIa (I/IIa), entre fibras tipo IIa y IIx (IIa/IIx) y entre fibras tipo IIx y IIb (IIx/IIb).^[48] Estudios posteriores a esta clasificación sugieren una mayor diferenciación entre los distintos tipos de fibras musculares en relación con procesos metabólicos más concretos y profundamente analizados. Así, aunque bien es sabido que el tejido muscular

necesita de grandes requerimientos energéticos, los diferentes tipos de fibras musculares que lo componen muestran ciertas particularidades en este aspecto.^[47]

En un estudio realizado por Murgia *et al*, donde se analizó el proteoma de los distintos tipos de fibras musculares, se observó que las fibras tipo I presentaban niveles más altos de proteínas implicadas en la β -oxidación, como es el caso de la hidroxiacil-coenzima A deshidrogenasa (HADHa), así como de aquellas proteínas implicadas en procesos tales como la conversión de ácidos grasos en ésteres de acil-coenzima A, el metabolismo de los cuerpos cetónicos, el transporte de piruvato a través de la membrana mitocondrial y por último, alguna de las isoformas de las isocitrato deshidrogenasas pertenecientes al ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) (**Fig. 4**).^[47] No obstante lo anterior, considerando la gran cantidad de mitocondrias presentes en las fibras tipo IIa,^[49] eran éstas las que presentaban niveles más elevados de proteínas implicadas en el sistema OXPHOS, lo que les otorga así mismo mayor facilidad para el transporte de piruvato a través de la membrana mitocondrial (**Fig. 4**).^[47] En cuanto a las fibras tipo IIx, éstas presentaban niveles más elevados tanto de proteínas pertenecientes al TCA como de proteínas reguladoras de la piruvato deshidrogenasa, como es el caso de la piruvato deshidrogenasa acetil transferasa fosfatasa 1 (Pdp1), encargada de desfosforilar y reactivar la subunidad alfa del componente E1 del complejo piruvato deshidrogenasa (**Fig. 4**).^[47] Para las fibras tipo IIb cabe destacar los elevados niveles que presentaba la proteína glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (Gpd2), componente mitocondrial de la lanzadera del glicerol fosfato que ayuda a la re-oxidación del NADH producido en el citosol durante la glucólisis, lo que les permite tener una producción constante de ATP vía glucolítica sin una excesiva acumulación de ácido láctico (**Fig. 4**).^[47, 50]

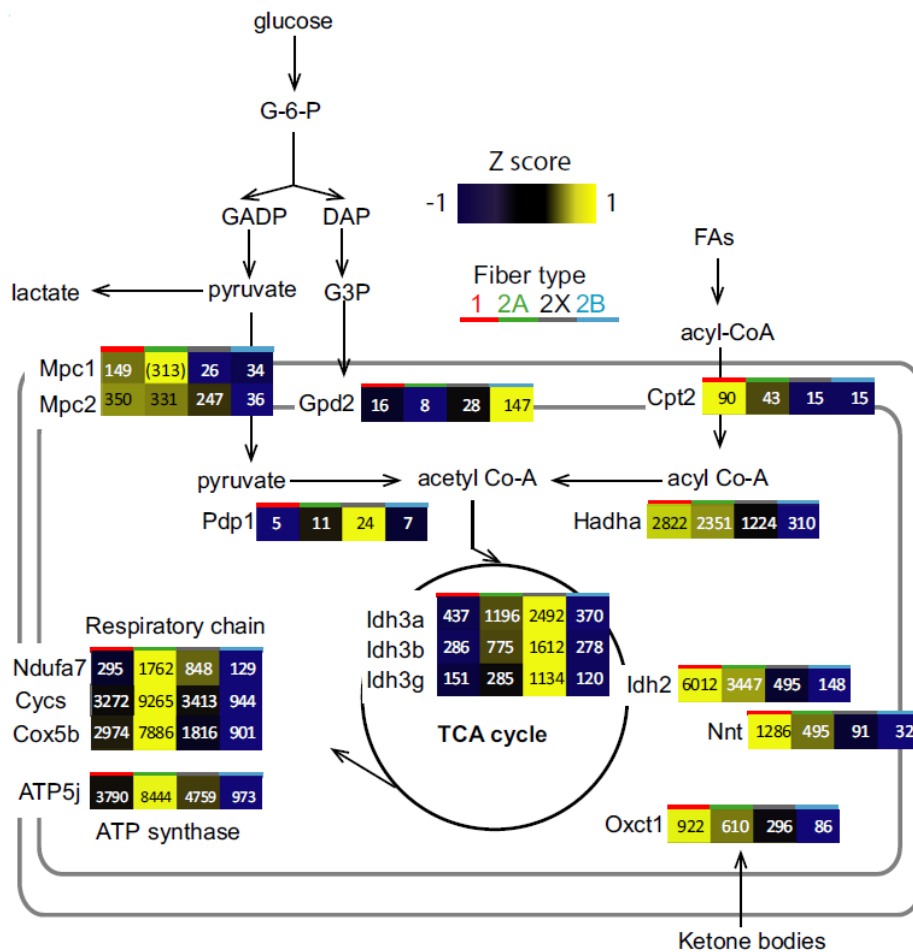


Figura 4. Distribución de las vías y proteínas mitocondriales según el tipo de fibra muscular. La expresión de cada proteína ha sido normalizada por actina; la escala de colores se refiere al valor designado en la imagen del Z-score. Los recuadros representan los valores proteicos de cada tipo de fibra siguiendo siempre el orden fibras tipo I, IIa, IIx y IIb de izquierda a derecha, como se indica en la parte superior de la figura. Las proteínas analizadas se representan en la imagen con el nombre de su gen correspondiente. *Mpc1*: gen que codifica para la proteína transportadora de piruvato a la mitocondria 1 (MPC1), *Mpc2*: gen que codifica para la proteína transportadora de piruvato a la mitocondria 2 (MPC2), *Gpd2*: gen que codifica para la proteína glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 2 (GPD2), *Cpt2*: gen que codifica para la proteína carnitina palmitotransferasa 2 (CPT2), *Pdp1*: gen que codifica para la subunidad catalítica 1 de la enzima piruvato fosfatasa deshidrogenasa (PDP1), *Hadha*: gen que codifica para la subunidad alfa del complejo trifuncional multienzimático de la enzima hidroxil-CoA deshidrogenasa (HADHA), *Ndufa7*: gen que codifica para la subunidad A7 de la enzima NADH-ubiquinona oxidoreductasa (NDUFA7), *CyCS*: gen que codifica el citocromo C somático (CYCS), *Cox5b*: gen que codifica para la subunidad 5b de la enzima citocromo C oxidasa (COX5B), *ATP5j*: gen que codifica para la subunidad F6 de la rama periférica de la enzima ATP sintasa (ATP5J), *Idh (3a, 3b, 3g, 2)*: genes que codifican para las subunidades catalítica alfa y no catalíticas beta y gamma, de la enzima isocitrato deshidrogenasa (NAD(+)) 3 (IDH 3A, IDH3B e IDH3G) y (NADP(+)) 2 (IDH2), *Oxct1*: gen que codifica para la enzima 3-oxoácido CoA-Transferasa 1 (OXCT1). Los valores representados entre paréntesis indican una N de menos de 3 valores válidos por grupo. Murgia, M., et al. (2015). "Single muscle fiber proteomics reveals unexpected mitochondrial specialization"^[47]

Volviendo a la clasificación de las fibras musculares en estos cuatro tipos o grupos principales ya descritos, ésta permite a su vez que los músculos puedan ser clasificados en tres grupos, según la proporción que presenten de los distintos tipos de fibras, resultando así músculos oxidativos, como el *soleus*, glucolíticos, como el *extensor digitorum longus* (EDL), *tibialis anterior* (TA) y *quadriceps* (QUAD), e intermedios, como es el caso del *gastrocnemius* (GAST).^[19, 51]

1.1.4 Afectación de las fibras musculares en la patología y con el envejecimiento

Los distintos tipos de fibras musculares se ven afectados de forma diferente en diversas enfermedades que afectan al músculo esquelético. Así, en algunas distrofias musculares tales como la de Duchenne (DMD), la facioescapulohumeral (FSHD) y la miotónica tipo 2 (DM2), las fibras más afectadas son las de contracción rápida tipo II, especialmente las fibras IIa y IIx.^[52-60]

Sin embargo, también hay patologías como la distrofia miotónica tipo 1 (DM1) y la miopatía congénita por desproporción de tipos de fibras (CFTD), donde las fibras tipo I son las que presentan un mayor grado de afectación. En este último caso se ve afectado especialmente el tamaño de las fibras tipo I, siendo éste muy inferior al de las fibras tipo II.^[61, 62]

En la enfermedad de Pompe, de carácter metabólico y causada por una mutación en el gen que codifica para la enzima α -glucosidasa ácida (GAA), las fibras afectadas son principalmente las de tipo II, que presentan un descenso de tamaño que no se observa en las fibras tipo I.^[63-65]

Por otra parte, los distintos tipos de fibra también se ven afectados de forma diferente con el envejecimiento, que es otro de los factores que se asocia con la pérdida de masa muscular debida a la atrofia de las fibras musculares y a la pérdida de su fuerza de contracción, proceso que recibe el nombre de sarcopenia.^[66-69] En este caso, son de nuevo las fibras tipo II las que presentan una atrofia importante y una reducción de su tamaño debido a una disminución en la expresión de MYH2 y MYH1, que codifican para las miosinas MHCIIa y MHCIIx, mientras que la expresión de la isoforma de las fibras tipo I no se ve afectada.^[70, 71]

Por lo descrito anteriormente, se puede afirmar que en general las enfermedades musculares suelen afectar a un tipo específico de fibras musculares, lo que es indicativo de la importancia de los distintos fenotipos musculares que exhiben los individuos en relación con dichas patologías.^[52]

1.2 Mecanismos generales de la regeneración de las fibras musculares

Las fibras musculares del músculo esquelético son capaces de regenerarse en distintas situaciones y grados de lesión, por ello la fibra dañada ha de actuar rápidamente en el sellado de la porción afectada para evitar o minimizar así el grado de afectación.^[72] Este sellado se realiza mediante la formación de vesículas en la membrana de la parte intacta de la fibra muscular y de membranas en la interfaz de la parte dañada de ésta. De esta forma estas membranas tempranas formadas por restos del sarcolema destruido, representan unas estructuras temporales e incompletas hasta que el nuevo sarcolema puede volver a formarse transcurridas entre 9 y 21 horas después de la lesión.^[72-74]

Los principales componentes que intervienen en la regeneración muscular son:

-**Las células satélite**, localizadas entre el sarcolema y la lámina externa de las fibras musculares, son las principales conductoras del proceso de regeneración muscular. Estas células permanecen en estado quiescente en condiciones basales, pero en condiciones de daño muscular, denervación, distensión, frío o compresión son reclutadas y activadas para la reparación del daño producido.^[75]

-**La matriz extracelular (ECM)**, también juega un papel esencial en la regeneración muscular a través de sus componentes:

a) Una capa intersticial de tejido conectivo formada principalmente por las proteínas **colágeno I, II y IV (COL I, II, IV) y fibronectina (FBN)**. Conforman del 1 al 10 % de la masa del tejido muscular y funciona como soporte mecánico básico para los vasos sanguíneos y nervios que llegan al tejido, proporcionando elasticidad y transfiriendo la fuerza mecánica generada por las fibras musculares en el movimiento (**Fig. 5**).

b) Una lámina basal compuesta principalmente por **COL IV, FBN, laminina (LAM)**, proteoglicanos y glicoproteínas. Se encuentra íntimamente asociada a la superficie de las fibras musculares así como de las células satélite, ayudando a mantener su soporte estructural y estableciendo un entorno para la regulación de las células adyacentes (**Fig. 5**).^[72, 76, 77]

Estos componentes de la ECM se encuentran interrelacionados, así el COL IV y la LAM, que son los componentes mayoritarios de la membrana basal, forman un agregado supramolecular estable junto con otras moléculas, entre las que se encuentra la FBN, implicada en la adhesión y migración celular (**Fig. 5**).^[78-80] La unión de estas moléculas con integrinas permite la comunicación de la ECM con el interior celular, dada su función como receptores en la superficie celular, que traducen los estímulos mecánicos y estructurales en señales moleculares que intervienen en el comportamiento celular (**Fig. 5**).^[81, 82]

En condiciones normales, los distintos componentes de la matriz extracelular, previamente mencionados, facilitan que durante el proceso de regeneración tanto el andamiaje como la posición de las nuevas fibras formadas se produzcan en idéntica posición al de las fibras originales dañadas. Así mismo la ECM participa en el proceso de inervación de las células musculares, por lo que los niveles de expresión de los componentes de la ECM sufren un incremento durante los primeros instantes del proceso de regeneración, siendo finalmente degradados según avanza éste.^[81, 84]

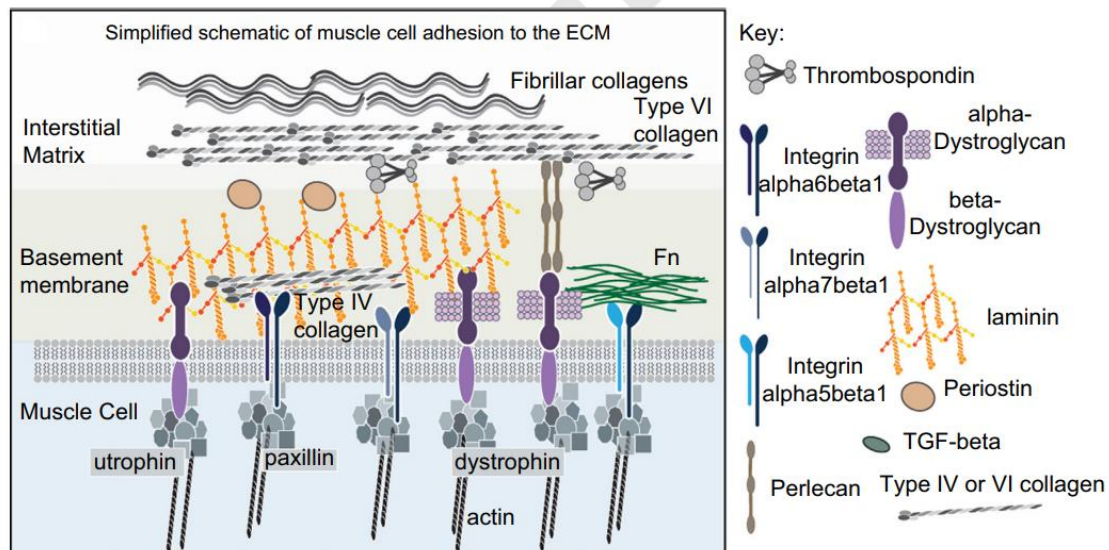


Figura 5. Distribución de las proteínas que componen la ECM. Goody, M. et al. (2014). "Hanging on for the ride: Adhesion to the extracellular matrix mediates cellular responses in skeletal muscle morphogenesis and disease".^[83]

-**Neutrófilos, macrófagos y citoquinas** participan en el proceso de regeneración desempeñando un papel fundamental en la respuesta inflamatoria. La actividad fagocítica de los neutrófilos provoca la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, que atrae de esta forma a los macrófagos al lugar de la lesión para que fagociten la parte necrosada.^[72, 85]

El proceso de regeneración muscular puede dividirse en cinco fases: **a)** una fase de pérdida de la integridad del músculo o degeneración **b)** seguida de una fase de necrosis, inflamación e infiltración de células inflamatorias que se encargarán de eliminar las fibras musculares dañadas, **c)** una fase de regeneración que comprende la activación de las células satélite que se dividirán, se diferenciarán en mioblastos y se fusionarán para formar fibras musculares plurinucleadas, **d)** remodelación y **e)** maduración y/o reparación funcional del músculo.^[86, 87]

La fase de degeneración se caracteriza por la desestructuración del sarcolema y un aumento de la permeabilidad de la fibra dañada, provocando dicho aumento el incremento de los niveles de proteínas musculares en la sangre, como es el caso de los niveles de CK (**Fig. 6**).^[75] Las fibras necróticas presentan una forma alargada y pálida con alteraciones importantes de su conformación interna y su muerte estimula la respuesta inflamatoria.^[87]

Posteriormente se produce **la fase de inflamación**, que es crucial en la homeostasis y posterior regeneración e implica el reclutamiento específico de células mieloides a la zona dañada. En los momentos iniciales de esta fase se activan e infiltran los neutrófilos, que son los primeros en llegar gracias a la disminución de la expresión de las proteínas de la ECM, COL IV, LAM y FBN (**Fig. 6**). La producción de proteasas por parte de los propios neutrófilos facilita su migración a través de estos compuestos, encargándose de fagocitar altas concentraciones de

radicales libres y proteasas así como de secretar citoquinas pro-inflamatorias que facilitarán la llegada de otras subpoblaciones de células inflamatorias tales como monocitos y macrófagos. Estos últimos se encargan de fagocitar los restos de las células musculares dañadas y de activar las células miogénicas.^[86-90]

En la **fase de regeneración** tiene lugar la activación, migración y diferenciación de las células satélite, siendo regulado este proceso por factores de transcripción músculo-específicos tales como Myf5, la miogenina o MyoD (**Fig. 6**).^[87, 91, 92] Estas células activadas presentan niveles elevados de Myf5 y MyoD, que actúan promoviendo la progresión hacia su diferenciación final en fibras musculares y la renovación del *pool* de células satélite respectivamente.^[93, 94] Las células satélite que permanezcan renovando el *pool* presentarán un descenso de los niveles de MyoD y expresarán Pax7, mientras que aquellas que entren en el ciclo miogénico serán Pax3 positivas.^[87]

La transición desde células en proliferación a células diferenciadas se lleva a cabo mediante el descenso de los niveles de expresión de los genes que promueven el ciclo celular en los precursores miogénicos, mediante la transición de la señalización inicial por Notch a una posterior regulada por Wnt. Esta intercomunicación se produce vía glucógeno sintasa quinasa beta (GSK3 β), que activada vía Notch promueve la proliferación celular y que inactivada vía Wnt facilita la diferenciación celular.^[87]

La siguiente fase consiste en el proceso de regeneración muscular es la **remodelación del tejido conectivo y la angiogénesis (Fig. 6)**. En ella tiene lugar la activación de la ECM lo que produce un incremento de la expresión de varios tipos de colágeno así como de FBN, elastina, proteoglicanos y LAM, cuya función es la de estabilizar el tejido, servir como estructura para las nuevas fibras y ayudar a la formación de las uniones neuromusculares. La fibrosis funciona como una respuesta beneficiosa al inicio del daño muscular ya que mantiene y protege la zona muscular dañada, sin embargo el exceso de fibrosis puede llegar a provocar la pérdida de la función muscular.^[87]

Finalmente, la reparación es completa y satisfactoria cuando el músculo es capaz de recuperar su maquinaria contráctil y ser de nuevo funcional, es decir, cuando es innervado de nuevo de forma efectiva, hecho que ocurre durante la **fase de maduración (Fig. 6)**.^[87]

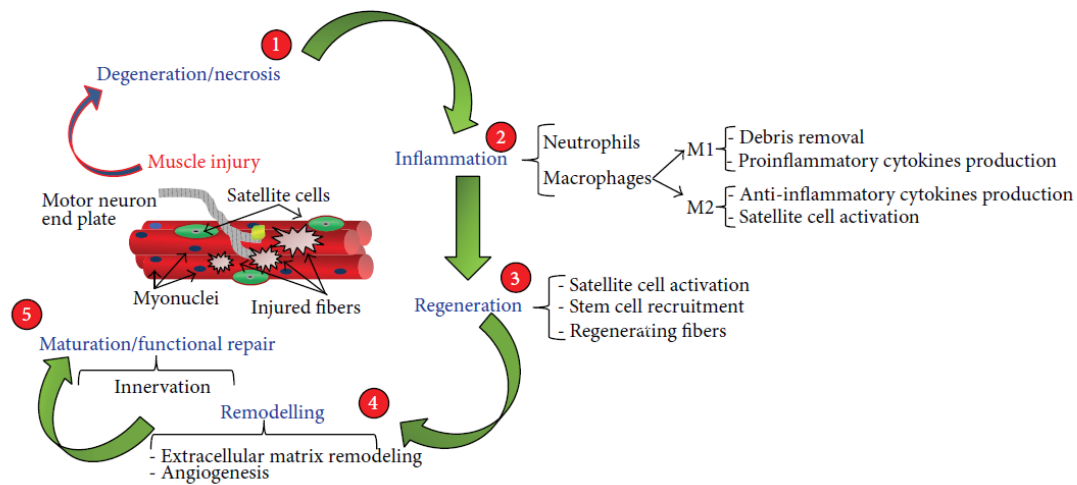


Figura 6. Esquema de las fases de la regeneración muscular. La regeneración muscular puede dividirse en cinco fases interrelacionadas y consecutivas (texto en azul). La necrosis de las fibras musculares activa un proceso de inflamación muscular transitoria, necesaria para eliminar los restos de las células necróticas. Esta fase es seguida por la fase de regeneración caracterizada por la activación de las poblaciones de células madre (células satélite y células madre no musculares), que se encargan de reemplazar las fibras dañadas. En la cuarta fase, se produce la angiogénesis y la remodelación de la ECM. Finalmente, la regeneración muscular se completa con la inervación de las fibras regeneradas. Musarò, A. (2014). "The Basis of Muscle Regeneration" [87]

Alteraciones en cualquiera de estas fases pueden causar una mala regeneración muscular que se caracteriza por una degeneración permanente de las fibras musculares, inflamación y fibrosis, es decir, un acumulo excesivo de componentes de la ECM.^[81, 84] Quizás los casos más claros de este tipo de alteraciones sean las distrofias musculares, en las que se producen continuos procesos de degeneración y regeneración que impiden que de forma normal se reemplacen las células dañadas por fibras de nueva formación. La persistencia de este daño crónico así como de células inflamatorias en este tipo de alteraciones provocan un aumento de la producción de factores de crecimiento y citoquinas, que a su vez producen un aumento de la activación y proliferación de fibroblastos que con el tiempo, permitirán la formación de un tejido permanentemente fibrótico por acumulación de componentes de la ECM. De esta forma, se puede considerar que la fibrosis es una respuesta deficiente a la regeneración muscular y presenta importantes consecuencias, no solo en patologías similares a las distrofias, sino también en el proceso de envejecimiento.^[95-98]

Otra de las características del proceso de regeneración muscular es la posición de los núcleos de las fibras dañadas. En numerosas biopsias de pacientes con diferentes tipos de enfermedades musculares se observan fibras con núcleos centrales en una proporción muy significativamente superior a las correspondientes a pacientes sanos, por lo que esta

localización se toma como un marcador de referencia de procesos de regeneración en las fibras musculares (**Fig. 7**).^[4, 99-101]

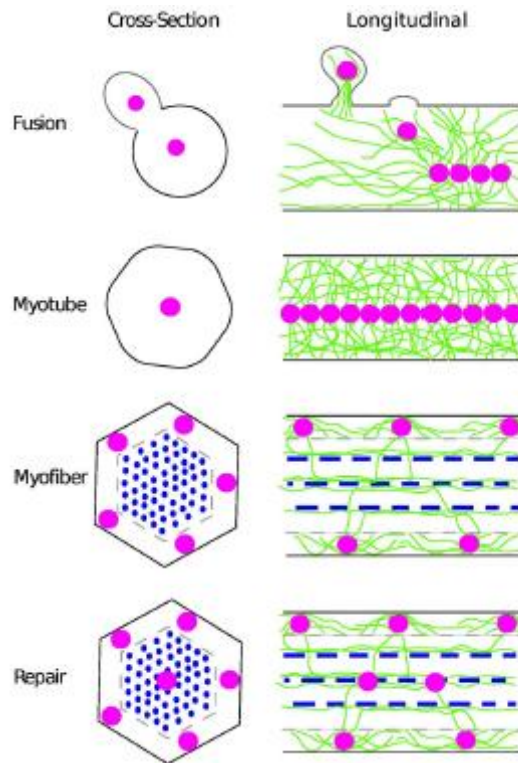


Figura 7. Esquema de la posición del núcleo durante el desarrollo muscular en secciones transversales (izquierda) y longitudinales (derecha). Los núcleos que son incorporados desde los mioblastos durante la fusión (en rosa), son rápidamente internalizados hacia el centro del miotubo por un proceso que requiere la ayuda de los microtúbulos del citoesqueleto (en verde), por lo que en los miotubos los núcleos están alineados en el centro de la célula. Cuando los miotubos maduran en miofibras con el ensamblaje del sarcómero (en azul), los núcleos se mueven hacia la periferia situándose por encima del sarcómero (en gris) y maximizando así el espacio entre núcleos. Coincidiendo con estos movimientos nucleares los microtúbulos del citoesqueleto se vuelven altamente ordenados. Los microtúbulos son nucleados en o cerca de la envoltura nuclear con un cierto solapamiento de microtúbulos que emanan de núcleos adyacentes. Así mismo, los microtúbulos se extienden hacia el sarcómero en paralelo a la estructura ordenada de actina y miosina. Durante la regeneración, los núcleos de nueva incorporación presentan movimientos similares a los que han sufrido durante el desarrollo muscular. Estos nuevos núcleos se incorporan a las miofibras cuando los miotubos se fusionan con las miofibras. Posteriormente, se posicionan en el centro de la miofibras antes de ser trasladados a la periferia en dos procesos independientes que dependen de los microtúbulos. Folker, E.S. y Baylies, M.K. (2013). "Nuclear positioning in muscle development and disease"^[102]

1.2.1 Regeneración diferencial de los distintos tipos de músculos

La distinta composición de fibras musculares que presentan los músculos no sólo afecta a su metabolismo y velocidad de contracción sino también al proceso de regeneración de los mismos, ya que existen estudios que demuestran que los músculos oxidativos y glucolíticos tienen procesos de regeneración diferentes. Así pues, se ha demostrado que el *soleus* (músculo oxidativo) y el EDL (músculo glucolítico) difieren en su capacidad para regenerar el daño inducido en sus fibras musculares mientras que el *soleus* necesita mayor tiempo para la formación y maduración completa de sus fibras, el EDL parece realizar este proceso de forma más rápida. Así mismo, también se ha observado que el *soleus* presenta una fase inflamatoria

con una mayor presencia de células pro-inflamatorias y más prolongada que el EDL.^[103] Estas diferencias pueden observarse ya desde el segundo día de la lesión, y demuestran que el EDL es capaz de conservar mejor la estructura de las fibras musculares y de la ECM que el *soleus*, mostrándose así más resistente al daño mecánico.^[104]

La capacidad diferencial que presentan los músculos para regenerarse también se observa entre los distintos tipos de fibras. Ciertos estudios han demostrado que la cantidad basal de células satélite que presentan las fibras tipo I es mayor que la que presentan las fibras tipo II.^[105] En esta línea, el análisis del daño que producen las contracciones excéntricas ha demostrado que las fibras tipo II se ven más afectadas por este tipo de lesiones que las fibras tipo I, vulnerabilidad que parece estar relacionada con la ultra estructura de cada tipo de fibra muscular.^[105]

1.2.2 Regeneración de las fibras musculares en patologías crónicas

La distrofia muscular es un fenotipo común asociado a numerosas patologías provocadas por diferentes mutaciones genéticas. En general se caracteriza por presentar un proceso progresivo de debilidad y degeneración muscular con ciclos de necrosis y regeneración muscular.^[106] Según avanzan las enfermedades con este tipo de fenotipo, el músculo no puede compensar de forma adecuada el daño producido y el tejido muscular es poco a poco reemplazado por tejido fibrótico adiposo, cuya primera consecuencia es la pérdida de masa muscular.^[106] En general estas patologías afectan a las conexiones que se establecen entre el citoesqueleto, la membrana de la célula muscular y la ECM, provocando una mayor fragilidad de las fibras musculares y un incremento de la proporción de proteínas no específicas del músculo.^[107-109] Así por ejemplo, mutaciones en el COL IV y la LAM, entre otras, han demostrado ser causa de distrofias musculares.^[110] Se ha postulado que la pérdida de la capacidad regenerativa del músculo en este tipo de enfermedades puede ser debida a un “agotamiento” de las células satélite como consecuencia de los continuos procesos de degeneración/regeneración a los que está sometido el mismo.^[111-114] Esta hipótesis plantea un envejecimiento de la capacidad replicativa de las células satélite, dado que los continuos procesos de activación y proliferación para restablecer el daño crónico producido en este tipo de patologías, podrían afectar a la longitud de sus telómeros, acortándolos y llevándolos a una senescencia prematura.^[115-117] Pero también se han postulado otras alternativas como causas de la pérdida prematura de la capacidad de regenerar el músculo que pueden presentar estas células. Una de ellas propone que las deficiencias de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) producen alteraciones en su diferenciación y proliferación; así mismo, los

macrófagos en grandes cantidades pueden alterar la diferenciación de los mioblastos afectando así a la regeneración normal del músculo. Todo ello sugiere que es importante un ambiente adecuado para una regeneración muscular eficiente y que tanto los factores internos como externos al músculo influyen en la misma.^[66, 118-122]

Además de las enfermedades musculares que comúnmente se asocian con un fenotipo distrófico, existen otro tipo de desórdenes musculares de carácter metabólico, que exhiben características particulares en relación con los procesos de degeneración/regeneración que provocan. En este sentido cabe destacar la enfermedad de Pompe (glucogenosis tipo II), cuyos estudios revelan que, pese a la acumulación de glucógeno en las fibras musculares que conlleva el desplazamiento de la maquinaria contráctil, no existe una gran acumulación de fibras necróticas en los músculos afectados; así mismo, parece que las células satélite de estos pacientes, tanto en casos leves como en aquellos más graves, no parecen haber perdido potencial para proliferar y diferenciarse. Diferentes estudios también demuestran que las células satélite no sucumben a la senescencia provocada por los ciclos de degeneración/regeneración, por lo que defectos en el proceso de regeneración muscular no son atribuibles a este factor. Además, las células satélite presentan la misma activación que en los músculos de individuos control, lo que da a entender que el *pool* de dichas células se mantiene intacto en este tipo de patología. Sin embargo revelan un descenso de la proporción de fibras grandes, susceptible de ser causado por una maduración incompleta de las fibras musculares de nueva formación.^[63, 64, 123-126]

1.2.3 Regeneración de las fibras musculares: envejecimiento

Durante el envejecimiento se produce una pérdida de masa muscular que va acompañada de un incremento del tejido conectivo intersticial así como de la lámina externa que rodea a las células satélite y que afecta a la eficiencia de la regeneración muscular, proceso que recibe el nombre de Sarcopenia (**Fig. 8**).^[127-129] Sin embargo, esto no quiere decir que el músculo no pueda regenerarse bien durante la vejez, sino que este proceso es en general menos exitoso tanto morfológica como funcionalmente.^[130, 131] En particular, parece que la capacidad de proliferación de los mioblastos no se encuentra afectada en el proceso de envejecimiento, pero sí su capacidad replicativa haciendo que éstos se repliquen de forma mucho más lenta.^[132]

Así mismo intervienen otros factores en la eficacia de la regeneración muscular con la edad, tal es el caso de la capacidad proliferativa de las células satélite. En humanos a partir de las dos décadas de vida parece estancarse haciendo que la población de este tipo de células

permanezca prácticamente constante en adelante, pero conservan una sutil capacidad proliferativa y son capaces de replicarse aunque presentan una respuesta más lenta en los procesos de degeneración/regeneración y, cuando se exagera la pérdida de estas células, son incapaces de generar mioblastos maduros y de fusionar miotubos (**Fig. 8**).^[133-139] Entre los motivos de la falta de eficiencia con la edad de las células satélite se encuentra su gran vulnerabilidad a agentes genotóxicos, dado que presentan bajos niveles de proteínas reparadoras tanto del daño producido por estrés como del ADN, que en última instancia conllevan una disfunción en la reparación del tejido.^[140] Así mismo, este daño e inestabilidad de las células satélite puede ser causa de senescencia de las mismas y de su incapacidad con la edad para llevar a cabo su función reparadora de forma adecuada (**Fig. 8**).^[141]

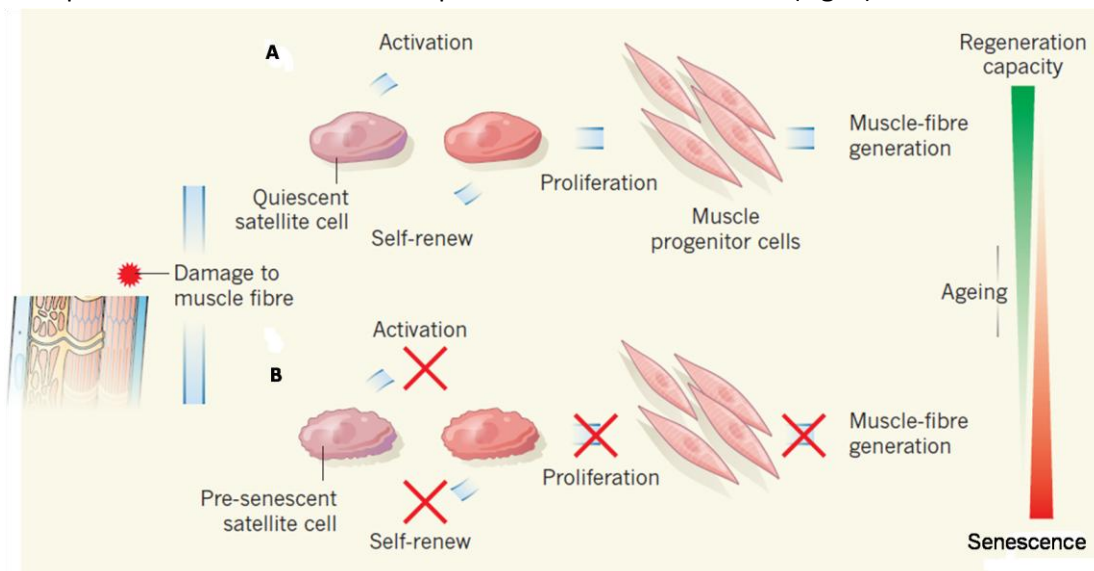


Figura 8. Esquema de la afectación de la regeneración muscular con la edad. A) Las células satélite permanecen en estado quiescente en condiciones normales. Cuando se produce daño muscular, las células satélite se activan y entran de nuevo en el ciclo celular para producir células musculares progenitoras que permitirán la regeneración de nuevas fibras musculares. Así mismo, las células satélite se renuevan para mantener su población. B) Con la edad las células satélite pierden su capacidad de quiescencia reversible entrando en un estado pre-senescente que impide que el proceso de regeneración se realice de forma correcta, afectándose los procesos de activación, renovación y proliferación de las mismas. Li, M. and Belmonte, J.C.I. (2014). "Genetic rejuvenation of old muscle".^[142]

Otro de los motivos de la ineficiente reparación muscular con la edad es la pérdida de activación de la señalización mediada por Notch (**Fig. 9**), de hecho, según disminuyen los niveles de activación de esta vía los músculos comienzan a expresar TGF- β en exceso, provocando a su vez el incremento de los niveles de Smad3 y CDK fosforiladas, que inhiben a las células satélite.^[143, 144] Así mismo, el incremento con la edad de la señalización vía Wnt (**Fig. 9**), que normalmente es suprimida por la activación de Notch, se asocia con el aumento de procesos de fibrosis y la reducción de la miogénesis y es otro de los posibles factores que influyen en la supresión de las células satélite.^[145]

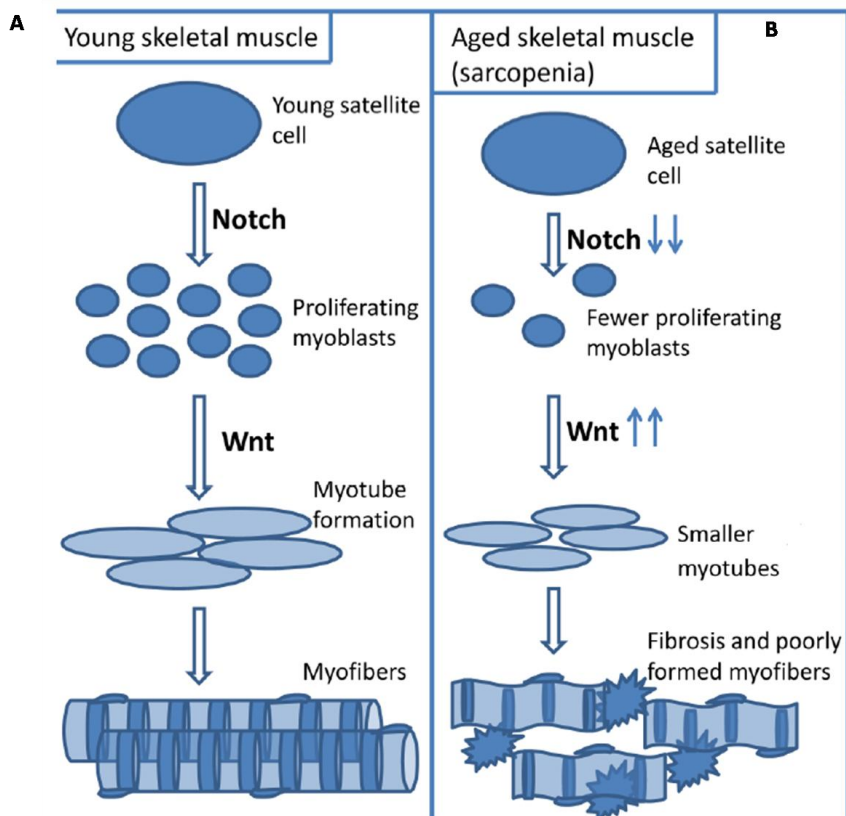


Figura 9. Efecto del envejecimiento en la señalización mediada por Wnt y Notch en la regeneración muscular. A) En condiciones normales, la señalización mediada por Notch promueve la proliferación de mioblastos y a través de Wnt se favorece la formación de miotubos maduros, que en última instancia darán lugar a la formación y la regeneración de las fibras musculares. B) Con el envejecimiento se produce una activación insuficiente de la vía mediada por Notch lo que a su vez conduce a una exacerbación de la señal mediada por Wnt, provocando así la disfunción de la capacidad de regeneración de las fibras musculares y la aceleración de su envejecimiento. Arthur, S.T. and I.D. Cooley. (2012). "The effect of physiological stimuli on sarcopenia; impact of Notch and Wnt signaling on impaired aged skeletal muscle repair" ^[146]

1.2.4 Susceptibilidad y resistencia de los distintos tipos de fibras musculares al daño en la enfermedad

La diversidad existente en la fisiología de la contracción y en la actividad metabólica de los distintos tipos de fibras musculares, así como la plasticidad de las mismas, no sólo les proporciona un amplio rango de funciones sino que las predispone a una susceptibilidad diferencial al daño en distintos tipos de enfermedades musculares.^[147] Los mecanismos por los cuales se produce este daño diferencial entre los distintos tipos de fibra no se conocen todavía, sin embargo existen ciertos estudios que dilucidan claves para entender estos patrones. En la enfermedad de Duchenne (DMD), por ejemplo, se postuló que un fenotipo más oxidativo que promoviera la formación de fibras lentas podría mejorar los síntomas de la misma. En este sentido, los experimentos realizados en modelos animales sugieren que el incremento de la expresión del co-activador gamma del receptor activado por el proliferador de peroxisomas 1 alfa (PGC1 α) efectivamente puede llegar a conseguir estos objetivos.^{[53, 148-}

^{150]} PGC1 α es un co-activador transcripciones que actúa como regulador de genes implicados en el metabolismo oxidativo y en la contracción muscular lenta, por lo que su sobreexpresión produciría un aumento en la maquinaria de contracción oxidativa, el metabolismo oxidativo y las uniones neuromusculares.^[149, 151] Una de las posibles explicaciones de esta resistencia a la DMD que presentan los músculos con predominio de fibras de contracción lenta es su alto contenido en utrofina. Esta proteína es estructuralmente similar a la distrofina y podría compensar su déficit en estos pacientes, de hecho, su sobreexpresión va ligada a una inducción de los músculos de contracción lenta mediante factores que mejoran el fenotipo de los ratones que se utilizan como modelo animal en esta enfermedad.^[151-153]

Otros estudios han permitido observar que el tratamiento de ratones DMD con el agente farmacológico AICAR (agonista de AMPK) produce una mejora del fenotipo de estos ratones mediante la inducción del fenotipo de fibras tipo IIa oxidativas, causada por un incremento en la expresión de PGC1 α y utrofina vía activación de AMPK.^[154-156]

En los casos de pérdida de masa muscular producida por el envejecimiento también se han realizado estudios para revertir la atrofia de fibras glucolíticas tipo II. Utilizando la vía de señalización mediada por fosfatidilinositol 3 quinasa/AKT1/m-TOR, que regula el tamaño de las fibras musculares, se han realizado experimentos en ratones sobreexpresando AKT1 que muestran una reducción de la expresión de PGC1 α y un incremento de los niveles de expresión de genes implicados en el metabolismo glucolítico que favorecen el crecimiento selectivo de fibras tipo IIb, por lo que a través de esta vía se produce una hipertrofia muscular y una mejora de la pérdida de masa muscular asociada al envejecimiento.^[157-161]

El hecho de que ciertas fibras musculares se vean más afectadas que otras tanto en enfermedades musculares como en el proceso de envejecimiento, abre un abanico de oportunidades terapéuticas para el restablecimiento del daño muscular.^[52]

1.3 Metabolismo del músculo esquelético

El músculo esquelético es único en el metabolismo energético, está adaptado tanto a una actividad aeróbica de larga duración y baja intensidad como a una actividad anaeróbica de corta duración y alta intensidad. La energía química es almacenada en sus células en forma de adenosina trifosfato (ATP), que provee de energía a éstas para la realización de cualquier tipo de trabajo, y sus depósitos son restablecidos siempre que se produce la oxidación de las fuentes de energía utilizadas, principalmente la glucosa y los ácidos grasos que suelen almacenarse en forma de glucógeno y triglicéridos respectivamente.^[162]

El ATP consumido se sintetiza de nuevo a través de tres mecanismos principales, a corto plazo mediante fosfatos de alta energía como es el caso de la creatina fosfato (CP), a medio plazo a través de la glucólisis anaeróbica y a largo plazo vía fosforilación oxidativa de la glucosa y los ácidos grasos, siendo estos últimos los que representan la mayor aportación de ATP de nueva síntesis, dado que son oxidados de forma lenta y continua.^[162] Por otra parte, el músculo esquelético es en términos cuantitativos el mayor almacén corporal de glucógeno y no tiene la capacidad de exportar al torrente sanguíneo la glucosa resultante de la degradación del mismo, debido a que carece de la enzima glucosa-6-fosfatasa, por tanto, la utilización de la glucosa resultante es absolutamente interna y sirve para cubrir las necesidades energéticas del músculo, especialmente en períodos de alto requerimiento energético como sería durante la realización de ejercicios intensos.^[36, 163] Una vez finalizada la actividad física, los niveles de glucógeno intracelular se ven disminuidos y por tanto, han de recuperarse, lo que requiere un aumento de la captación de glucosa de la sangre para poder sintetizar de nuevo el glucógeno consumido, así el estudio del balance entre ambas circunstancias metabólicas es especialmente importante para entender la fisiología de la enfermedad de McArdle.^[163]

1.3.1 Glucogénesis

En condiciones de reposo, la insulina es la hormona encargada de estimular la captación de glucosa, ésta al unirse a su receptor (IR) provoca la activación de la fosfoinositol 3 quinasa (PI3-K) formando fosfoinositol 3 fosfato (PIP₃), que a su vez fosforila a la proteína quinasa-1 dependiente de 3-fosfoinositol (PDK1) que en última instancia fosforilará a la proteína quinasa B, también conocida como Akt (**Fig. 10**). Cuando esta proteína se activa fosforila a la proteína TBC1D4 liberando al transportador de glucosa muscular (GLUT4), que se ancla a la membrana de la célula permitiendo así el paso de glucosa a la misma y su acumulación en forma de glucosa-6-fosfato (G-6-P). Posteriormente, la fosfoglucomutasa (PGM-1) transforma la glucosa-6-fosfato en el isómero glucosa-1-fosfato (G-1-P), que inmediatamente se utiliza para formar UDP-glucosa mediante la reacción catalizada por la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa (UGP-2) (**Fig. 10**). Así mismo, la acumulación de G-6-P favorece la activación alostérica de la síntesis de glucógeno uniéndose a la glucógeno sintasa muscular (GS-M). Esta enzima cataliza la adhesión de residuos de UDP-glucosa formando enlaces α -1,4-glicosídicos a medida que la molécula de glucógeno va creciendo con la ayuda de la enzima glucogenina (GYG1), que mediante autoglicosilación funciona como cebadora de la síntesis, y se complementa con la enzima ramificadora del glucógeno (GBE), que cataliza la formación de enlaces α -1,6-glicosídicos para formar las ramas de la molécula. En esta línea, la hormona insulina induce así

tiempo la obtención de energía vía degradación de glucógeno y a través de la degradación de la glucosa.

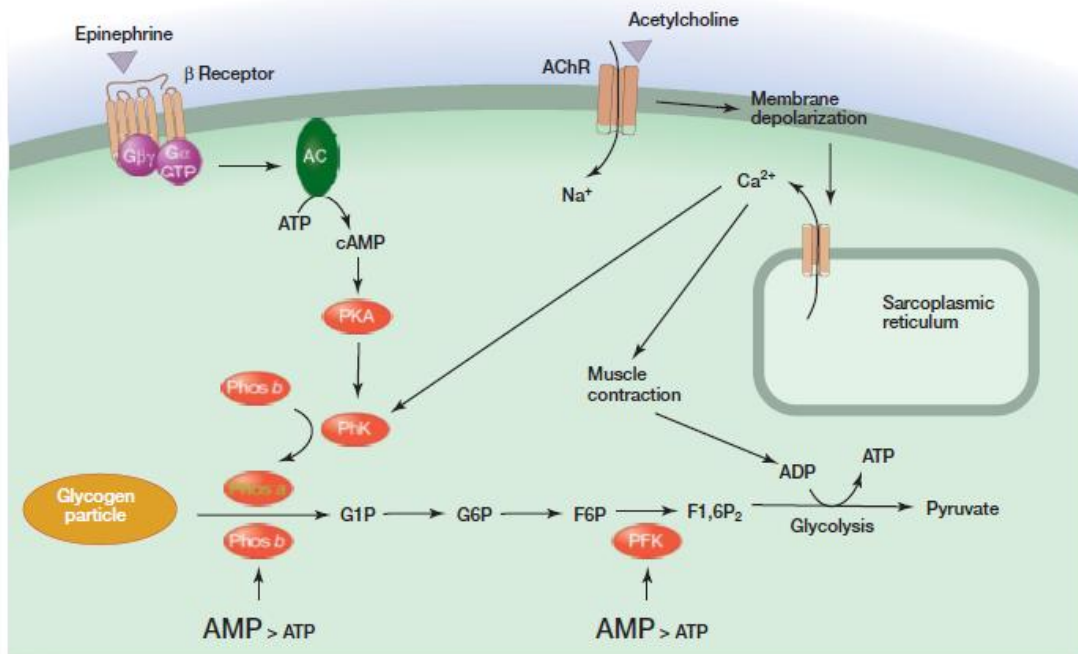


Figura 11. Degradación del glucógeno en el músculo esquelético. La contracción muscular incrementa los niveles de ADP y AMP y disminuye los de ATP, activando así a la forma b de la GP-M (ver apartado 1.6.2 de la Introducción) y a la PFK mediante regulación alostérica, de esta forma se promueve la degradación del glucógeno y la glucólisis para generar ATP. Sin embargo, la contracción (que se inicia por la estimulación de las motoneuronas liberando acetil colina) es desencadenada por la liberación de calcio desde los canales del retículo sarcoplásmico, que a su vez activan a la GP-M mediante la fosforilación de la forma b de la GP-M convirtiéndola en la forma a, que ya no requiere de AMP para su actividad. Un incremento de los niveles de AMPc desencadena, a través de la unión de la epinefrina con los receptores de la membrana plasmática, la activación de la PKA, que fosforila a la enzima fosforilasa quinasa (PhK) y amplifica su activación mediante un mecanismo dependiente de calcio. Hardie, G. (2014).^[163]

Así mismo, el aumento de la presencia de AMP produce la activación de la proteína AMPK, que mediante fosforilación de la enzima GS inhibe la síntesis de glucógeno y al mismo tiempo activa la captación de glucosa a través de la fosforilación del receptor TBC1D1 que permite la translocación y activación del transportador de glucosa GLUT4, haciendo que la glucosa exógena captada se derive hacia la glucólisis y oxidación de la misma (Fig. 11).^[163]

1.3.3 Glucólisis

La glucólisis es la vía inicial del catabolismo de carbohidratos siendo la ruta metabólica encargada de oxidar la glucosa con la finalidad de obtener energía para la célula. Se compone de diez reacciones enzimáticas consecutivas que convierten a la glucosa en dos moléculas de piruvato, siendo éste capaz de seguir otras vías metabólicas. La glucólisis se puede producir tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas y tiene lugar en el citoplasma de las fibras musculares. En condiciones de reposo, la glucosa es catabolizada a piruvato y éste

posteriormente a acetyl Co-A, dando como resultado la producción de dos moléculas de ATP y dos de nicotin amida deshidrogenasa (NADH).^[162] Éstas últimas serán finalmente transportadas vía malato a las mitocondrias, donde serán oxidadas por la cadena respiratoria para finalmente dar lugar a dos moléculas más de ATP por cada NADH oxidado.^[162] De esta forma, la glucólisis proporciona aproximadamente la mitad del acetyl Co-A necesario para el ciclo del ácido cítrico y representa una importante aportación al músculo esquelético cuando el metabolismo aeróbico no es suficiente fuente de energía.^[162]

En condiciones de actividad, durante la contracción muscular, se activa la enzima AMPK que a su vez fosforila a la proteína TBC1D1, que permite la translocación del transportador GLUT4 a la membrana y produce un incremento de la captación de glucosa, y posteriormente mediante la acción de la enzima hexoquinasa (HK2), se añade un residuo fosfato (G-6-P) y ésta podrá entrar a la ruta de la glucólisis, a la ruta de las pentosas fosfato, para poder ser oxidada y obtener energía en forma de ATP, o bien ser metabolizada hasta quedar almacenada en forma de glucógeno.^[166] De esta forma, la glucólisis anaeróbica es utilizada por el músculo esquelético como fuente de energía en actividades de alto requerimiento energético durante un corto periodo de tiempo, en el que el aporte energético del metabolismo aeróbico no es suficiente. Este tipo de glucólisis, que es capaz de producir ATP rápidamente es menos eficiente que la glucólisis aeróbica, que consiste en la formación de ácido láctico a partir del piruvato generado en la oxidación de la glucosa, gracias a la acción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), en una conversión que se lleva a cabo en el citoplasma celular y que produce la oxidación de NADH a NAD⁺.^[162] La acumulación de ácido láctico, que produce un descenso en el pH intracelular, y el descenso de la ratio AMP:ATP provocan la inhibición de la enzima PFK, enzima limitante de esta vía y que está íntimamente relacionada con la duración de la actividad realizada.^[162, 167] Así mismo, el incremento del NADH citosólico producido durante ejercicios intensos provoca la inhibición de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH), promoviendo que una mayor cantidad de piruvato sea reducido a lactato utilizando el átomo de hidrogeno procedente del NADH. De esta forma, la molécula de NAD⁺ oxidada puede actuar como receptor de átomos de hidrogeno permitiendo que la glucólisis continúe, sirviendo como proveedor de energía para reconstituir los enlaces fosfato de alta energía.^[162]

1.3.4 Oxidación de ácidos grasos

Los ácidos grasos son utilizados por el músculo esquelético como fuente de energía, tanto en periodos de reposo como en actividades de intensidad moderada, llegando a su máximo de utilización cuando la VO₂max es del 63 %.^[162, 168] En esta última situación la mayoría de ácidos

grasos libres proceden del tejido adiposo, que el músculo esquelético puede captar en forma de ácidos grasos libres y triglicéridos, aunque también pueden proceder de almacenes internos del propio músculo, representando así una fuente de energía que puede llegar a ser incluso mayor que la que aporta el glucógeno una vez degradado (**Fig. 12**). La liberación de estos ácidos grasos es regulada por hormonas tales como la epinefrina, la norepinefrina y la adrenocorticotropina, que se ven incrementadas con la actividad física y mental, y es a través de la síntesis de la lipoproteína lipasa por parte de las fibras musculares y su posterior translocación parcial al endotelio, que el músculo esquelético es capaz de captar estos ácidos grasos libres.^[162]

En esta línea, estudios realizados por Odland *et al.* en músculo esquelético de humanos, han demostrado que la elevada disponibilidad de ácidos grasos produce un descenso del 23 % en la glucogenolisis, que evidencia un cambio desde el metabolismo de los carbohidratos al de los lípidos.^[169] Estos estudios sugieren así mismo, que la regulación del cambio metabólico ha de estar vinculada a nivel de las enzimas GP-M y PDH ya que la captación de glucosa no parece verse afectada.^[169] En el caso de la enzima PDH, que es fosforilada y de esta forma inactivada por la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDHK), parece que la presencia de niveles elevados tanto de ácidos grasos disponibles como de NADH, así como el descenso de los niveles de piruvato, permiten una menor inhibición de la enzima PDHK y por tanto una reducción de la activación de dicha enzima.^[168-170] Por otro lado, los estudios de Dyck *et al.* en ejercicios de alta intensidad (VO₂max del 85 %) han revelado que en condiciones de elevada disponibilidad de ácidos grasos, se produce una reducción de los niveles de Pi libre y de AMP que estimulan la actividad de la enzima GP-M, y que por tanto dicha reducción sería parcialmente responsable de la inactivación de la misma.^[168, 171]

La principal ruta de oxidación de los ácidos grasos tiene lugar en la mitocondria mediante el proceso de la β -oxidación, si bien es cierto que para ácidos grasos de cadena muy larga la β -oxidación también se realiza en los peroxisomas. En la etapa inicial de la β -oxidación mitocondrial se produce la activación de los ácidos grasos a través de la enzima acil-CoA sintetasa, que cataliza su conversión a acil-CoA, cuyo destino es su unión a la carnitina, mediada por la carnitina palmitol transferasa I (CPT1) (**Fig. 12**). Esta unión es considerada como el primer paso de la internalización de los ácidos grasos a la mitocondria y produce a su vez la liberación de una molécula de CoA.^[162, 168, 172] El complejo formado por el acil y la carnitina es transportado por una translocasa y reconvertido en acil-CoA por la enzima carnitina palmitol transferasa II (CPT2), en el en lado interno de la matriz de la membrana

mitocondrial (**Fig. 12**).^[168, 172] En el interior de la mitocondria, la molécula de acil-CoA se acorta mediante sucesivos procesos de escisión entre los carbonos alfa y beta, siendo la primera reacción una oxidación de esta molécula catalizada por la enzima acil-CoA deshidrogenasa, que la convierte en trans-enoil-CoA, obteniéndose FADH_2 gracias a la reducción del componente FAD de esta flavoenzima.^[173] Posteriormente, la enzima enoil-CoA hidratasa cataliza la incorporación de una molécula de agua al trans-enoil-CoA formando L-3-hidroxiacil-CoA, que seguidamente será oxidado mediante la acción conjunta de la enzima hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y la coenzima NAD^+ , dando lugar a 3-cetoacil-CoA y $\text{NADH} + \text{H}^+$.^[173] En última instancia la enzima tiolasa cataliza una tiólisis, liberando acetil-CoA y formando un acil graso-CoA, que repetirá el proceso hasta que todos sus carbonos de partida queden reducidos a acetil-CoA, siendo cedidos todos los electrones de los FADH_2 y $\text{NADH} + \text{H}^+$ generados a la cadena de transporte electrónico mitocondrial.^[173] Finalmente, las moléculas de acetil-CoA generadas prosiguen hacia el ciclo de Krebs, obteniéndose un balance energético total de 129 ATP, 96 obtenidos en este ciclo, 14 procedentes del rendimiento del FADH_2 y 21 del $\text{NADH} + \text{H}^+$, a los que se restan 2 ATP que son utilizados en la activación del ácido graso.^[162, 173, 174]

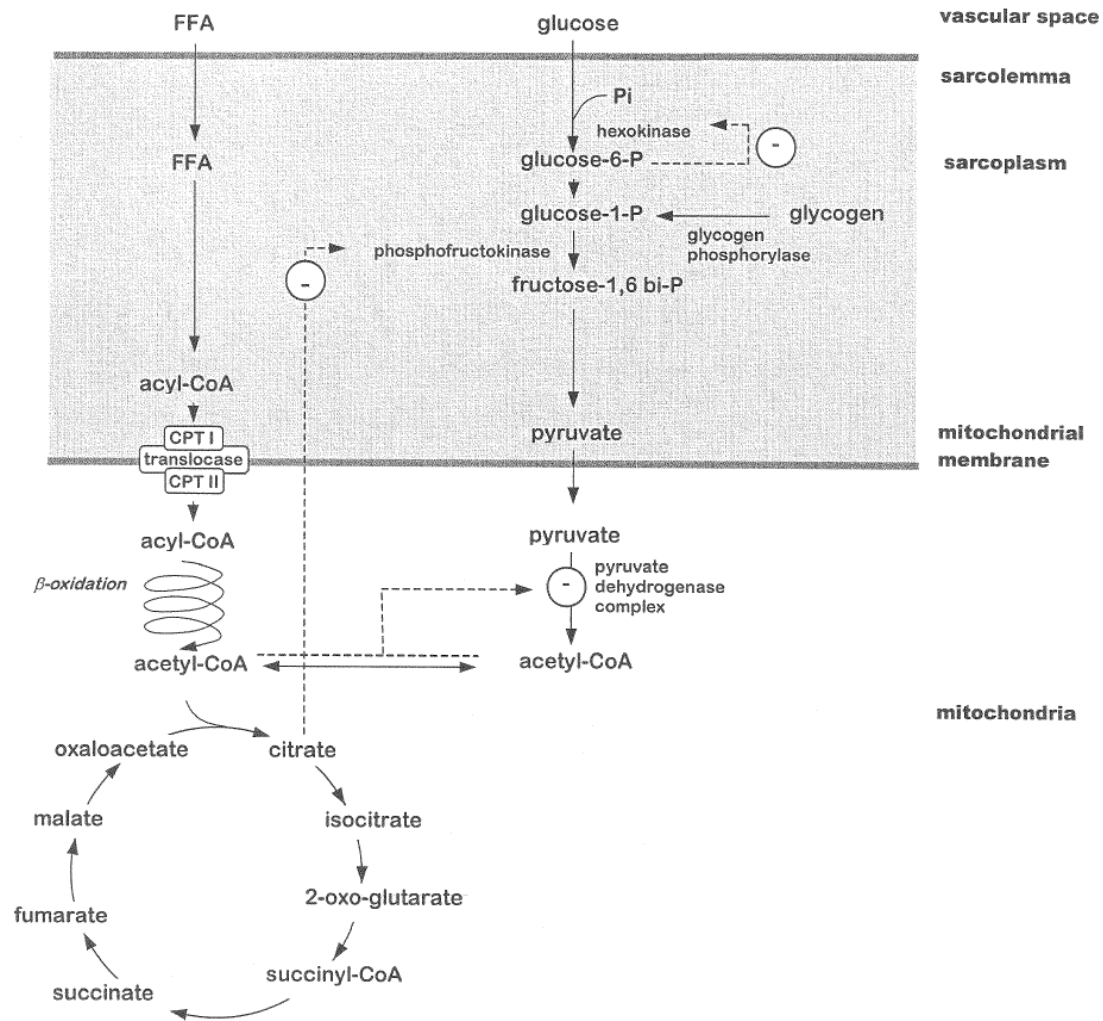


Figura 12. Esquema de la internalización y beta oxidación de ácidos grasos. El ciclo de Randle, o el ciclo de la glucosa-ácidos grasos, describe los mecanismos involucrados en la interacción entre el metabolismo de los ácidos grasos y el de los carbohidratos. En este modelo la disponibilidad de ácidos grasos es el factor dominante. El incremento de la disponibilidad de éstos produce a su vez el incremento de la concentración de acetil-CoA, cuya acumulación provoca la inhibición de la enzima PDH. Así mismo, la acumulación de citrato inhibe a la enzima PFK y la acumulación de G-6-P reduce la actividad de la enzima HK. En última instancia, esta sucesión de hechos provoca la inhibición del metabolismo de los carbohidratos, incrementando la disponibilidad y oxidación de ácidos grasos.^[168]

1.4 Mioquinas

El músculo no sólo juega un papel esencial en el movimiento y sostén de los órganos y tejidos^[1, 2] y en el metabolismo asociado a estos procesos,^[162] sino que también interviene en la regulación de la fisiología y el metabolismo de otros órganos mediante la liberación de ciertos factores solubles denominados mioquinas (**Fig. 13**).^[175-177] Éstas son producidas y liberadas por los miocitos como respuesta a las contracciones musculares,^[176] y bajo esta denominación se incluyen péptidos, factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), la miostatina (MSTN), el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), y el factor

neurotrófico de origen cerebral (BDNF), citoquinas como las IL-6, IL-8, IL-7 e IL-15, y hasta pequeñas moléculas orgánicas como el ácido orgánico β -aminoisobutírico ácido pequeño (BAIBA) (**Fig. 13**).^[175, 178-181] Esta amplia gama de mioquinas constituyen esencialmente la intercomunicación, también denominada “crosstalk”, entre el músculo esquelético y diversos órganos como el cerebro, el hígado, el tejido adiposo, los riñones o el páncreas.^[175-177]

Las mioquinas participan en numerosos procesos metabólicos y fisiológicos asociados al ejercicio y al balance energético, entre otros cabe destacar su implicación en la regulación del suministro energético en condiciones agudas de aumento de la carga de ejercicio y en la regulación de la proliferación, diferenciación y regeneración muscular independiente del ejercicio (**Fig. 13**).^[182, 183] En este sentido son destacables las observaciones realizadas en modelos de ratón *knock out* de MSTN, y que han puesto de manifiesto la hipertrofia e hiperplasia del músculo esquelético acompañada de un descenso de la acumulación de grasa corporal.^[184] Así mismo, estudios de la citoquina IL-6 han demostrado su implicación en condiciones basales, en el aumento de la captación de glucosa y en la translocación del transportador de glucosa GLUT4 así como en la oxidación de ácidos grasos, ya sea a nivel intramuscular o en el tejido adiposo, vía activación de AMPK^[185-190] En esta línea, otros estudios han relacionado esta citoquina con el aumento de la producción endógena de glucosa durante el ejercicio, promoviendo y/o activando la exportación hepática de glucosa al torrente sanguíneo, aumentando la señalización vía Akt y reduciendo, por tanto, la expresión de genes gluconeogénicos en este mismo órgano, por lo que intervendría en la protección ante el mal funcionamiento de la homeostasis de la glucosa.^[191, 192]

De esta forma, queda probada la existencia de una intercomunicación entre el músculo esquelético y órganos como el tejido adiposo o el hígado entre otros.

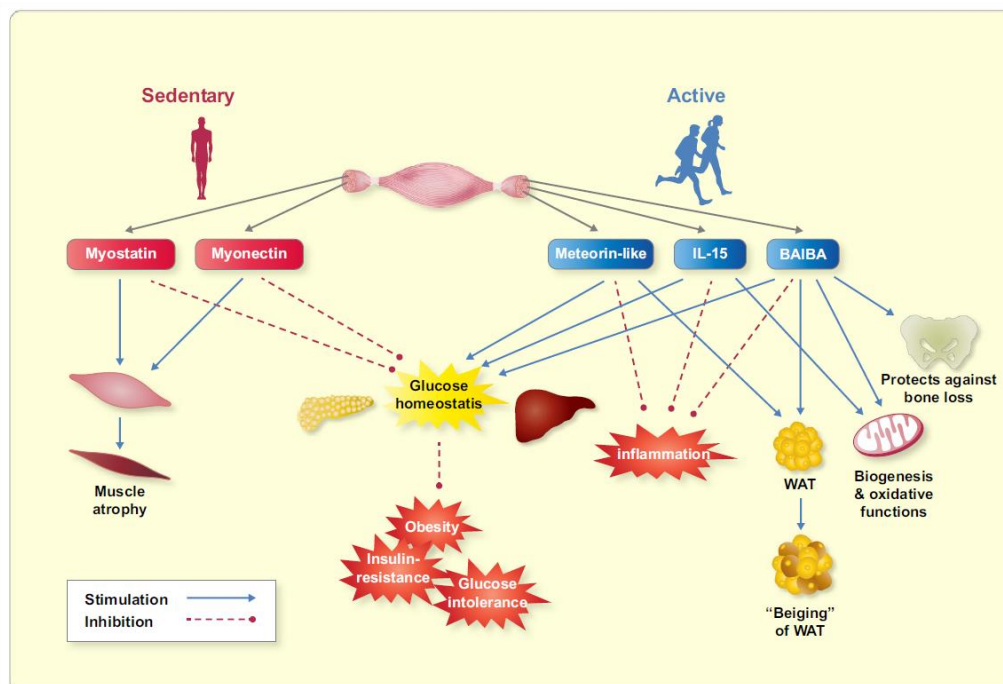


Figura 13. Regulación del metabolismo y la fisiología del músculo esquelético a través de las mioquinas. En la imagen se resumen las principales funciones de las mioquinas secretadas por el músculo esquelético tanto en este órgano como a nivel general, activadoras o inhibidoras. Se incluye a la miostatina (MSTN), el ácido orgánico β -aminoisobutírico ácido pequeño (BAIBA), la proteína meteorina (METRNL), la interleuquina (IL-5) y la mionectina. Estas proteínas constituyen la base de la intercomunicación entre el músculo esquelético y otros órganos tales como el tejido adiposo o el hígado. Das, K. *et al* (2019) "Myokines in skeletal muscle physiology and metabolism: recent advances and future perspectives"^[193]

1.5 "Crosstalk" músculo esquelético-tejido adiposo

Distintos estudios han sugerido una relación directa entre la actividad del músculo esquelético y la del tejido adiposo,^[184, 194-199] poniendo de manifiesto que ejercicios que favorezcan la mejora de la resistencia pueden ayudar a regular la masa de ambos tanto en individuos sanos como con obesidad.^[196-199] Por tanto, parece evidente la existencia de una intercomunicación entre ambos tejidos que revela una conexión importante entre la masa del músculo esquelético y la del tejido adiposo.^[200]

1.5.1 Tejido adiposo

El tejido adiposo es un órgano que en condiciones de abastecimiento presenta una función de almacén corporal de energía en forma de triglicéridos (TAG) y que cuando es necesario, es capaz de movilizar esta energía en forma de ácidos grasos.^[201] Existen dos tipos distintos de tejido adiposo, el tejido adiposo marrón, que está formado por células multiloculares con gran cantidad de mitocondrias y cuyas funciones son la oxidación de ácidos grasos y la regulación de la termogénesis,^[202] y el tejido adiposo blanco, que juega un papel importante en la fisiología de los mamíferos y presenta la capacidad de ser un reservorio energético que es movilizado en condiciones de necesidad, facilitando así la exportación de ácidos grasos a otros tejidos y

regulando la homeostasis de la glucosa. Por tanto, en términos generales el tejido adiposo incrementa sus reservas en condiciones favorables de balance energético y por el contrario pierde parte de estas reservas exportándolas a otros tejidos, como respuesta a condiciones más desfavorables.^[203-205]

Las células que forman este tejido son los adipocitos, responsables de almacenar el principal producto de secreción del mismo, los ácidos grasos, quedando éstos almacenados en forma de TAG en los adipocitos maduros y conformando, en el caso del tejido adiposo blanco, una gran **gota lipídica** que ocupa la mayor parte de la célula (**Fig. 14**). Esta estructura es considerada como un orgánulo más de la misma y está en contacto con otros compartimentos celulares tales como las mitocondrias, resultando ser de vital importancia no solo en el almacenamiento de los ácidos grasos sino también en su liberación.^[203, 206-212] Así mismo, el almacenamiento de los ácidos grasos en forma de TAG resulta crucial para los adipocitos, ya que en su forma libre son tóxicos para la célula. Entre las proteínas que ayudan a este empaquetamiento se encuentran las **perilipinas**, que componen una familia de proteínas que cubren la gota lipídica y coordinan su movilización y almacenamiento en varios tipos celulares (**Fig. 15**). En esta familia se engloban, entre otras, la proteína **TIP47** y la proteína relacionada con la diferenciación adipofilina/adipocito (**ADRP o PLIN2**), que se expresa en varios tipos celulares de diferentes tejidos, la proteína **S3-12**, expresada principalmente en el tejido adiposo blanco aunque también detectable en el corazón y en el músculo esquelético, y la proteína PAT enriquecida en tejidos oxidativos (**OXPAT o PLIN5**), que puede encontrarse en el tejido adiposo marrón, en el corazón, en el hígado en condiciones de ayuno, y en el músculo esquelético, donde predomina en las fibras de contracción lenta.^[213-220] Ésta última regula la hidrólisis de ácidos grasos a través, no sólo de su unión a la gota lipídica, sino de las mitocondrias. Ciertos estudios demuestran una interacción tanto funcional como física entre ambos orgánulos, produciendo el reclutamiento de las mitocondrias a la superficie de la gota lipídica, mediante la acción de PLIN5.^[221] En condiciones fisiológicas normales la proteína PLIN5 inhibe la hidrólisis de ácidos grasos, canalizando la circulación de los mismos hacia la gota lipídica para la formación de TAG a expensas de su oxidación por parte de las mitocondrias (**Fig. 14**). Sin embargo, en condiciones de requerimiento energético, PLIN5 libera los ácidos grasos para que sean degradados en las mitocondrias vía β -oxidación.^[221, 222] La proteína PLIN2 por su parte, se expresa en las etapas tempranas de los adipocitos, participando en la formación de la gota lipídica y protegiendo a ésta de la actuación de las lipasas que intervienen en la lipólisis, principalmente en el hígado.^[223, 224]

Los ácidos grasos, cuando son requeridos, son hidrolizados en la lipólisis y liberados a la sangre en forma de ácidos grasos no esterificados, para ser posteriormente oxidados por el músculo u otros tejidos (**Fig. 14**). Los niveles de estos ácidos grasos libres son generalmente constantes en el torrente sanguíneo, donde se establece un balance entre su utilización, su movilización y su transformación de nuevo en TAG.^[206, 207]

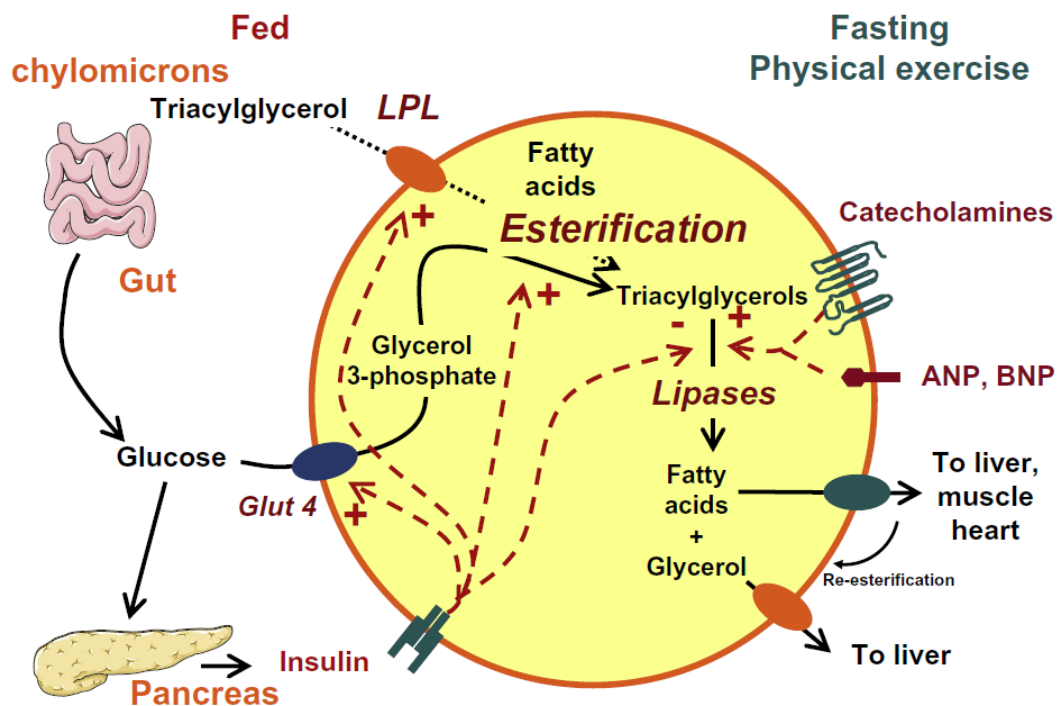


Figura 14. Coordinación, regulación, deposición y movilización de los ácidos grasos en el tejido adiposo blanco. LPL: lipoproteína lipasa, ANP: péptido natriurético atrial, BNP: péptido natriurético cerebral. Lafontan, M. y Langin, D. (2009). "Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue".^[208]

Los adipocitos pueden eliminar la presencia de ácidos grasos libres vía almacenamiento en forma de TAG, o vía oxidación interna en sus mitocondrias o peroxisomas mediante la β -oxidación, que juega un papel relevante en la homeostasis metabólica.^[225-230] Las principales enzimas implicadas en el proceso de lipólisis son la lipasa de triacilglicéridos (ATGL), la lipasa sensible a hormona (HSL) y la monoacilglicérol lipasa (MGL) (**Fig. 15**).^[208, 231]

La enzima ATGL es una hidrolasa que cataliza el primer paso de la lipólisis de ácidos grasos degradando los TAG de la gota lipídica, dando como resultado la transformación de éstos en diacilglicéridos (DAG) y liberando un ácido graso (**Fig. 15**). Posteriormente interviene la HSL catalizando la transformación de los DAG en monoacilglicéridos (MAG), gracias a que es activada por la proteína quinasa A (PKA) mediante fosforilación de uno de sus residuos de serina del dominio catalítico (Ser 660) (**Fig. 15**). Finalmente, la enzima MGL hidroliza los MAG

generados por la activación de la HSL, transformándolos en ácidos grasos no esterificados (Fig. 15).^[232-239] De esta forma, los ácidos grasos libres generados serán transportados vía torrente sanguíneo, a otros tejidos receptores tales como el músculo esquelético y el hígado.^[240]

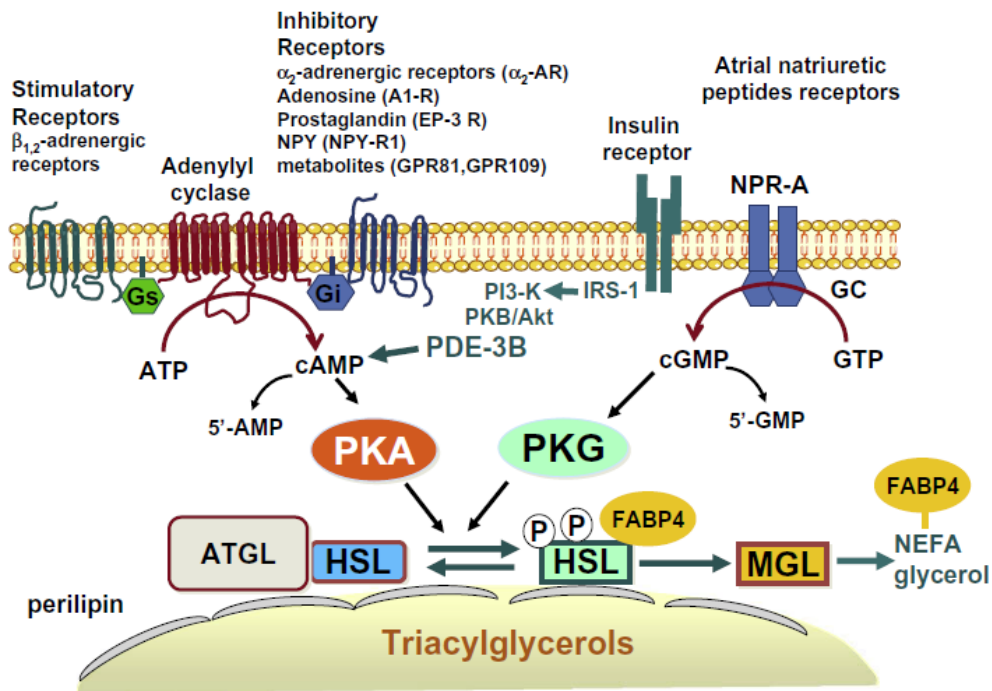


Figura 15. Regulación de la lipólisis en los adipocitos. Cascada de señalización de las catecolaminas vía receptores adrenérgicos, autacoides vía metabolitos transportados por receptores inhibitorios, y péptidos natriuréticos atriales vía receptor tipo A (NPR-A). Las enzimas PKA y proteína quinasa G (PKG) están involucradas en la fosforilación específica de proteínas. La fosforilación de HSL promueve su translocación desde el citosol a la superficie de la gota lipídica. La fosforilación de la perilipina produce importantes alteraciones físicas de la superficie de la gota lipídica que facilitan la acción de la HSL y así puede iniciarse la lipólisis. La interacción de la proteína de unión a adipocito (FABP4) con la enzima HSL favorece la liberación desde la célula de los ácidos grasos no esterificados a través de la hidrólisis de los TAG. La hormona insulina estimula los adipocitos a través de los receptores insulínicos y la fosfodiesterasa-3B promueve la degradación del AMPc y efectos antilipolíticos cuando no está activa la cascada de señalización dependiente de GMPc (no se muestra en la imagen). Lafontan, M. y Langin, D. (2009).^[208]

1.5.2 Captación y liberación de ácidos grasos libres por parte del músculo esquelético

Los ácidos grasos liberados al torrente sanguíneo pueden ser captados por el músculo esquelético en condiciones de necesidad energética. Para poder internalizarlos se requiere la expresión del receptor/transportador **CD36**, encargado de captar directamente los ácidos grasos de cadena larga.^[241] Estudios de Bonen *et al.* han revelado la implicación de este translocador en la utilización de los ácidos grasos por parte del músculo esquelético, y se especula si su translocación a membrana es desencadenada por los mismos factores que lo hacen para GLUT4.^[168, 242] En este sentido, su déficit ha demostrado ser la causa de la incapacidad para captar adecuadamente los ácidos grasos libres del torrente sanguíneo en modelos de ratón, lo que a su vez provoca un descenso de la utilización de los mismos, potenciando la sensibilidad a insulina en este tejido. Así mismo, su sobreexpresión produce un

descenso de los niveles de ácidos grasos y triglicéridos circulantes y se asocia con hiperglucemia e hiperinsulinemia.^[243-246]

En condiciones normales, el músculo esquelético presenta altos niveles de expresión de CD36 debido a sus continuas contracciones y a los altos niveles de insulina en sangre, activándose en periodos de ayuno vía receptor activado por proliferadores de peroxisomas delta (PPAR δ), y favoreciendo la utilización de ácidos grasos. Su función también es regulada por su localización subcelular, distribuyéndose tanto en vesículas intracelulares como en las mitocondrias, y es reclutado por la activación de AMPK, que produce su translocación a membrana para la captación de ácidos grasos.^[247-249]

Una vez en el citoplasma de las células musculares, los ácidos grasos quedan almacenados en las proximidades de las mitocondrias en forma de gotas lipídicas de triacilglicerol intramiocelular (IMTG). Este proceso presenta una maquinaria enzimática muy similar a la del adipocito (descrita en el **apartado 1.4.1**).^[250] En caso de necesidad, el IMTG es hidrolizado por la enzima ATGL, permitiendo la liberación de un ácido graso y su degradación a DAG, que posteriormente será transformado en MAG por la enzima MGL, produciendo la liberación de otro ácido graso y permitiendo así que sean oxidados vía mitocondrial.^[232, 238, 251]

1.6 “Crosstalk” músculo esquelético-hígado

El hígado es un órgano importante en la regulación del metabolismo de los carbohidratos, ya sea para requerimientos propios o para abastecer a otros órganos en condiciones de déficit energético. Tiene la capacidad de almacenar glucógeno para suministrar glucosa a otros tejidos cuando éstos la necesitan, e interviene en la síntesis de glucosa a partir de precursores no carbohidratados, a través de la gluconeogénesis, siendo así una importante fuente de glucosa en periodos de falta de alimento.^[163]

Cuando existe suficiente glucosa circulando por el torrente sanguíneo, su entrada a las células del hígado para la producción de glucógeno y posterior almacenamiento, se realiza a través del transportador GLUT-2;^[252] una vez internalizada en la célula, la glucosa se fosforila a G-6-P por la acción de la enzima hexoquinasa (HK-1), lo que permite la acumulación de este metabolito en los hepatocitos, representando este proceso un paso crucial en el metabolismo de la glucosa/glucógeno (**Fig. 16**).^[253] Posteriormente, la G-6-P es isomerizada por la enzima PGM1 a G-1-P, y ésta dará lugar a UDP-glucosa en una reacción catalizada por la enzima UGP2 (**Fig. 16**).^[254, 255] Finalmente, comenzará el proceso de formación de la molécula de glucógeno, que en el hígado es llevada a cabo por la acción combinada de la enzima GYG2, la forma hepática de la glucógeno sintasa (GS-L) y la enzima GBE. En este proceso, la enzima GYG2 en

colaboración con la enzima GS-L catalizan la transferencia y elongación de la molécula de glucógeno, transfiriendo e incorporando residuos glucosil desde la UDP-glucosa para formar enlaces α -1,4-glucosídicos, creando así un polímero de glucosa de unos 10-20 residuos que conformará la base de la síntesis de esta molécula y, en última instancia, la enzima GBE cataliza la transferencia de una cadena de 6 a 8 residuos glucosil formando enlaces α -1,6-glucosídicos y convirtiendo a la molécula de glucógeno en un polímero de múltiples ramas (Fig. 16).^[256-258]

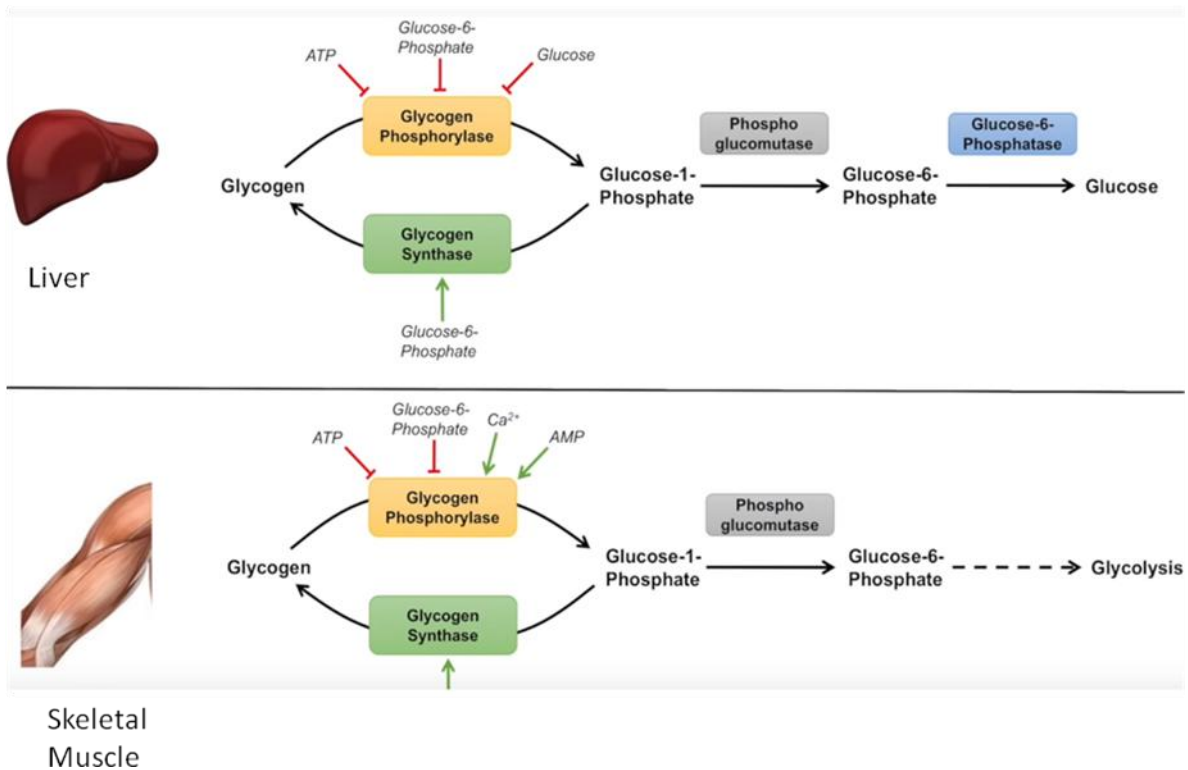


Figura 16. Síntesis y degradación del glucógeno en el hígado y el músculo esquelético. Las flechas verdes indican los efectos positivos de las enzimas indicadas. Las flechas rojas indican efectos inhibitorios. JJ Medicine.^[259]

La actividad de la enzima GS-L, así como de la isoforma muscular GS-M en el músculo esquelético, está regulada directamente por dos estados transitorios que dependen del sustrato glucosa-6-fosfato y que pueden considerarse como “formas” de esa enzima (Fig. 17). La “forma” activa no requiere del sustrato glucosa-6-fosfato para activarse y la “forma” inactiva requiere mucha cantidad de este sustrato para hacerlo. Ambas participan en esta regulación cuando, mediante fosforilación/defosforilación, otras enzimas actúan sobre ellas, entre las que cabe destacar la proteína fosfatasa 1 (PP1B), que se encarga de defosforilar a la “forma” inactiva, activándola y promoviendo la síntesis de la molécula de glucógeno, la enzima GSK3, encargada de fosforilar la “forma” activa inhibiendo la síntesis de glucógeno, la enzima AMPK, responsable de inhibir la formación de glucógeno a través de la inhibición de la ya

citada enzima PPB-1, y la enzima Akt, que favorece el almacenamiento de la glucosa en el hígado en forma de glucógeno, inhibiendo a la enzima GSK3 (Fig. 17).^[260-263]

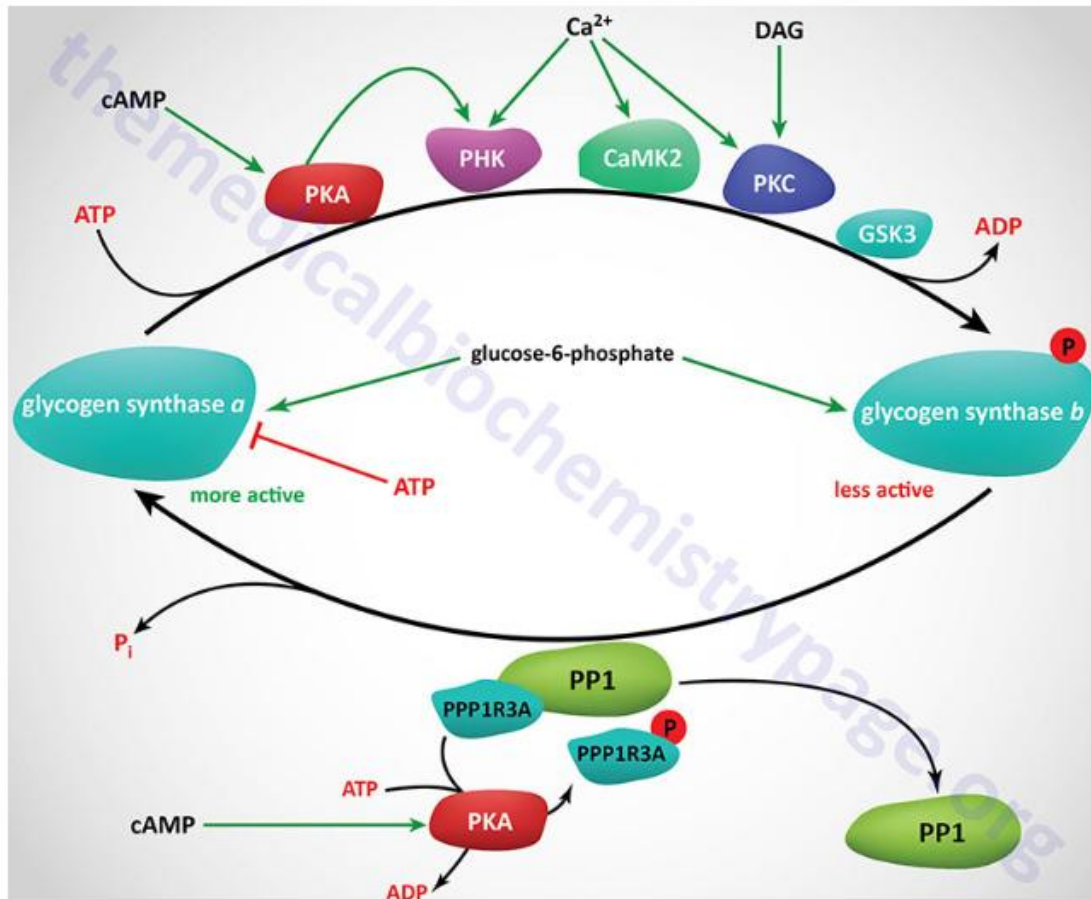


Figura 17. Vías implicadas en la regulación de la síntesis de glucógeno en hígado y músculo esquelético a través de varias quinzas. La PKA es una enzima dependiente de AMPc. Las flechas verdes indican los efectos positivos de las enzimas indicadas. Las flechas rojas indican efectos inhibitorios. La forma a de la GS es fosforilada volviéndose menos activa, de tal forma que requiere de G-6-P para su actividad. La regulación de la fosforilación de la GS es llevada a cabo por varias enzimas, la PHK, que se encarga de su fosforilación y por tanto activación, la PKA que también fosforila a la GS, la PKC, la CaMKII y la GSK3. (ES UNA PÁGINA WEB)^[264]

Otro proceso metabólico importante en condiciones de abundancia de glucosa es la glucólisis, cuyo papel en el hígado es anabólico ya que a través de la misma se degrada la glucosa para formar, en última instancia, productos que servirán para la síntesis de lípidos, aminoácidos y otros compuestos que serán oxidados más adelante para la obtención de energía (Fig. 18), mientras que en el músculo, dada su incapacidad para sintetizar glucosa de novo vía gluconeogénesis, esta vía metabólica tiene una función catabólica directamente encaminada a la obtención de energía con la oxidación de la glucosa.^[163, 265] Tanto en el músculo como en el hígado la enzima piruvato quinasa (PK), cuyas isoformas son PK-M y PK-L respectivamente,^[266] interviene en un paso clave de la regulación de esta vía (Fig. 18). Esta enzima está regulada alostéricamente por la fructosa 1,6 bifosfato, que también es un indicador de procesos

glucolíticos activos. Sin embargo, su actividad se ve alostéricamente inhibida por el ATP, el acetil Co-A y los ácidos grasos de cadena larga, todos ellos indicativos de un abastecimiento suficiente de energía. Así mismo, el aminoácido alanina también inhibe su actividad ya que puede ser rápidamente convertido a piruvato (**Fig. 18**). Otros mecanismos reguladores de esta enzima en el hígado son el incremento de AMPc intracelular durante el ayuno mediado por glucagón, que inhibe a esta enzima vía PKA, y su activación mediada por insulina en condiciones de ingesta de alimento, mientras que en el músculo dada la ausencia de la gluconeogénesis, como ya se ha mencionado, estos mecanismos reguladores no están presentes y la enzima PK-M carece de sitios de unión a PKA.^[163, 265]

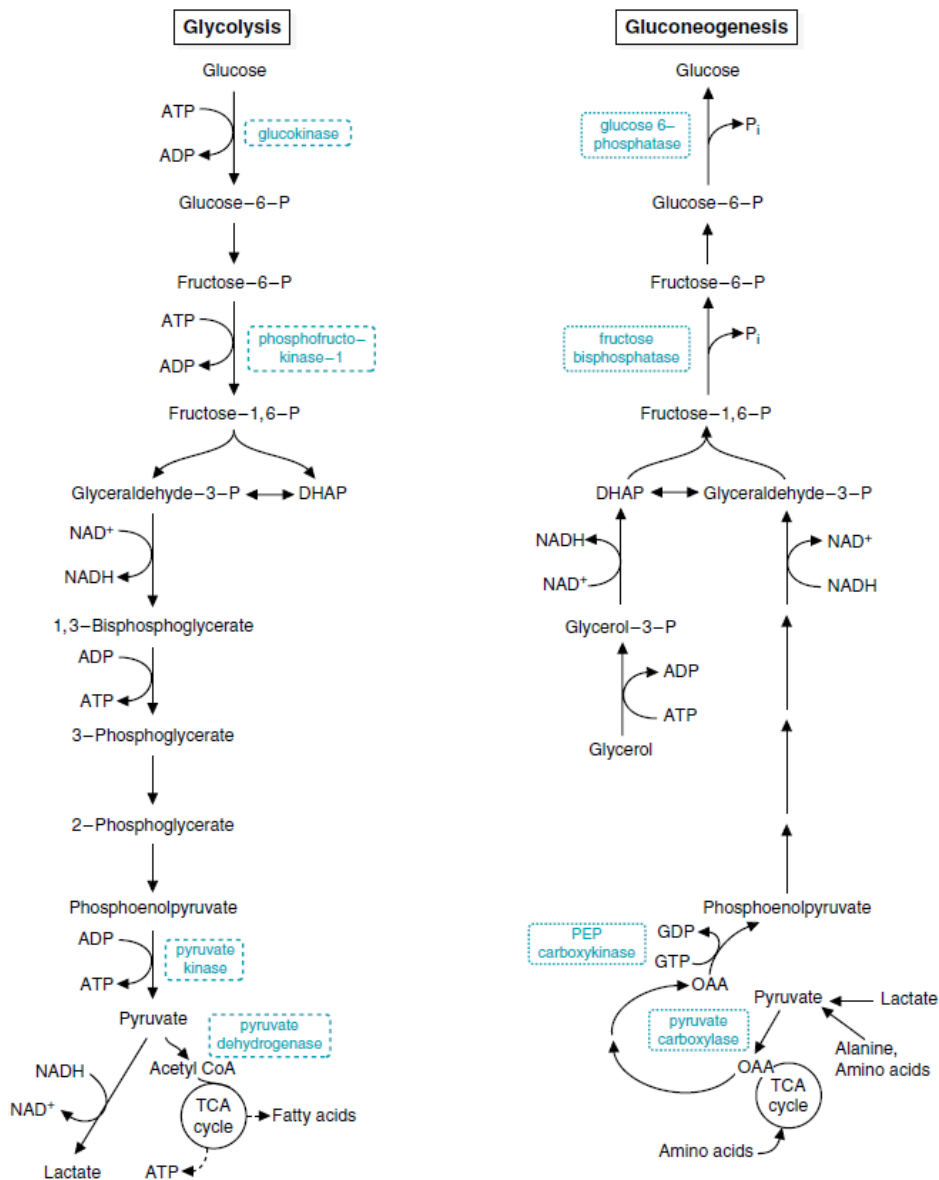


Figura 18. Esquemas de las rutas de la glucólisis y la gluconeogénesis en el hígado.^[267]

Por el contrario, en condiciones de necesidad energética, el proceso de liberación de glucosa al torrente sanguíneo comienza con la degradación de glucógeno (**Fig. 16**). Las enzimas que participan en el proceso de ruptura de esta molécula son la glucógeno fosforilasa hepática (GP-L), que libera glucosa-1-fosfato a partir de la cadena lineal de la molécula de glucógeno rompiendo los enlaces α -1,4-glucosídicos, y la enzima AGL, que corta los puntos de unión de las ramas de dicha molécula deshaciendo los enlaces α -1,6-glucosídicos (**Fig. 16**). Posteriormente interviene la enzima glucosa-6-fosfatasa (G6Pc), que transforma la glucosa-6-fosfato en glucosa libre para que pueda ser secretada por los hepatocitos (**Fig. 16**).^[268-270] Así mismo, en condiciones de ayuno prolongado, cuando existe un déficit de glucosa, el hígado es capaz de contrarrestarlo vía síntesis de novo de esta molécula a mediante la ruta metabólica de la gluconeogénesis.^[265, 271, 272] Ésta es esencialmente la ruta inversa de la glucólisis pero con dos pasos distintos mediados por las enzimas piruvato carboxilasa (PCB) y fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK). Inicialmente, el piruvato es carboxilado por la enzima PCB que lo transforma en oxalacetato, y éste se convierte en fosfoenol piruvato por la acción de la enzima PEPCK. Las sucesivas modificaciones del fosfoenol piruvato llevan, en última instancia, a la utilización de la glucosa-6-fosfato como sustrato previo a la formación de la glucosa.^[265, 271-273] Los procesos metabólicos descritos evidencian una comunicación entre el hígado y el músculo esquelético que resulta clave para la regulación del metabolismo de los carbohidratos en los estados de ingesta y falta de alimento. Ambos órganos comparten la capacidad de almacenar glucosa en forma de glucógeno, lo que les permite una rápida disposición de energía, incluso en ausencia de aportación de glucosa por la ingesta de alimentos. En este sentido, situaciones metabólicas como la proteólisis o la glucólisis muscular, que dan lugar a aminoácidos como la alanina y a productos como el lactato, respectivamente, que posteriormente forman parte importante de la gluconeogénesis en el hígado, son un claro ejemplo del intercambio de sustratos metabólicos entre ambos órganos.^[274-280]

1.7 Glucógeno fosforilasa

La glucógeno fosforilasa (GP) es una enzima dimérica formada por dos subunidades de 97 kDa de 842 aminoácidos y un cofactor piridoxal fosfato unido a cada subunidad a través de un residuo de lisina (Lys680), cuya función es la de catalizar la degradación intracelular del glucógeno.^[281, 282] Pertenece a la familia de las fosforilasas de oligosacáridos que incluye las glucógeno fosforilasas de mamíferos y levaduras, las fosforilasas del almidón y el glucano de plantas y las fosforilasas de maltodextrina de las bacterias. Así mismo, se incluye dentro de la superfamilia de glucotransferasas, que presentan un empaquetamiento tipo Rossmann

característico en sus dominios N y C terminales así como una alta homología estructural pese a que ésta es pequeña en sus secuencias.^[283] Esta enzima presenta dos estados o formas, una forma inactiva o GP-b y otra activa o GP-a, que cristalizan en unidades celulares tetragonales isomorfas en condiciones similares. La GP-b cristaliza en presencia del activador débil inosin monofosfato (IMP) y la GP-a cristaliza en presencia de glucosa.^[284, 285]

1.7.1 Dominios de la enzima glucógeno fosforilasa.

Los dominios principales de la enzima GP son el **dominio catalítico** y el **dominio de unión a adenosín mono fosfato (AMP)** (**Fig. 19**),^[286-292] presentando así mismo otro tipo de interacciones a través de dominios alternativos como son los **sitios de unión a la molécula de glucógeno** y los **dominios de unión a nucleósidos** (**Fig. 19**).^[290, 293-296]

El dominio catalítico de la enzima GP se encuentra situado en el centro de las subunidades, próximo al dominio de unión al fosfato piridoxal, cuyo grupo 5' fosfato es esencial para su óptimo funcionamiento, y a unos 15 Å de la superficie y de la interfaz de las subunidades (**Fig. 19**). Entre los muchos estudios estructurales realizados sobre este dominio, el que más información ha proporcionado es el realizado de la forma GP-b de la enzima en la catálisis del sustrato de bajo peso molecular heptenitol. Este sustrato se compone de siete carbonos glucosilados y es fosforilado a heptulosa-2-fosfato por la enzima GP, mediante un mecanismo aparentemente idéntico al realizado por la enzima en condiciones naturales, si bien es cierto que la conformación de esta enzima resultante difiere de la observada en la glucosa-1-fosfato al unirse a la GP en el ángulo de torsión de la unión glucosídica.^[286-292] Este mecanismo catalítico depende de la proximidad del cofactor y del sustrato que es promovido por las proteínas que se encuentran alrededor, que permiten así un ambiente óptimo para la ruptura de la unión glucosídica. Aun así, la molécula de heptenitol no es suficientemente grande para generar el cambio conformacional que inducen moléculas más grandes como el glucógeno.^[297] Otro de los dominios relevantes de la enzima GP es el de unión a AMP (**Fig. 19**). Los cambios terciarios y cuaternarios que provoca la fosforilación en la estructura de la enzima GP, promueven la formación de un dominio con elevada afinidad a AMP, localizado cerca del dominio Ser14-P (**Fig. 19**). La forma GP-b es activada por la unión alostérica de AMP mediante la interacción del fosfato de esta enzima a dos residuos de arginina (Arg309 y Arg310), iniciando así su conversión a la forma GP-a de la enzima GP y permitiendo la degradación del glucógeno (**Fig. 19**).^[286]

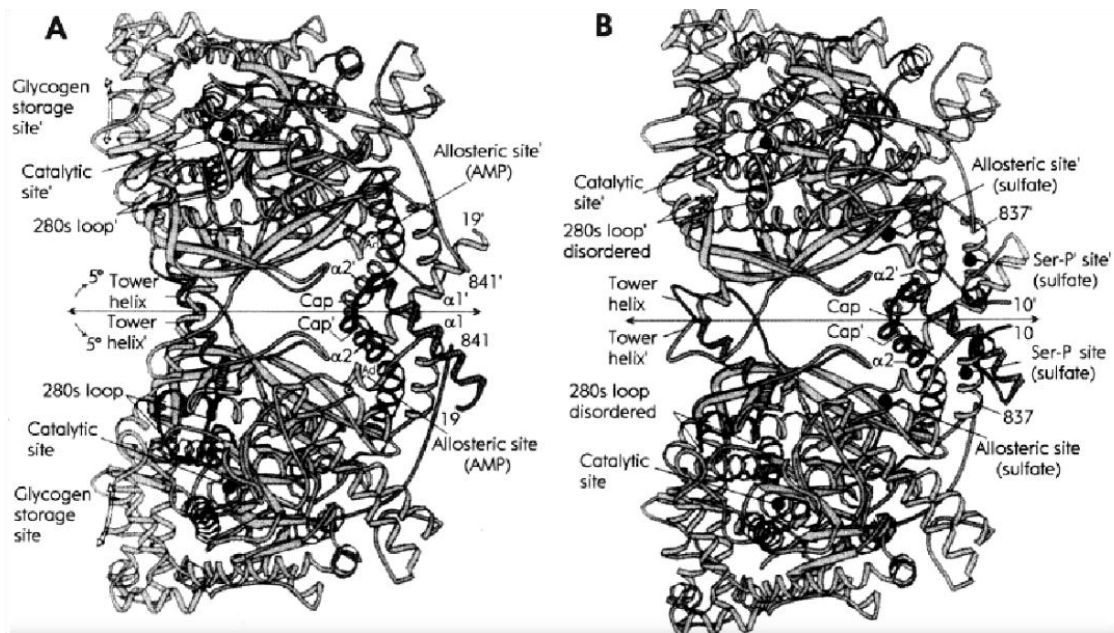


Figura 19. Esquema de Ribbon de los distintos estados del dímero de la forma GP-b de la enzima GP-M. A) Estado T de la forma GP-b. B) Estado R de la forma GP-b. Kurgamov, B. et al. (2000). "Dissociative mechanism of thermal denaturation of rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase b". La unión alostérica de AMP en el estado T de la forma GP-b de la enzima provoca un cambio conformacional liberando el acceso hacia el dominio catalítico (estado R de la forma GP-b de la enzima). Llavero, F. et al. (2019). "McArdle Disease: New Insights into Its Underlying Molecular Mechanisms". [298, 299]

Además de estos dominios principales de la enzima GP, existen otro tipo de interacciones a través de dominios alternativos que participan activamente en las funciones de ésta. La enzima GP *in vivo* presenta una gran parte de su estructura unida a partículas de la molécula de glucógeno, por lo que permite un control muy eficiente de su regulación. Este dominio se encuentra situado en la superficie de la enzima GP, a unos 30 Å de su centro catalítico y de los dominios alostéricos, formando un subdominio que incluye del residuo 397 al 437 (Fig. 19). Así, la unión a la molécula de glucógeno provoca la disociación de los tetrámeros de la enzima en dímeros activos, que compiten por unirse a este dominio de almacenamiento. Finalmente, cerca del dominio catalítico, a unos 10 Å de su entrada, se encuentra un dominio de unión a nucleósidos al que se unen análogos de las purinas y compuestos relacionados con anillos heterocíclicos tales como la adenosina, la cafeína, el FMN, el NADH o el AMP en elevadas concentraciones. Estos compuestos inhiben la acción de la enzima GP al bloquear el acceso a su dominio catalítico. [290, 293-296]

1.7.2 Función y regulación de la enzima glucógeno fosforilasa

La enzima GP cataliza la escisión fosforílica de un residuo de glucosa procedente del enlace glucosídico α -1,4 de la molécula de glucógeno, dando lugar a glucosa-1-fosfato (**Fig. 20**) que tras su isomerización a glucosa-6-fosfato podrá ser utilizada en la glucólisis.^[285]

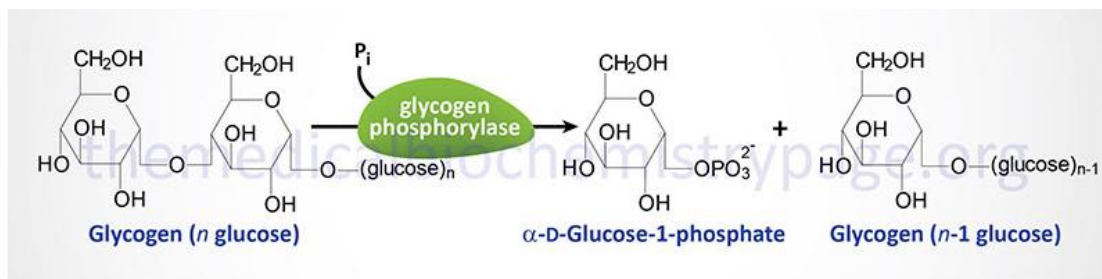


Figura 20. Reacción catalizada por la enzima GP.^[264]

En términos generales la regulación de la enzima GP es diferente en las bacterias que en las levaduras y los mamíferos, siendo éstos últimos altamente susceptibles a la regulación de tipo alostérico, gracias al difícil acceso a sus regiones catalíticas.^[283] La interconversión entre sus formas a y b depende por un lado de la fosforilación del residuo Ser14 a través de la fosforilasa quinasa (PHK) vía AMPc, para la activación de la enzima, y por otro de la proteína fosfatasa 1 (PP1) para su inactivación (**Fig. 21**). Así mismo, esta enzima presenta otros reguladores como son la glucosa, la glucosa-6-fosfato y el ATP, que funcionan como inhibidores de la misma, y el AMP que actúa como activador (**Fig. 21**).^[285, 300] Si bien la glucosa se une al sitio de activación, el AMP, el ATP y la glucosa-6-fosfato son reguladores alostéricos de la enzima. El glucógeno también participa en la regulación de la GP a través de su unión al sitio de almacenamiento de éste. Así, tanto los procesos de fosforilación y defosforilación como la unión de ligandos alostéricos producen la interconversión entre las formas activa e inactiva, permitiendo un cambio conformacional en la enzima y el acceso a los dominios con función específica, como sería el caso de la activación, cuyo cambio conformacional permite al glucógeno acceder al dominio catalítico de la enzima.^[281, 285, 301]

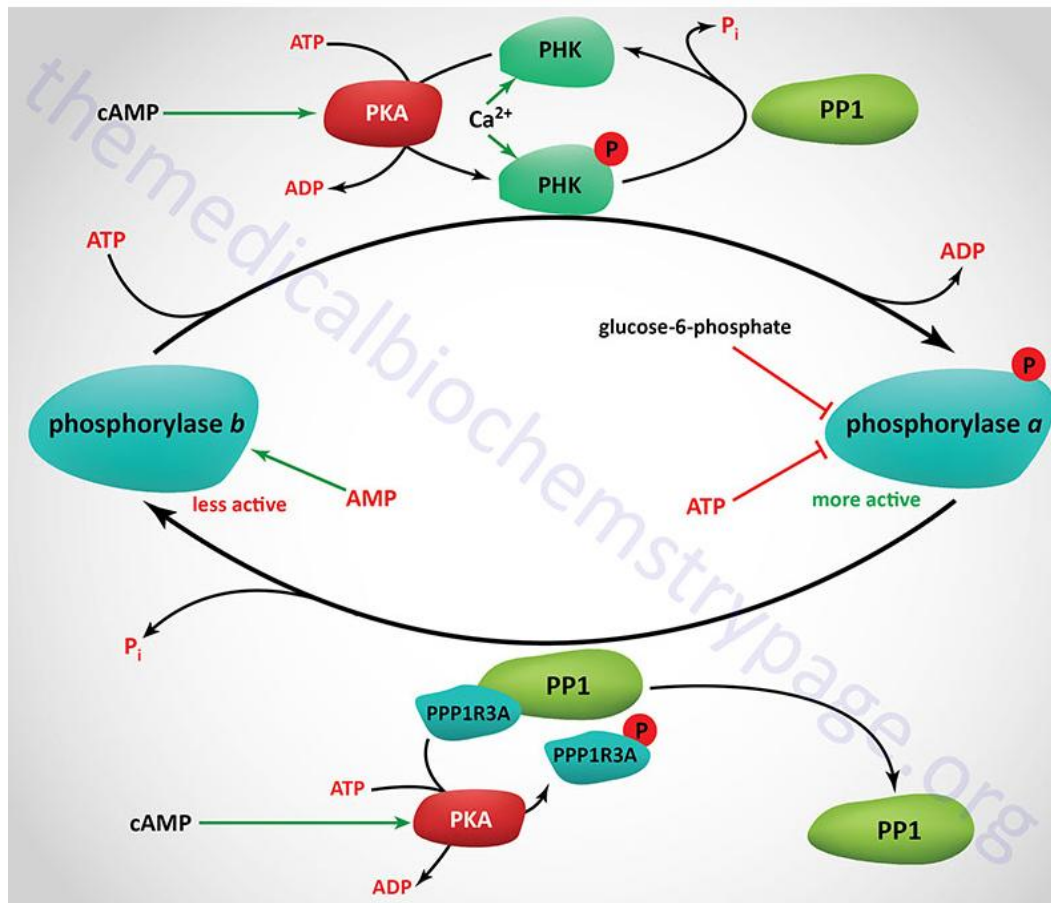


Figura 21. Enzimas y moléculas implicadas en la regulación de la glucógeno fosforilasa en el músculo esquelético. PKA es una proteína quinasa dependiente de AMPc. PHK corresponde a la enzima fosforilasa quinasa. Las flechas verdes indican efectos positivos en las enzimas. Las flechas rojas indican efectos inhibitorios en las enzimas. La fosforilasa b, la forma menos activa, se fosforila para ser activada a través de PHK en el residuo Ser 14. La enzima PHK es así mismo fosforilada por la enzima PKA, que a su vez es fosforilada por mecanismos mediados por receptores. Así mismo la enzima PKA fosforila a la proteína de unión a glucógeno (PPP1R3A), también conocida como PTG, que sirve como subunidad reguladora de la enzima PP1 en el músculo esquelético. La proteína PPP1R3B, conocida como la forma hepática de la proteína PTG, regula la actividad de la enzima PP1 en los hepatocitos. La fosforilación de PKA mediada por PPP1R3A provoca la disociación de la actividad catalítica de la enzima PP1, cuya consecuencia es la inhibición de la eliminación de un fosfato, permitiendo así que las enzimas activadas (fosforilasa a y PHK) permanezcan en ese estado durante más tiempo. Los iones de calcio pueden activar la enzima PHK incluso en ausencia de la fosforilación de la enzima.^[264]

1.7.3 Isoformas de la glucógeno fosforilasa

Existen tres isoformas de la GP que son expresadas tanto por humanos como por otros mamíferos, y sus nombres hacen referencia al tejido en el que son expresadas principalmente, así existe la glucógeno fosforilasa hepática (GP-L), la glucógeno fosforilasa muscular (GP-M) y la glucógeno fosforilasa cerebral (GP-B), codificadas por los genes *PYGL*, *PYGM* y *PYGB* respectivamente, de los cromosomas 14, 11 y 20. Éstas presentan un importante grado de homología, principalmente en los residuos próximos a las zonas catalítica y alostérica.^[281, 301]

Por otra parte, estas isoformas presentan funciones concretas en el tejido en el que se expresan mayoritariamente, así la GP-L regula la liberación de glucosa procedente de las

reservas de glucógeno hepático, la GP-M se encarga de proporcionar energía para la contracción muscular a través de la generación de ATP y la GP-B ayuda a la distribución de la glucosa en condiciones de anoxia o hipoglucemia severa.^[300]

1.8 Glucogenosis

Las glucogenosis representan un conjunto de enfermedades hereditarias de poca prevalencia que afectan al metabolismo del glucógeno (**Fig. 22**). Se han descrito un total de quince y suelen afectar de forma más grave al hígado y al músculo ya que son órganos que presentan una gran abundancia de glucógeno.^[302] Existen varios tipos de glucogenosis cuya nomenclatura viene dada por la enzima del metabolismo del glucógeno a la que afectan, y pueden agruparse en hepáticas y musculares, según sea el órgano implicado principalmente (**Fig. 22**).^[272, 302]

1.8.1 Glucogenosis hepáticas

En términos generales las características que presentan los pacientes que sufren este tipo de glucogenosis como consecuencia de las mismas son hepatomegalia, hipoglucemia y retraso del crecimiento. Las diferencias que se pueden encontrar entre los distintos tipos son las que quedan descritas brevemente en la siguiente tabla (**Tabla 1**).^[272]

Nombre	Enzima afectada (Gen)	Órgano afectado	Características clínicas	Alteraciones bioquímicas
Ia, von Gierke	Glucosa-6-fosfatasa (G6PC)	Higado, riñón	Hepatomegalia +++, retraso del crecimiento	Hipoglucemia +++, acidemia láctica, uricemia++, lipidemia, cetosis leve
Ib	Glucosa 6-fosfatasa traslocasa (SLC37A4)	Higado, riñón, leucocitos	Hepatomegalia, retraso del crecimiento, neutropenia, úlceras orales e intestinales	Hipoglucemia +++, acidemia láctica, uricemia++, lipidemia, cetosis leve
III, Cori, Forbes	Enzima desramificante (AGL)	Higado, músculo	Hepatomegalia, retraso del crecimiento	Hipoglucemia, cetosis++, hiperlipidemia, CK, transaminasas
IV, Anderson	Enzima ramificante (GBE1)	Higado	Hepatomegalia, retraso del crecimiento, distensión abdominal, cirrosis	Hipoglucemia infrecuente
VI, Hers	Fosforilasa (PYGL)	Higado	Hepatomegalia, retraso del crecimiento, distensión abdominal	Hipoglucemia, cetosis leve
IX	Fosforilasa-β-quinasa (PHKA2)	Higado y/o músculo	Hepatomegalia, retraso del crecimiento (GSD-IXa:herencia ligada al X)	Hipoglucemia, cetosis leve, hiperlipidemia moderada
0	Glucógeno sintasa (GYS2)	Higado	Hepatomegalia, retraso del crecimiento Hipotonia, debilidad muscular	Hipoglucemia, cetosis leve, hiperlipidemia moderada
Síndrome de Fanconi-Bickel (GSD secundaria)	Transportador GLUT2 (SLC2A2)	Higado, riñón	Hepatomegalia, tubulopatía de Fanconi, retraso del crecimiento	Hipoglucemia (ayuno), glucosuria, hiperaminoaciduria, acidosis, hiperfosfatemia,...

Tabla 1. Principales glucogenosis hepáticas y sus características más relevantes.^[303]

1.8.2 Glucogenosis musculares

En este tipo de glucogenosis, las características generales que suelen presentar los pacientes son la acumulación de glucógeno en las fibras musculares o un problema en su síntesis, que darán lugar a síntomas tales como intolerancia al ejercicio o problemas derivados de su realización, mioglobinuria y debilidad progresiva.

A su vez, estas glucogenosis musculares pueden clasificarse en:

-**Primarias:** causadas por defectos genéticos en las enzimas directamente implicadas en la síntesis/degradación del glucógeno o en el metabolismo de la glucosa (**Tabla 2**).

-**Secundarias:** causadas por la pérdida de función de proteínas reguladoras que afectan indirectamente a las enzimas implicadas en las vías metabólicas del glucógeno y la glucosa (Tabla 3).

Las características principales de los distintos tipos de glucogenosis musculares, agrupadas atendiendo a esta subclasificación, podemos encontrarlas resumidas brevemente en las siguientes tablas (Tablas 2 y 3).^[272, 304]

Nombre	Enzima afectada (Gen)	Características clínicas
II, Pompe	α -glucosidasa ácida (GAA)	Infantil: cardiomegalia, hepatomegalia, hipotonía/Juvenil y adulto: debilidad progresiva
III, Cori	Enzima Desramificante (AGL)	Infancia: hipotonía, debilidad, hepatomegalia, cardiopatía, hipoglucemia/Adulto: debilidad progresiva
IV, Andersen	Enzima Ramificante (GBE1)	Congénita: hipotonía, fallo hepático/Juvenil y adulto: debilidad proximal
V, McArdle	Miofosforilasa (PYGM)	Intolerancia al ejercicio, mialgia, calambres/Tardía: mioglobinuria, debilidad
VII, Tarui	Fosfofructoquinasa (PFKM)	Intolerancia al ejercicio, mialgia, calambres, mioglobinuria, debilidad
IX	Fosforilasa quinasa (PHKA1)	Intolerancia al ejercicio, mialgia, calambres, mioglobinuria, debilidad
PGK	Fosfoglicerato quinasa (PGK1)	Intolerancia al ejercicio, mialgia, calambres, mioglobinuria, debilidad, anemia hemolítica, epilepsia
X	Fosfoglicerato mutasa (PGAM2)	Intolerancia al ejercicio, mialgia, calambres, mioglobinuria, debilidad
XI	Lactato deshidrogenasa (LDHA)	Intolerancia al ejercicio, mialgia, calambres, mioglobinuria, debilidad, acroeritema
XII	Aldolasa (ALDO-A)	Intolerancia al ejercicio, debilidad
XIII	β -enolasa (ENO)	Intolerancia al ejercicio, debilidad
XIV	Fosfoglucomutasa (PGM1)	Intolerancia al ejercicio, mioglobinuria

Tabla 2. Principales glucogenosis musculares primarias y sus características más relevantes.^[303]

Nombre	Enzima afectada (Gen)	Características clínicas
Depleción		
XV	Glicogenina (GYG1)	Debilidad
0	Glucógeno sintasa (GYS1)	Intolerancia al ejercicio
Secundarias		
FCNHG FHC/WPWS	AMPK (PRKAG2)	Cardiomegalia masiva/Cardiomiopatía hipertrófica con WPWS
E.de Lafora	Laforin (EPM2A)/ Malin (EPM2B)	Epilepsia <u>mioclónica</u> progresiva/Intolerancia al ejercicio, mialgia, calambres, <u>mioglobinuria</u> , debilidad, anemia hemolítica, epilepsia

Tabla 3. Principales glucogenosis musculares secundarias y sus características más relevantes.^[303]

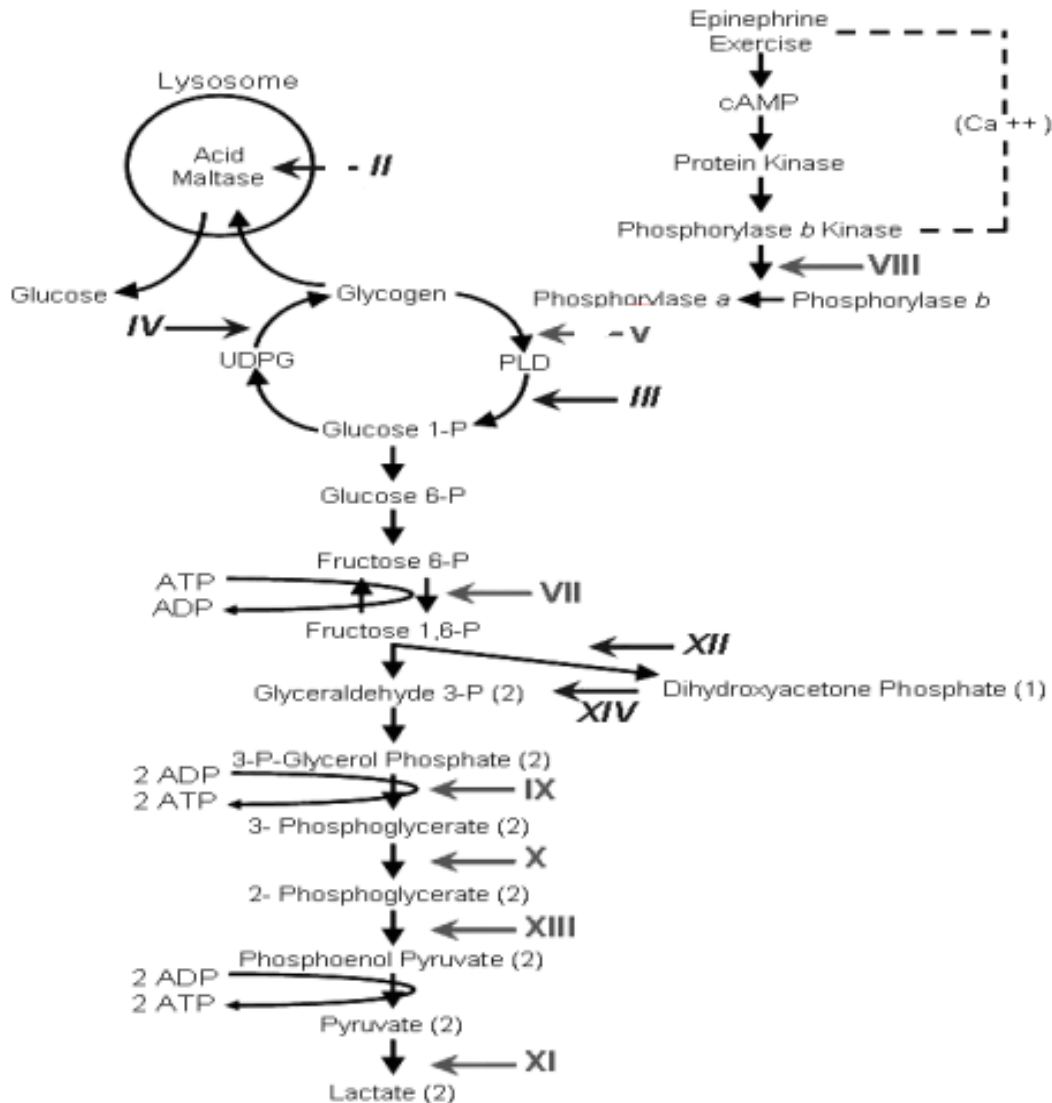


Figura 22. Esquema del metabolismo del glucógeno en el que aparecen las enzimas que se ven afectadas en algunas glucogenosis (en azul). UDP: uridina difosfato; UDPG: uridina difosfoglucosa; UTP: uridina trifosfato; PPI: pirofosfato; Pi: fosfato inorgánico. Labrune, P., et al (2010). "Glucogenosis".^[302]

1.9 Enfermedad de McArdle: visión general

La enfermedad de McArdle, o glucogenosis tipo V (GSD5; OMIM#232600/ORPHA368), es una enfermedad autosómica recesiva, causada por mutaciones en ambas copias del gen *PYGM*, que codifica para la enzima **GP-M**, situado en el brazo largo del cromosoma 11 humano (11.q.13.1).^[305-307] La actividad de dicha enzima es nula en pacientes con esta enfermedad (Fig. 23), por ello en el músculo esquelético de estos enfermos hay grandes acumulaciones de glucógeno subsarcolémico.^[308-310]

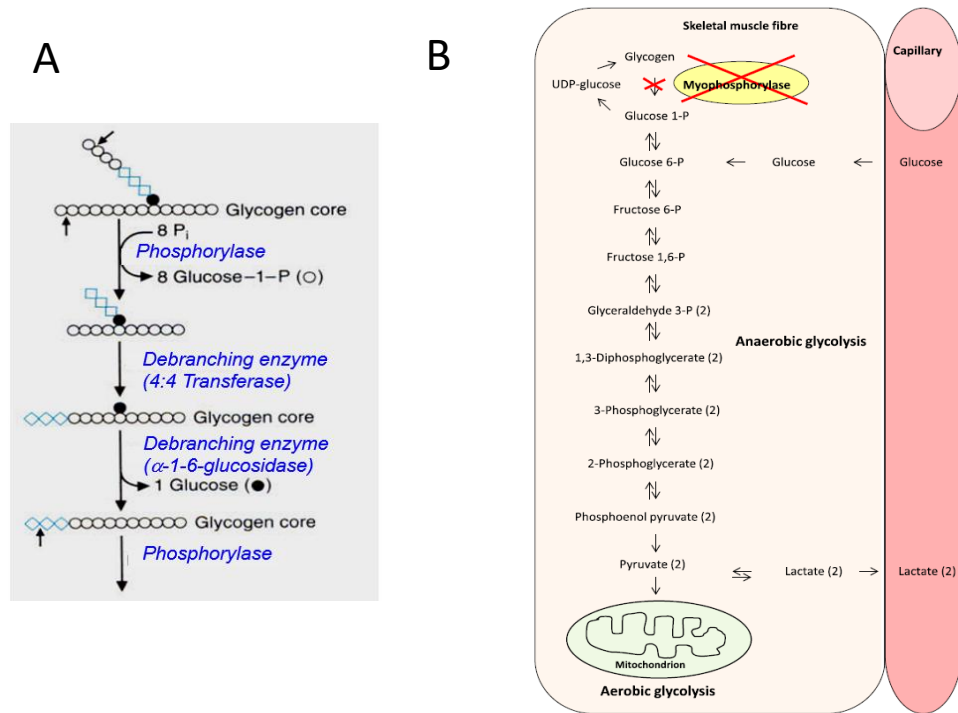


Figura 23. Representación esquemática del bloqueo metabólico producido por la deficiencia de la enzima glucógeno fosforilasa muscular (GP-M). Santalla et al. (2014). "McArdle disease: a unique study model in sports medicine".^[311]

Hasta la fecha se han identificado más de 150 mutaciones distintas en el gen *PYGM* que dan lugar a esta enfermedad, aunque la más extendida en la población Caucásica es la mutación *nonsense p.R50X*, que presenta una frecuencia alélica de $\approx 50\%$ (Fig. 24).^[312] La enfermedad de McArdle es una de las miopatías genéticas más frecuentes, que en España presenta una prevalencia de 1 caso por cada ≈ 140.000 habitantes y afecta a ambos sexos en igual proporción.^[307, 311] La enfermedad suele aparecer en las primeras etapas de la infancia, sin embargo un 47% de los casos no son diagnosticados hasta pasada la tercera década de vida de los pacientes, dada su condición de enfermedad rara y que sus síntomas pueden llegar a ser muy leves en algunos casos.^[307, 313]

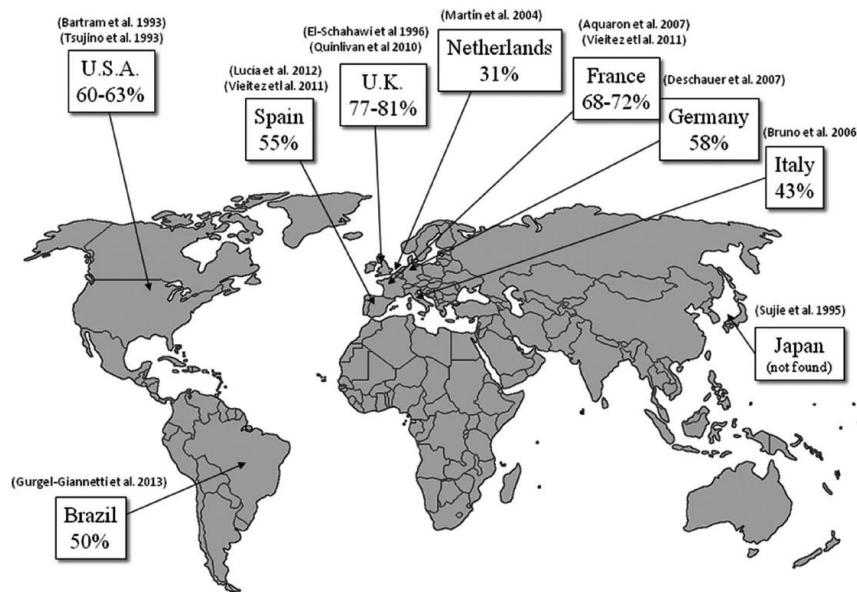


Figura 24. Mapa de la distribución mundial de la mutación *p.R50X*. Nogales-Gadea, G. et al (2015). "McArdle Disease: Update of Reported Mutations and Polymorphisms in the *PYGM* Gene".^[309]

1.9.1 Sintomatología

A nivel clínico, los enfermos que padecen esta enfermedad presentan intolerancia al ejercicio, que se manifiesta en forma de crisis agudas de fatiga prematura, rampas y contracturas, pudiendo ésta ir acompañada de daño muscular y rabiomiolisis, hiper-CK-emia y mioglobulinuria.^[307]

-Intolerancia al ejercicio: Es la consecuencia más característica de la enfermedad. Comienza en la infancia y en la mayoría de los casos se desencadena principalmente con contracciones musculares estáticas y ejercicios dinámicos tales como andar deprisa y subir escaleras, afectando incluso a las actividades diarias. Se manifiesta con crisis agudas de fatiga muscular acompañadas de calambres y contracturas, principalmente al iniciarse el ejercicio, que suelen mitigarse al cesar éste.^[311]

-Rabiomiolisis: En muchas ocasiones la actividad física puede producir rabiomiolisis, debido al daño muscular, que viene acompañada por hiper-CK-emia y mioglobulinuria, pudiendo dar lugar a un fallo renal agudo y a hiperkalemia.^[311]

-Debilidad muscular: La presentan una parte pequeña de los afectados, un 21 % concretamente en el registro español de la enfermedad, y parece ser desencadenada por la suma de episodios de rabiomiolisis sufridos por el enfermo a lo largo de su vida y, por tanto, se agrava con la edad. En la mayoría de los casos suele afectar a músculos proximales.^[307, 311, 313]

313]

-**Second wind**: Uno de los fenómenos característicos de esta enfermedad es el denominado “*second wind*”, que está descrito como la capacidad de retomar una actividad física dinámica tras un breve receso de la misma, justo antes de la aparición de las crisis agudas características del comienzo de este tipo de ejercicios (**Fig. 25**).^[310] Este fenómeno es fácilmente detectable si se somete al paciente a un ejercicio de carga constante, como el test de “*cycle-ergometer*” (**Fig. 25**), observándose inicialmente un incremento en el ritmo cardíaco hasta valores que oscilan entre las 140-150 pulsaciones por minuto, que una vez transcurridos 7-8 minutos se ve reducido a valores más normales. De esta forma, el comienzo del ejercicio funcionaría como un calentamiento hasta que las fibras musculares puedan oxidar una mayor cantidad de ácidos grasos circulantes y glucosa procedente del hígado, así mismo también se acompaña de una vasodilatación en el músculo que permite una mayor oxigenación del mismo.^[311, 314]

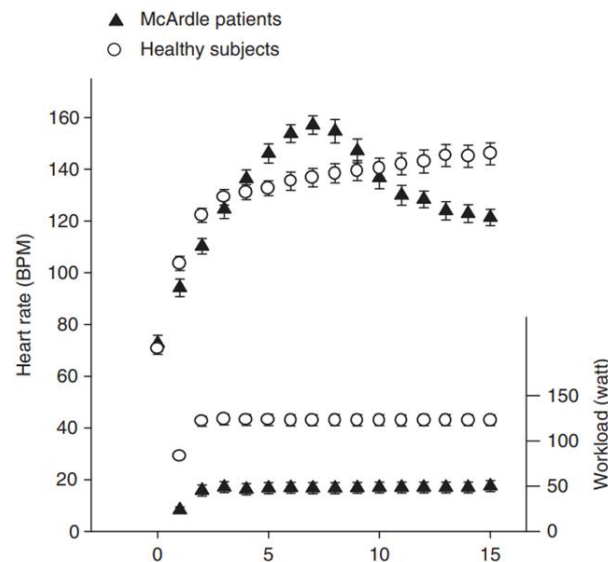


Figura 25. Gráfico descriptivo del fenómeno “*second wind*”. El gráfico muestra cómo al inicio del ejercicio el ritmo cardíaco se dispara rápidamente a medida que la carga de trabajo aumenta y, tras unos minutos, con la disponibilidad de glucosa hepática o ácidos grasos, el paciente atenúa los efectos de la intolerancia al ejercicio. Vissing, J. (2010).^[315]

1.9.2 Histología

La acumulación anormal de glucógeno en el tejido muscular de los afectados por la enfermedad de McArdle, produce un daño progresivo en la estructura de sus fibras musculares que le confiere unas características histológicas típicas a este tejido muscular. En tinciones de hematoxilina/eosina (H&E) puede observarse la presencia de vacuolas subsarcolémicas e intracitoplásmicas por la acumulación de glucógeno no degradado (**Fig. 26 A y 27 a**), así mismo mediante la tinción de ácido periódico Schiff (PAS), específica para glucógeno, se pueden ver también estas grandes acumulaciones de glucógeno subsarcolémico en biopsias musculares de

este tipo de pacientes (**Fig. 26 B**). Por último, se puede evidenciar la ausencia de la enzima GP-M en análisis histoquímicos, comparando estas biopsias con otras de tejido muscular humano que no presentan esta patología (**Fig. 26 C, D y 27 b**).^[316, 317]

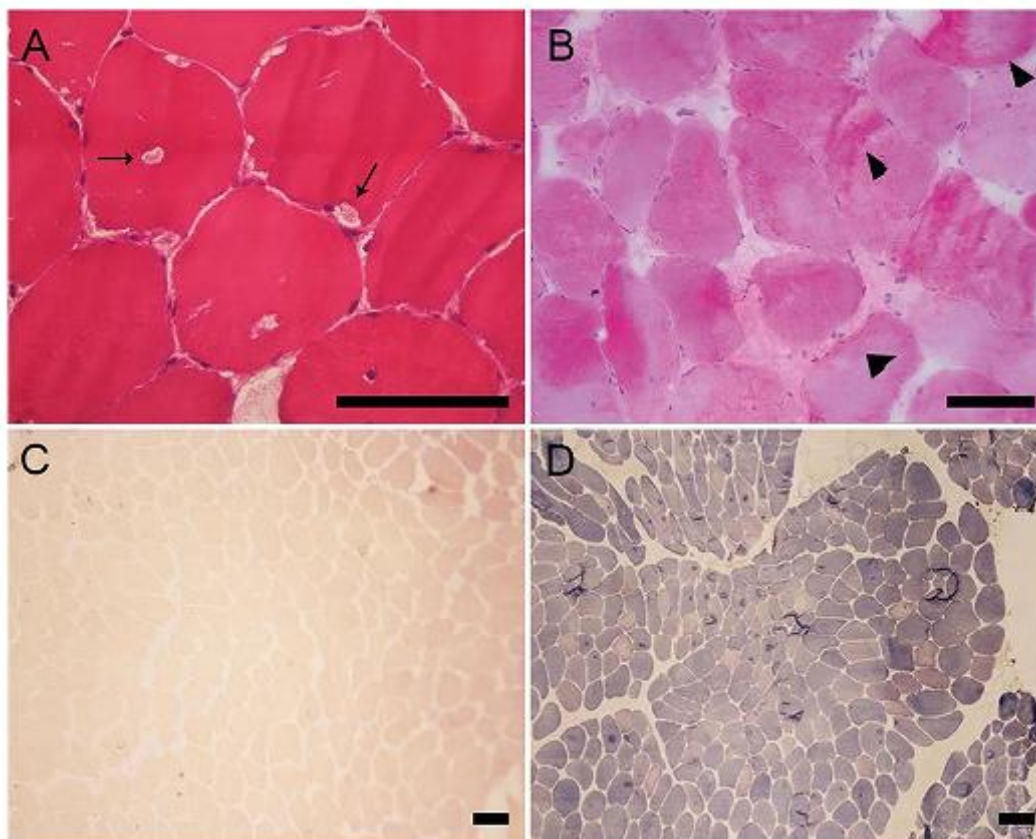


Figura 26. Biopsia muscular de un paciente con la enfermedad de McArdle. A) Tinción H&E que muestra vacuolas intracitoplasmáticas y subsarcolémicas en la fibra muscular (flechas). B) Tinción PAS donde se observa la acumulación subsarcolémica de glucógeno (punta de flecha). C) Ausencia de tinción a la reacción de la GP-M (reacción negativa de la GP-M). D) Reacción normal a la GP-M en biopsia de paciente que no presenta la enfermedad de McArdle. Flechas negras = 100 μ m. Pallo, P.A.O., et al (2018). "McArdle's disease: an underestimated or underdiagnosed myopathy in rheumatologic practice? Cases series and literature review".^[317]

1.9.3 Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad de McArdle puede llegar a ser complejo pese a que los síntomas empiezan a desarrollarse desde la infancia, aproximadamente un 47 % de los pacientes no son correctamente diagnosticados hasta la cuarta década de vida.^[307]

La sospecha de un paciente con la enfermedad de McArdle comienza cuando se observa que presenta intolerancia al ejercicio, generalmente desde la infancia, aunque en el momento de la evaluación pueda presentar o no debilidad muscular. El paciente puede manifestar incluso que dicha intolerancia puede verse mejorada si previamente ha ingerido carbohidratos.

Estos pacientes presentan también niveles elevados de creatina quinasa en suero (hiper-CK-emia) no precedidos por la práctica de algún ejercicio intenso en las horas o días previos. En un

estudio de 24 pacientes, se han llegado a medir niveles medios de hasta 3200 U/l en los pacientes masculinos y de 1600 U/l en las pacientes femeninas, en condiciones de reposo.^[318, 319] También sería un criterio a considerar para un diagnóstico positivo el que el paciente refiera haber sufrido con anterioridad uno o más episodios de hiper-CK-emia después de realizar un ejercicio intenso.^[180] Además de éstas, existen otras pruebas que pueden ayudar a diagnosticar la enfermedad de McArdle, como es el caso del fenómeno de “*second wind*” descrito previamente (**Fig. 25**), y el test isquémico o anaeróbico del antebrazo. Éste último consiste en inflar el esfigmomanómetro en el antebrazo del paciente hasta alcanzar los 20 mm de Hg por encima de su presión arterial sistólica y realizarle una prueba de esfuerzo en estas condiciones hasta alcanzar la fatiga, midiendo sus niveles de lactato, piruvato y amonio en sangre venosa, después del esfuerzo realizado. La elevación del amonio por encima del 200 % de su valor basal, así como la falta de incremento de los valores de piruvato y lactato, son indicativos de la presencia de la enfermedad de McArdle.^[320] Esta prueba fue uno de los primeros test utilizados para el diagnóstico de la enfermedad, aunque presenta algunos inconvenientes tales como el dolor que puede producir en el paciente, su praxis y la presencia de falsos negativos y falsos positivos.^[321-323]

La confirmación del diagnóstico puede realizarse de dos maneras distintas: a) mediante el análisis histológico de las biopsias musculares (generalmente *vastus lateralis* o *biiceps brachialis*), utilizando la prueba histoquímica de la miofosforilasa (**Fig. 27**), b) mediante análisis genético. Este último caso presenta la complejidad del gran número de mutaciones diferentes que afectan al gen *PYGM*, aunque el problema puede ser solventado si el diagnóstico se centra en el origen geográfico del paciente. Así, la mutación *p.R50X* es la más frecuente en la población Caucásica, por lo que debe ser la primera mutación a comprobar en pacientes con dicho origen, la mutación *p.F710* es la más frecuente entre los pacientes japoneses, la *p.W798R* entre los españoles y la *p.E541X* entre los finlandeses. Aun siendo éstas las mutaciones más frecuentes para las distintas poblaciones, puede darse el caso de mutaciones que sólo estén presentes en un paciente o en un grupo de ellos, por lo que durante la práctica de estos análisis genéticos se pueden descubrir nuevas mutaciones que den lugar a la enfermedad de McArdle.^[324-333]

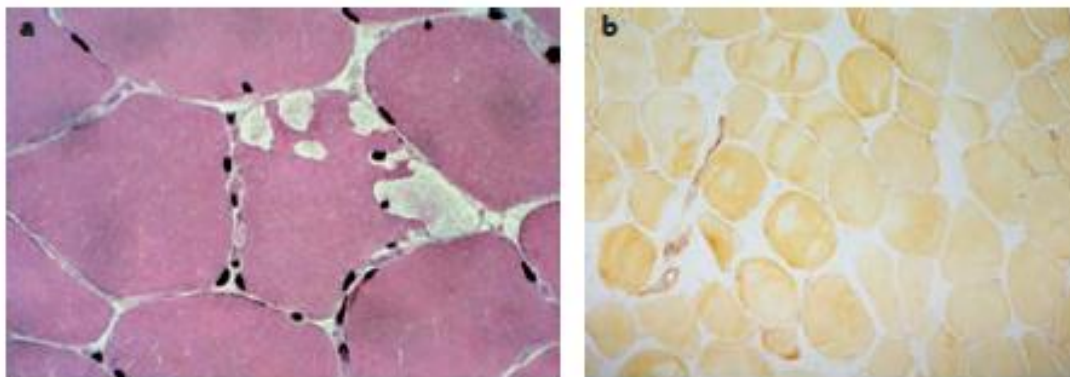


Figura 27. Biopsia muscular de un paciente con la enfermedad de McArdle. a) Tinción H&E que ilustra las vacuolas subsarcolémicas con el exceso de glucógeno almacenado. b) Tinción histoquímica que revela la ausencia de la GP-M. Las isoformas fetal y cerebral de esta enzima pueden observarse en el músculo liso de los vasos sanguíneos. Godfrey, R. y Quinlivan, R. (2016). *“Skeletal muscle disorders of glycogenolysis and glycolysis”*.^[316]

1.9.4 Modelos animales

Se han descrito dos modelos animales espontáneos de la enfermedad de McArdle, el modelo bovino o “Charolais cattle” y el modelo ovino o “Merino sheep”. Ambos modelos presentan algunas características fenotípicas similares a las desarrolladas por los humanos que padecen la enfermedad, entre las que destacan la intolerancia al ejercicio, la rabdomiolisis, la elevada fatiga muscular en estudios de contractibilidad y la inactividad de la glucógeno fosforilasa muscular en tinciones histopatológicas (**Tabla 4**).^[310, 311]

No obstante las ventajas que presentan estos modelos, ya que comparten cierta similitud con los humanos en cuanto a las características fenotípicas, a la composición muscular y a la densidad mitocondrial muscular, también presentan importantes desventajas, tales como la baja capacidad reproductiva, debido tanto al largo periodo de gestación como al bajo número de individuos por cada nacimiento; la dificultad en su manejo y su transporte, debido a su gran tamaño, y que no han aportado información en profundidad de los aspectos fisiopatológicos de la enfermedad, concretamente de la relación entre las características de este trastorno y el ejercicio.^[310-312]




Animal model	Phenotype	Advantages	Disadvantages	Therapies evaluated
 Bovine (mutation: p.W489R)	Exercise intolerance Rhabdomyolysis Blood analysis abnormalities: ↑K ⁺ ↑Phosphate ↓Ca ²⁺ ↑CK Histopathology: -No staining for GP-MM activity. -Subsarcolemmal glycogen vacuoles -Some central nuclei -PAS staining within normal limits.	Spontaneous animal model Muscle fiber type composition (I and IIA fibers) similar to humans Mitochondria density volume per fiber volume (2-5%) similar to humans	Difficult to obtain animals for experimentation owing to: Long gestation period (270-295 days) Only 1 calf per birth Difficult to manipulate (average cow weight ~450kg) Difficult to share with other research groups High maintenance costs	None
 Ovine (mutation: truncation of the last 31 amino acid of the protein)	Exercise intolerance Histopathology: No staining for GP-MM activity. PAS staining with high glycogen content.	Spontaneous animal model Animal size and muscle mass comparable to humans Muscle fiber type composition (I and IIA fibers) similar to humans Mitochondria density volume per fiber volume (2-5%) similar to humans	Difficult to obtain animals for experimentation owing to: Long gestation period (147 days) 1-3 lambs per birth Difficult to manipulate (sheep weight 45-100kg) Difficult to share with other research groups High maintenance costs	Gene therapy: AAV2/AdV5-Pygm vectors Pharmacologic: Valproic acid Notexin
 Murine (mutation: p.R50X)	Exercise intolerance ↑ blood CK Myoglobinuria Histopathology: No staining for GP-MM activity. PAS staining with high glycogen content Molecular studies: Lack of GP-MM protein. Lack of GP-MM activity. Very low Pygm mRNA (10% of normal levels)	Presents with a complete McArdle disease phenotype Presents the most common mutation in Caucasian McArdle patients (p.R50X) and allows to evaluate different therapies (e.g. read through compounds) Easy to manipulate (mouse weight 20-45g) Easy to share with other research groups Low maintenance costs Easy to obtain animals for experimentation: -Short gestation period (19-21 days). -High litter size (7-12 pups per litter)	Genetically modified animal model: 34 bp LoxP sequence is present in intron 1 Prenatal mortality in homozygous mice ~25% mortality in homozygous mice after weaning and before 3 months of age Higher glycogen accumulation in homozygous mice muscles than in human patients Different muscle fiber type composition (predominantly IIX and IIB fibers) compared to humans (predominantly I and IIA fibers) Different mitochondria density volume per fiber volume (30% compared to humans (2-5%))	None

Tabla 4. Características de los principales modelos animales para la enfermedad de McArdle. Nogales-Gadea, G. et al. (2015) "The pathogenomics of McArdle disease genes, enzymes, models, and therapeutic implications".^[310]

1.9.5 Generación del modelo murino de la enfermedad de McArdle

Por los motivos expuestos, en nuestro grupo se abordó el desarrollo de un modelo murino *knock-in* para la mutación p.R50X en *PYGM*, la más frecuente en pacientes Caucásicos.^[310-312] La generación y posterior caracterización de este modelo animal ha demostrado que presenta las principales características fenotípicas de los pacientes con esta enfermedad: ausencia total de proteína y actividad de la GP-M, grandes acumulaciones de glucógeno en forma de depósitos subsarcolémicos e intolerancia al ejercicio.^[312] Así mismo, se confirmó mediante cuantificación bioquímica la gran acumulación de glucógeno en estos ratones, siendo sus niveles hasta ≈ 27 veces mayores que los observados en los ratones WT, demostrándose también que los depósitos de glucógeno eran mayoritarios en las fibras musculares Tipo II (**Fig. 28**), revelando así diferencias en el patrón de acumulación del glucógeno en las mismas. Éstas grandes acumulaciones de glucógeno observadas en el modelo murino para esta enfermedad, pueden llegar a ser en función del músculo, entre 20 y 40 veces mayores que las observadas en ratones WT.^[312]

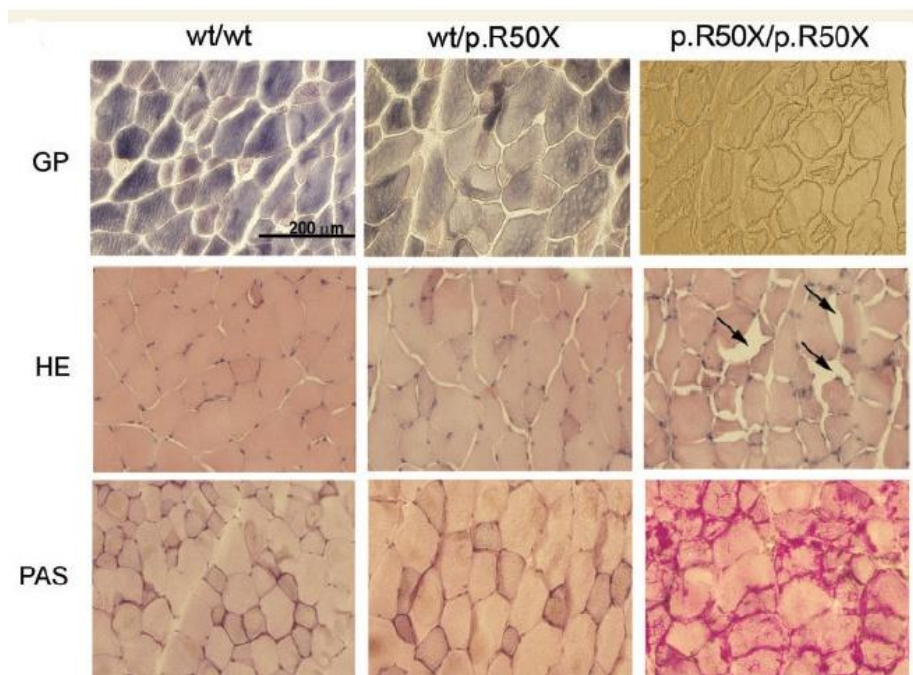


Figura 28. Imágenes histológicas representativas del músculo *gastrocnemius* del modelo de ratón para la enfermedad de McArdle. GP: glucógeno fosforilasa, HE: tinción hematoxilina-eosina, PAS: tinción Schiff con ácido periódico. WT/WT: ratones controles o sanos, WT/p.R50X: ratones heterocigotos para mutación p.R50X y p.R50X/p.R50X: ratones homocigotos para la mutación p.R50X, con la enfermedad de McArdle. Todas las imágenes fueron tomadas con el mismo aumento, 200 µm. Las flechas negras en la imagen de la tinción con hematoxilina eosina, correspondiente al individuo homocigoto, muestran la acumulación de glucógeno. Nogales-Gadea, G. y Pinós, T et al. (2012). "Knock-in mice for the R50X mutation in the PYGM gene present with McArdle disease".^[312]

Por otra parte, los resultados obtenidos en las pruebas de esfuerzo, tanto en el test "wire grip", donde se evalúa la fuerza del animal, como en el test "treadmill running", donde se mide su resistencia, muestran intolerancia al ejercicio, presentándose además mioglobinuria inducida por el mismo, que también está presente entre las características fenotípicas de los pacientes de McArdle (Fig. 29 A y B). Así mismo, la caracterización de este modelo animal ha revelado que la acumulación de glucógeno afecta a la fuerza que genera el músculo.^[312, 334] En estudios de contracción realizados en los músculos EDL y *soleus* de ratones McA, HTZ y WT, se ha observado que en los primeros estos músculos presentan un menor número de contracciones cuando se les somete a breves periodos de estimulación, siendo esta diferencia más acusada en el caso del músculo EDL.

También se ha demostrado que en este músculo la fuerza de contracción disminuye más rápidamente y el tiempo en el que se consume la energía disponible es más corto, más incluso que en el músculo *soleus* de los ratones con este mismo genotipo, hecho que reproduce el comportamiento muscular de los pacientes de McArdle. Finalmente, también se ha observado que en el músculo EDL de ratones McA, la fuerza producida en la última contracción antes de

la fatiga muscular es significativamente menor que la producida en ese mismo músculo de ratones WT y HTZ, e incluso que la producida en el *soleus* de ratones McA.^[334]

En relación con el grado de afectación de los distintos músculos del modelo murino de la enfermedad, también se ha observado que la expresión tanto de mRNA de *Pygm* como de proteína GP-M, en músculo TA de ratones WT, era 7 veces mayor que en el QUAD, presentando éste último unas fibras musculares mucho menos degeneradas que el TA en los ratones con la enfermedad, sugiriendo así una potencial correlación entre el grado de expresión de *Pygm* en músculos de ratones WT y el daño observado en las fibras musculares de ratones McA. En esta línea, la caracterización de este modelo animal ha revelado que histológicamente las fibras tipo I y mixtas tipo I/IIa del *soleus* están estructuralmente menos afectadas y que, sin embargo, en los músculos EDL, TA y QUAD, las fibras tipo IIa, IIx y mixtas tipo IIa/IIx presentan un alto grado de afectación a nivel estructural mientras que en las fibras mixtas tipo IIx/IIb la afectación es mucho menor.^[334] Así mismo, los músculos glucolíticos de los ratones McA inhiben la síntesis de glucógeno mediante inhibición de la actividad de la enzima GS para hacer frente a la acumulación del mismo, respondiendo de igual manera que los pacientes con esta enfermedad.^[335] Así, este mecanismo responde a una adaptación metabólica de los distintos tipos de fibras musculares, como demuestran las grandes diferencias en el metabolismo de la glucosa observadas en el músculo QUAD, que sin embargo no se aprecian en los músculos TA, EDL y *soleus*.^[335] En esta línea, la captación de glucosa en el músculo QUAD de ratones McA parece estar inducida por la contracción muscular, mientras que en los pacientes se observa una captación de glucosa más dependiente de insulina y un incremento significativo de los niveles proteicos de las enzimas relacionadas con la ruta de la glucólisis, como es el caso de los de la enzima PFK.^[335, 336] Estas características observadas en los pacientes McArdle indicarían su adaptación para asegurar que cualquier sustrato de fructosa-6-fosfato presente en las células, va a ser utilizado vía glucólisis para la obtención de energía y que se produce una rápida utilización de la glucosa-6-fosfato impidiendo su acumulación, compensando así la carencia energética producida por la ausencia de la enzima GP-M.^[335-339]

captación de glucosa no parece estar inducida por la activación de la enzima AMPK, como ocurre en los ratones McA, lo que nos hace pensar que este mecanismo compensatorio no puede ser utilizado en humanos al no disponer de fibras musculares tipo IIb. Así mismo, el incremento de los niveles del transportador GLUT4 observado en pacientes McArdle estaría más relacionado con resultados previos que indican que éstos presentan una mayor captación de glucosa durante el ejercicio que los pacientes sanos o controles.^[337, 338]

En relación con el ejercicio, los resultados obtenidos en pacientes McArdle han revelado una tasa de recuperación de ADP después del mismo hasta un 60 % inferior a la que presentan los individuos sanos, lo que sugiere una disfunción mitocondrial en estos pacientes, ya que durante este periodo la síntesis de ATP a partir de ADP es predominantemente oxidativa. Similares resultados han sido previamente documentados en pacientes con enfermedades que afectan al funcionamiento mitocondrial y a la cadena respiratoria, lo que indicaría, efectivamente, un déficit en la función mitocondrial de los pacientes McArdle. Pero no sólo esta función parece verse alterada en esos pacientes, ciertos estudios han revelado también una reducción del contenido mitocondrial de los mismos si lo comparamos con el que presentan individuos sanos.^[343-351] Así mismo, otros estudios han revelado niveles más elevados de la proteína transportadora de monocarboxilato (MCT1) en estos pacientes que los que presentan individuos controles. Este incremento de la proteína MCT1 está íntimamente relacionado con una mayor captación de lactato, que ayudaría a los enfermos McArdle al incrementar la disponibilidad de piruvato para su entrada en el TCA vía oxidativa, dado que es oxidado más rápidamente durante el ejercicio que otros hidratos de carbono utilizados en individuos sanos, tales como la glucosa o la fructosa. En este sentido, el estudio de estos pacientes ha demostrado también un incremento de los niveles de creatina quinasa mitocondrial (mt-CK) que potenciaría el flujo creatina-fosfocreatina, funcionando de forma similar al mecanismo compensatorio observado en pacientes de patologías mitocondriales, en los que este flujo de energía es potenciado para hacer frente al déficit energético aeróbico.^[352-356] En conjunto, estos hallazgos han servido para constatar que gran parte de la sintomatología muscular y general que describen los pacientes McArdle puede estar relacionada con estas carencias mitocondriales, así dolores musculares, mareos y problemas gastrointestinales de los que han informado estos pacientes tras realizar ejercicios de baja intensidad, también son comunes en individuos sanos tras ejercicios de alta intensidad. Como mecanismo compensatorio para su limitada capacidad oxidativa presentarían no sólo niveles elevados de transportadores de metabolitos tales como MCT1, sino también de mt-CK, que ayudarían a

mantener las concentraciones de fosfocreatina y a nivel local, la disponibilidad de ATP en condiciones de carencia energética, por lo que estos síntomas y sus limitaciones en la capacidad aeróbica pueden ser minimizados con ejercicios o entrenamientos terapéuticos aeróbicos que fomenten la biosíntesis de mitocondrias, prueba de ello es que los pacientes McArdle con mayor contenido de mitocondrias y que por tanto presentan una vida más activa, han respondido mejor a las pruebas físicas a las que han sido sometidos que los que eran más sedentarios.^[343-356]

Por último, la caracterización del modelo murino también ha revelado importantes características de los ratones McA en relación con el ejercicio. Los estudios realizados revelan que estos ratones no presentan una reducción de los niveles de glucógeno acumulado tras someterles a la prueba de “*treadmill*”, mientras que los ratones WT por el contrario, metabolizan el glucógeno casi hasta el consumo total del mismo.^[357] Este mismo estudio revela que en el músculo TA, los ratones McA presentan después del ejercicio un incremento de los niveles de las enzimas GSK3 y HK2, así como un descenso de los de las enzimas Akt y calcio calmodulina quinasa 2 (CaMKII), mientras que en los ratones WT sólo se ha observado un incremento de los niveles de la enzima GSK3 y del receptor de insulina (IR). De igual forma, en el músculo EDL de los ratones McA las enzimas GSK3 y Akt presentan niveles incrementados mientras que los de CAMKII se encuentran disminuidos tras el ejercicio, alteraciones que en el músculo EDL de ratones WT no se han observado. Continuando con el estudio del músculo EDL, también se ha observado en ambos genotipos una inhibición total de la actividad de la enzima GS así como un incremento de los niveles de la enzima HK2. Por otra parte, en el músculo *soleus* de los ratones de ambos genotipos se ha observado un incremento de los niveles de HK2 y una disminución significativa de los niveles de la enzima GS. Todos estos resultados sugieren una adaptación diferencial a la activación y expresión de proteínas implicadas en el metabolismo de la glucosa/glucógeno, en respuesta a situaciones de crisis energética en las que los músculos glucolíticos (TA y EDL), y no así los oxidativos (*soleus*), parecen estar utilizando glucosa muscular extra como fuente de energía.^[357]

Por lo anteriormente expuesto y aun siendo conscientes de las diferencias observadas entre el modelo murino y los pacientes con la enfermedad de McArdle, podemos afirmar que este modelo es, sin duda, una importante fuente de información para futuros estudios fisiopatológicos en profundidad de la enfermedad de McArdle, así como una oportunidad para evaluar posibles opciones terapéuticas.^[310-312]

1.9.6 Tratamientos

Hasta el momento no se ha encontrado ninguna terapia eficaz para curar la enfermedad de McArdle, si bien es cierto que se han probado distintas estrategias terapéuticas, tanto en humanos como en modelos animales, que han resultado ser poco efectivas y entre las que destacan:

-Suplementos nutricionales: tales como aminoácidos ramificados^[358], ribosa en altas dosis vía oral^[359], vitamina B^[360], glucagón^[361], dantroleno de sodio^[362] o verapamil^[363] no han presentado efectos beneficiosos significativos en los pacientes de McArdle a los que se les suministro. Sin embargo, en otros estudios en los que se suministró un suplemento de creatina los resultados son algo más controvertidos. Cuando se les administraba este suplemento a los pacientes de McArdle a dosis bajas, 60 mg/kg/día, durante cuatro semanas las molestias musculares tras el ejercicio asociadas a la enfermedad se reducían en cinco de los nueve pacientes sometidos al estudio,^[364] pero a dosis más elevadas, 150 mg/kg/día,^[365] se exacerbaba la mialgia post-ejercicio en estos pacientes sin explicación evidente.^[311]

-Terapia génica: ha sido probada en el modelo ovino de McArdle y consistió en la aplicación intramuscular tanto de un virus adenoasociado serotipo 2 como de un adeno virus tipo 5, que contenían casetes de expresión de la glucógeno fosforilasa muscular. Con este método se consiguió la expresión de la GP-M a nivel local pero durante un corto periodo de tiempo, debido posiblemente a la actuación del sistema inmune.^[311, 366] Así mismo, recientemente se ha utilizado un modelo de ratón con la mutación *p.R50X* del gen *PYGM* para probar la eficacia del virus recombinante adenoasociado serotipo 8 (r-AAV8) en la administración de una copia funcional de dicho gen. Los resultados de este estudio han revelado que se produce la expresión del gen *PYGM* en ratones McA de 8 semanas de edad, así como una mejora de la arquitectura del músculo esquelético, un descenso de la acumulación de glucógeno y la restauración de la capacidad de estos ratones para correr voluntariamente en la rueda, hasta niveles observados en ratones WT.^[367]

-Terapias de restauración de la pauta de lectura (“readthrough”): están basadas en la capacidad que tienen ciertos compuestos para promover la sobrelectura de codones prematuros de terminación (PTCs) causados por mutaciones *nonsense*. Determinados compuestos de bajo peso molecular tales como los antibióticos aminoglucósidos (Gentamicina, geniticina, paromomicina, neomicina, etc...), el PTC 124 (Atalauren), el RTC-13 y el RTC-14, así como el amlexanox entre otros, han demostrado su eficiencia tanto *in vitro* como *in vivo* en la inducción de *readthrough* en PTC asociados a distintas patologías, tales como la fibrosis

quística y la distrofia muscular de Duchenne.^[311, 368-371] En esta última patología, tanto los antibióticos aminoglucósidos como el Ataluren y el RTC 13 han sido evaluados en el modelo de ratón *mdx*, habiéndose conseguido restaurar una producción parcial de distrofina, si bien en la enfermedad de McArdle, donde se ha testado la gentamicina como posible tratamiento *readthrough*, los resultados no han sido tan esperanzadores.^[310, 311]

A este tratamiento fueron sometidos cuatro pacientes con la enfermedad de McArdle, de diferentes edades y que compartían la mutación *p.R50X* en el gen *PYGM*, administrándoles sulfato de gentamicina IV (Merckle GmbH, Blaubeuren, Germany) durante diez días consecutivos. Los resultados mostraron una reducción de los niveles de creatina quinasa (CK) en sangre, no siendo ésta significativa en comparación con los niveles existentes antes del tratamiento (**Tabla 5**). Así mismo, se evaluó la actividad de la enzima GP-M mediante la detección de la utilización de fosfatos de alta energía durante la realización de ejercicios de baja intensidad, y los resultados obtenidos en todas las variables objeto de análisis no mostraron diferencias significativas con respecto a los valores previos al tratamiento (**Tabla 5**).

	Pre-treatment, mean \pm SD	Treatment-induced difference, mean \pm SD	p Value
PCr/ATP at initial rest	4.6 \pm 0.4	0.0 \pm 0.7	0.93
pH elevation			
During aerobic exercise	0.13 \pm 0.04	-0.03 \pm 0.06	0.39
During ischemic exercise	0.09 \pm 0.04	-0.01 \pm 0.06	0.73
PCr consumption (%PCr at rest)			
During aerobic exercise	-28.5 \pm 21.5	-1.3 \pm 8.3	0.77
During ischemic exercise	-39.3 \pm 18.5	-6.2 \pm 19.6	0.57
ATP decrease (%PCr at rest)			
During aerobic exercise	-1.2 \pm 1.5	3.0 \pm 5.9	0.38
During ischemic exercise	-3.7 \pm 4.0	-2.2 \pm 5.6	0.48
Tau after aerobic exercise(s)	36.8 \pm 11.1	16.5 \pm 43.1	0.50
Tau after ischemic exercise(s)	49.3 \pm 10.9	17.8 \pm 32.3	0.35
MVC (Newton)	820 \pm 259	13 \pm 87.1	0.79

PCr = phosphocreatine; ATP = adenosine triphosphate; s = seconds; MVC = maximum voluntary contraction

Tabla 5. Resultados obtenidos en el estudio por ³¹P-MRS realizado a cuatro pacientes tratados con gentamicina. Schroers, A. et al. (2006). "Gentamicin treatment in McArdle disease: failure to correct myophosphorylase deficiency".^[372]

Por último, se analizó la eficacia de este tratamiento in vitro, utilizando mioblastos procedentes de la biopsia de un paciente con la enfermedad de McArdle, que fueron cultivados en distintas concentraciones de sulfato de gentamicina IV durante cinco días y por triplicado, y de nuevo la medición de la actividad de la GP-M no mostró diferencias significativas entre los mioblastos cultivados a diferentes concentraciones.^[372, 373] Si bien es cierto que el estudio de Birch *et al.* en modelos celulares que expresaban dos de las mutaciones más comunes de la enfermedad de McArdle, la ya descrita en esta tesis *p.R50X* y la *G205S*, describía cierto éxito en la inducción de *readthrough* utilizando el compuesto G418. En este estudio se utilizó el plásmido de ratón que contenía el cDNA del gen *Pygm* (NCBI

Accession BC012961) obtenido de I.M.A.G.E. consortium (I.M.A.G.E. ID 3989941),^[374, 375] en el que se introdujeron las mutaciones anteriormente mencionadas y cuyos constructos se insertaron en células CHO-K1 (**Fig. 30**). Así mismo, los constructos resultantes poseían en su región C-terminal una fusión con el gen que codifica para la proteína GFP. De esta forma se realizaron un total de seis constructos cuyas proteínas recombinantes presentaban lo siguientes tamaños esperados, a) GFP-PYGM y GFP-G205S: GFP + 20aa *linker* + PYGM = 127 kDa, b) GFP únicamente: GFP + 36aa *linker* hasta el primer codón *stop* de pCIneo = 31 kDa, c) GFP-R50X: GFP + 20aa *linker* + 6 kDa (49aa) = 35 kDa y d) R50R-GFP: 50aa de PYGM + 8aa *linker* + GFP + 36aa *linker* hasta el primer codón *stop* de pCIneo = 37.5 kDa (**Fig. 30**).^[376]

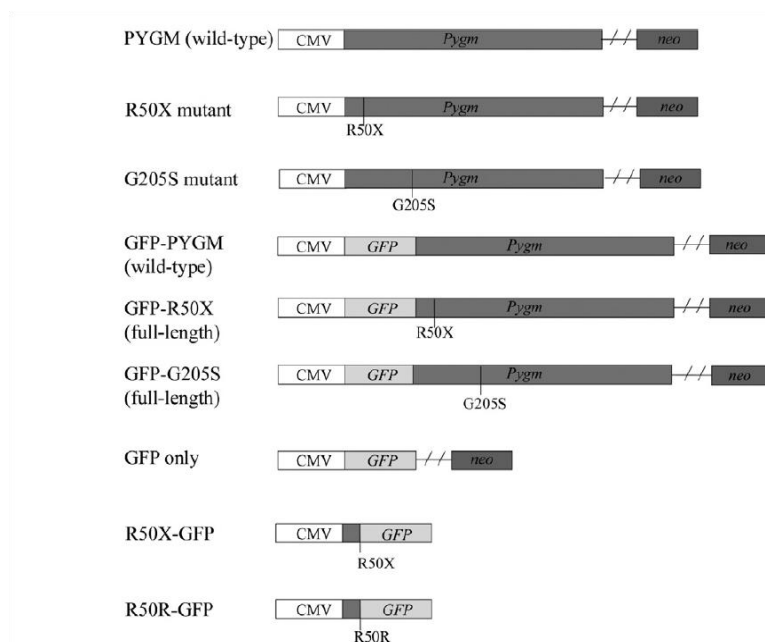


Figura 30. Los constructos que codifican para las formas *wild type* y mutante del gen *Pygm* y la proteína GFP utilizados para el estudio de expresión de la proteína del gen *Pygm*. Birch, K.E., R.M. Quinlivan, and G.E. Morris. (2013). "Cell models for McArdle disease and aminoglycoside-induced read-through of a premature termination codon".^[376]

Los resultados del estudio realizado en este modelo celular muestran niveles de expresión similares de mRNA del gen *Pygm* en las células que llevaban la mutación *p.R50X* y en las células *wild type* para este gen con el compuesto G418 (**Fig. 31**).^[376]

Más recientemente, en un estudio realizado por Tarrasó *et al.* se utilizaron tres modelos celulares para evaluar la eficacia de distintos compuestos *readthrough*, amlexanox, Ataluren, RTC13 y G418, en la enfermedad de McArdle.^[377]

El primer modelo celular consistía en células HeLa transfectadas con dos constructos distintos de GFP-PYGM (GFP-PYGM *p.R50X* y PYGM Ex1-GFP *p.R50X*) que presentaban la mutación *p.R50X* del gen *Pygm*. Para el segundo modelo se crearon líneas celulares HEK239T que expresaban el constructo PYGM Ex1-GFP *p.R50X*.

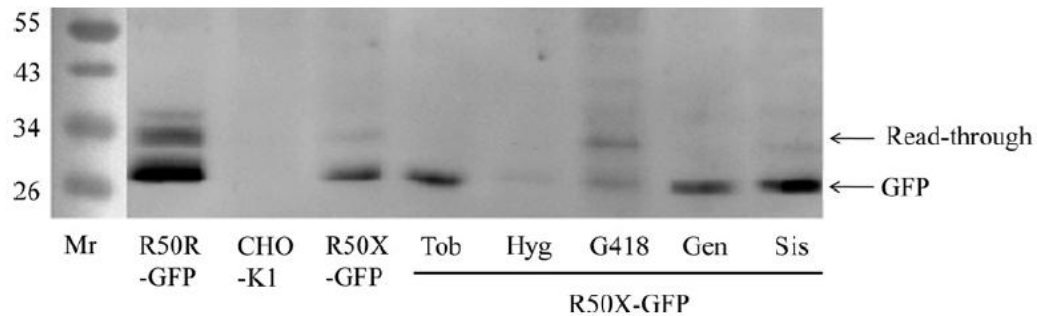


Figura 31. *Readthrough* inducido por el compuesto aminoglucósido G418 en el constructo con la mutación del gen *Pygm*, *p.R50X*. Las células CHO-K1 fueron transfectadas transitoriamente con el constructo del plásmido R50X-GFP y tratadas con tobramicina (Tob), higromicina B (Hyg), G418, gentamicina C (Gen) y sisomicina (Sis). CHO-K1 indica células CHO-K1 sin transfectar; R50X-GFP y R50R-GFP indican células que no fueron tratadas con compuestos aminoglucósidos. El WB se realizó utilizando el anticuerpo anti-GFP. La producción de una banda de 4 kDa más allá de la banda de GFP indica la obtención del *readthrough* del codón *stop* de R50X tras la incubación con G418. Esta banda no se observó con ningún otro tratamiento con aminoglucósidos. Birch, K.E., R.M. Quinlivan, and G.E. Morris. (2013).^[376]

Finalmente, en el último de los modelos utilizados se obtuvieron cultivos celulares de músculo esquelético del modelo murino *knock-in* para la mutación p.R50X del gen *Pygm*. Los resultados obtenidos en los tres modelos celulares analizados mostraron que ninguno de los compuestos evaluados (amlexanox, Atalauren, RTC13 y G418) era capaz de inducir *readthrough* y por tanto, de la producción de *Pygm* en estos cultivos celulares.^[377]

2. Objectivos

La carencia energética que presentan los pacientes con la enfermedad de McArdle, debida al déficit de la enzima GP-M, es una ventana abierta al estudio del metabolismo de los carbohidratos durante el ejercicio. En este sentido, el desarrollo del modelo murino para esta enfermedad y su caracterización inicial, han permitido conocer más detalladamente el comportamiento de varios músculos ante la incapacidad de degradar glucógeno así como algunas de sus características histológicas. Continuando en esta línea, teniendo en cuenta los antecedentes expuestos en la introducción y utilizando este modelo animal, en este trabajo nos propusimos:

- 1)** Estudiar el comportamiento de la colonia de ratones McA y las posibles diferencias que presenta respecto de los WT a nivel anatómico y bioquímico, así como la evolución de las mismas con la edad.
- 2)** Analizar y cuantificar desde una perspectiva longitudinal, el daño estructural en el músculo esquelético de los ratones McA así como en los distintos tipos de fibras que lo componen, evaluando los efectos de la fibrosis muscular, el grado de afectación asociado a los sucesivos procesos de degeneración/regeneración y la posible adquisición de mecanismos alternativos de obtención de energía, según avanza la enfermedad, para tener así una visión más completa de las adaptaciones estructurales y metabólicas que pueden presentar con la evolución de la misma.
- 3)** Evaluar y cuantificar la acumulación de glucógeno en el tejido muscular y en el hígado de ratones McA, según avanza la enfermedad, así como analizar las posibles vías alternativas para su degradación.
- 4)** Analizar el papel del hígado y el tejido adiposo en los ratones McA, como posibles mecanismos compensatorios ante la incapacidad del músculo de obtener glucosa mediante la degradación endógena de glucógeno, a través del estudio de las rutas metabólicas relacionadas directa o indirectamente con el glucógeno hepático y de la capacidad del tejido adiposo de degradar y de exportar lípidos al torrente sanguíneo para paliar las necesidades energéticas del músculo esquelético.

3. Materiales y Métodos

3.1 Aprobación ética

Todos los procedimientos experimentales descritos en este trabajo fueron aprobados por el *Vall d'Hebron Institutional Review Board* (número de protocolo 13/04 CEEA; 35/04/08) y fueron realizados de conformidad con el Convenio Europeo sobre la protección de los animales vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos (ETS nº 123) y con la legislación española, Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, y R.D. 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo docencia.

3.2 Ratones

En este estudio se han utilizado ratones *McArdle knock-in* para la mutación *p.R50X* (*p.R50X/p.R50X*) en el gen *Pygm*, cruzados durante diez generaciones con ratones de la cepa *C57Bl/6 J*.^[312, 378] Para analizar la progresión de la enfermedad se utilizaron tres cohortes de ratones de 8, 35 y 70 semanas de edad con una N máxima = 36, tanto para los ratones WT como para los ratones McA. Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical justamente antes de proceder a la extracción de los músculos utilizados (*soleus*, GAST, EDL, TA y QUAD) así como del hígado, corazón y tejido adiposo.

3.3 Genotipaje del modelo murino de la enfermedad de McArdle

El genotipaje de los ratones destetados de la colonia se realizó entre el 01/01/2013 y el 05/08/2018 (N=2088), genotipándose así mismo 38 embriones y siguiendo en ambos casos el protocolo previamente descrito.^[312]

3.4 Curva de supervivencia

La curva de supervivencia se calculó con los datos de todos los ratones destetados genotipados de la colonia que nacieron entre el 01/01/2013 y el 05/08/2018 (N=2088). Se utilizó la función de supervivencia de *Kaplan-Meier*, también conocida como el Estimador del Producto-Límite.^[379] Para cada ratón se introdujeron los siguientes valores (*GraphPad Prism version 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, www.graphpad.com*): 1) Valores de las X: tiempo (número de días vivo hasta que ocurre una muerte accidental/no programada

(evento)); 2) Valores de las Y: “1” hasta que se produce un evento a un tiempo determinado y “0” a partir de ese mismo momento, cuando los datos del ratón eutanasiado se censuran.

3.5 Mediciones anatómicas y bioquímicas de los ratones McA

Las mediciones del tamaño y grosor de los distintos órganos y tejidos extraídos de los ratones WT y McA de 20 y 70 semanas de edad, se realizaron mediante un “pie de rey”, y para su pesaje se utilizó una balanza de precisión *Adventure Pro* (OHAUS, Parsippany, NJ, USA). Para los análisis bioquímicos se extrajeron un mínimo de 100 µl de sangre por ratón, mediante tubos *Microvette* con ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) (Sarstedt, Numbrecht, Alemania), que fueron posteriormente diluidos en 200 µl de tampón fosfato salino 1x (PBS) y centrifugados a 3500 g durante 5 minutos a 4 °C para la extracción del plasma sanguíneo. Las muestras fueron analizadas en la unidad de Bioquímica Clínica del Hospital Vall d’Hebron.

Así mismo, para el análisis de la glucosa en sangre se utilizó un glucómetro *Accu-Chek Aviva* (Roche, Basilea, Suiza) y las tiras reactivas *Accu-Chek Aviva* (Roche, Suiza).

Cabe reseñar que el estudio anatómico y bioquímico de los ratones McA de 20 semanas de edad se realizó al final, dando prioridad al análisis de los de 70 semanas de edad debido a las diferencias claras de tamaño y peso observadas en estos últimos. Por este motivo y debido a la dificultad en la obtención de nuevos ratones McA fue imposible completar el estudio con un número mayor de ratones McA de 20 semanas de edad.

3.6 Tinción de Hematoxilina/Eosina en tejido muscular

La tinción se realizó en muestras de músculos *soleus*, EDL, GAST, QUAD y TA de ratones WT, HTZ y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad, que inmediatamente después de su extracción fueron congeladas en metilbutano y posteriormente en nitrógeno líquido. Las muestras fueron cortadas en segmentos de 12 µm mediante un criostato a una temperatura de conservación de -22°C, y adheridas posteriormente a portaobjetos (*polysine slides* 25 x 75 x 1 mm, Thermo Scientific, USA). Seguidamente los portaobjetos fueron introducidos en una solución de hematoxilina (*Mayer’s hemalum solution*, MILLIPORE, Billerica, MA, USA) durante 5 minutos en agitación, y se aclararon con agua; a continuación se realizó primero un viraje con alcohol clorhídrico al 1 % y posteriormente con agua amoniacal al 2,5 %, tras los cuales las muestras fueron nuevamente aclaradas con agua.

A continuación los portaobjetos se introdujeron en una solución de eosina filtrada (*Eosin Yellowish*, MERCK, Whitehouse Station, NJ, USA) durante 2 minutos en agitación, y de nuevo fueron aclarados con agua. Tras el aclarado se realizó una deshidratación de las muestras

mediante etanol al 96 % y etanol absoluto (EtOH), y se sumergieron en xilol durante 3 minutos. Finalmente se añadió el medio de inclusión DPX (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) y se cubrieron con el cubreobjetos (24 x 60 mm) (Thermo Scientific, USA).

3.7 Tinción PAS en tejido muscular

La tinción PAS permite teñir componentes celulares que contienen hidratos de carbono tales como polisacáridos (glucógeno), glucoproteínas y glucolípidos. En este caso la tinción se realizó en muestras de los músculos *soleus*, EDL, GAST, QUAD y TA de ratones WT, HTZ y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad; las muestras fueron cortadas y adheridas del mismo modo que se ha descrito en el **apartado 3.6**. Seguidamente los portaobjetos fueron introducidos en una solución de ácido periódico al 0,5 % durante 5 minutos, se aclararon con agua y a continuación fueron incubadas en la solución de Schiff (*Schiff Reagent Solution*, Thermo Fisher Scientific, USA) durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo las muestras nuevamente se aclararon con agua y se realizó su deshidratación mediante etanol al 96 % y etanol absoluto (EtOH), para posteriormente sumergirlas en xilol durante 3 minutos. Finalmente se añadió el medio de inclusión DPX (Sigma-Aldrich, USA) y se cubrieron las muestras con el cubreobjetos (24 x 60 mm) (Thermo Scientific, USA).

3.8 Inmunofluorescencia de tejido muscular

Para llevar a cabo esta técnica se utilizaron muestras de los músculos y grupos de edad descritos en los **apartados 3.6 y 3.7**, siendo sometidas a los mismos procesos de corte y adhesión descritos en estos apartados. Posteriormente las muestras así obtenidas se aislaron con un lápiz hidrofóbico *PAP pen* (Abcam, Cambridge, UK), se rehidrataron durante 5 minutos en PBS 1x y se fijaron mediante formalina durante 5 minutos. A continuación se realizaron 3 lavados en PBS 1x de 5 minutos cada uno y posteriormente, las muestras se bloquearon con una solución que contenía PBS1x con suero bovino fetal al 3 % (FCS), durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, se procedió a incubar con los anticuerpos primarios correspondientes (**Tabla 6**) durante toda la noche a 4 °C. Tras esta incubación se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (**Tabla 6**) durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de esta incubación, se realizaron de nuevo 3 lavados de 5 minutos. Finalmente, se realizó una tinción durante 2 minutos con el reactivo *DAPI nucleic acid stain* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) específico para teñir los núcleos celulares, y posteriormente se realizaron de nuevo 3 lavados de 5 minutos cada uno antes de cubrir las muestras con laminillas cubreobjetos (24 x 60 mm)

(Thermo Scientific, USA) y *Gold antifade reagent* (Molecular probes, Eugene, OR, USA). Las imágenes se capturaron mediante microscopio de fluorescencia *FSX 100* y el programa *FSX-BSW* (Olympus, Tokyo, Japón). En todo momento los portaobjetos se mantuvieron en cámara húmeda opaca (Simport, Saint-Mathieu-de-Beloil, QC, Canadá) para evitar la deshidratación de las muestras así como protegerlas de la luz.

Anticuerpo (Ac)	ref/Casa comercial	Ac. Primario	Ac. Secundario
COL IV	(ab6586/Abcam)	1/200 con PBS 1x + 3% FCS	AlexaFluor Conejo Ig H+L (488 nm) 1/500 con PBS 1x + 3% FCS
Fibronectina	(ab2413/Abcam)	1/300 con PBS 1x + 3% FCS	AlexaFluor Conejo Ig H+L (488 nm) 1/500 con PBS 1x + 3% FCS
GLUT4	(NBP1-49533/ Novus Biologicals)	1/200 con PBS 1x + 3% FCS	AlexaFluor Conejo Ig H+L (488 nm o 594 nm) 1/500 con PBS 1x + 3% FCS
Laminina	(MA1-06100/Thermo-Scientific)	1/300 con PBS 1x + 3% FCS	AlexaFluor Rata Ig H+L (594 nm) 1/500 con PBS 1x + 3% FCS
MHC I	(BA-D5/DSHB)	1/20 con PBS 1x + 3% FCS	AlexaFluor Ratón Ig γ 2b (488 nm) 1/500 con PBS 1x + 3% FCS
MHC IIA	(SC-71/DSHB)	1/20 con PBS 1x + 3% FCS	AlexaFluor Ratón Ig γ 1 (594 nm) 1/500 con PBS 1x + 3% FCS
MHC IIX	(SAB2104768/Sigma-Aldrich)	1/100 con PBS 1x + 3% FCS	AlexaFluor Conejo Ig H+L (488 nm) 1/500 con PBS 1x + 3% FCS
MHC IIB	(BF-F3/DSHB)	1/30 con PBS 1x + 3% FCS	AlexaFluor Ratón Ig M (594 nm) 1/500 con PBS 1x + 3% FCS
MHCe	(F1.652/DSHB)	1/200 con PBS 1x + 3% FCS	AlexaFluor Ratón Ig H+L (594 nm) 1/500 con PBS 1x + 3% FCS

Tabla 6. Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencias.

3.8.1 Cuantificación del área fibrótica alrededor de las fibras musculares

Para realizar un análisis cuantitativo de la proporción del área de los distintos músculos que correspondía a tejido fibrótico se utilizaron muestras de *soleus*, EDL y TA de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad, que fueron incubadas mediante inmunofluorescencia con los anticuerpos de Laminina, FBN y COL IV, en las condiciones reflejadas en el **apartado 3.8** y **tabla 6**. Se evaluaron un mínimo de 3 ratones por genotipo (3 WT y 3 McA) y grupo de edad.

Seguidamente, mediante el programa *Image J, versión 1.37* (NIH, Roth Bethesda, MO, USA) ^[380-382], se seleccionaron secciones de cada músculo con un tamaño promedio de 18.745.329,22 μm^2 (**Fig. 32**). Para el cálculo del área marcada por cada anticuerpo se utilizó el *plugin Analyze Particles*, que además proporciona el porcentaje que dicha área supone respecto del área total de la sección seleccionada (**Fig. 32**). La proporción del área marcada por un anticuerpo para cada genotipo y grupo de edad se calculó como el promedio de los porcentajes obtenidos para las distintas secciones pertenecientes a los individuos de ese genotipo y grupo de edad, que es el dato que aparece en las gráficas de resultados. Para el cálculo de la proporción del área fibrótica total de los tres anticuerpos en una sección, se sumaron por un lado las áreas marcadas para cada uno de ellos y por otro las áreas totales y se calculó el porcentaje que el área de los tres marcadores suponía en relación con el área total de dicha sección. De nuevo la proporción del área fibrótica para cada genotipo y grupo de edad se obtuvo como promedio de los porcentajes obtenidos para las distintas secciones pertenecientes a los individuos de ese genotipo y grupo de edad, que es así mismo el dato representado en las gráficas de resultados.

Finalmente se repitió este proceso para cada genotipo y grupo de edad así como para cada músculo estudiado.

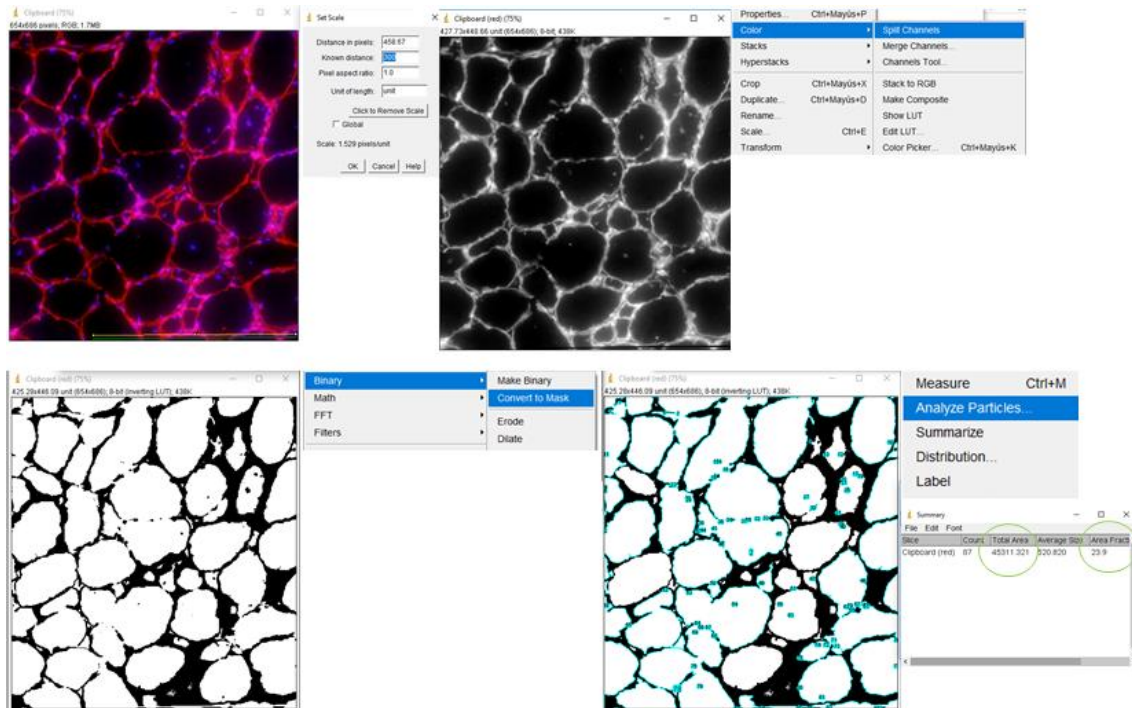


Figura 32. Capturas de pantalla del proceso de cuantificación del área fibrótica. Arriba a la izquierda: selección de la zona de la sección del músculo a cuantificar y su escala (*Analyze=>Set scale*) [en este caso se trata de una tinción para Laminina (en rojo) y su escala es de 300 μm (en amarillo)]. Arriba a la derecha: se eliminan los canales que no vamos a necesitar para la cuantificación (*Color=>Split channels*) (verde y azul) quedándonos con el que hemos utilizado para captar la imagen con Laminina (rojo). Abajo a la izquierda: se convierte la imagen del canal seleccionado en binaria (*Binary=>Convert to Mask*) (blanco: interior de las fibras musculares; negro: contorno de las fibras musculares teñido por Laminina). Abajo a la derecha: se procede a cuantificar el área que rodea a las fibras musculares (*Analyze particles*) y que se corresponde con el área que ocupa la tinción de Laminina. Círculos verdes: tomamos los valores del área total (*Total Area*) cuantificada de la Laminina y el porcentaje que ésta representa con respecto al total del área de la sección seleccionada (*Area Fraction*).^[380-382]

3.8.2 Cuantificación de núcleos centrales de las fibras musculares

Una vez realizada la inmunofluorescencia de las muestras de los músculos *soleus*, EDL, QUAD, TA y GAST de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad, con el anticuerpo de la proteína LAM y el reactivo Dapi (véase apartado 3.8), se procedió a contar los núcleos centrales en las fibras de dichos músculos (Fig. 33 A). Se contaron entre 58 (mínimo) y 1.509 (máximo) fibras (media de 407), de al menos tres ratones distintos por cada genotipo y grupo de edad.

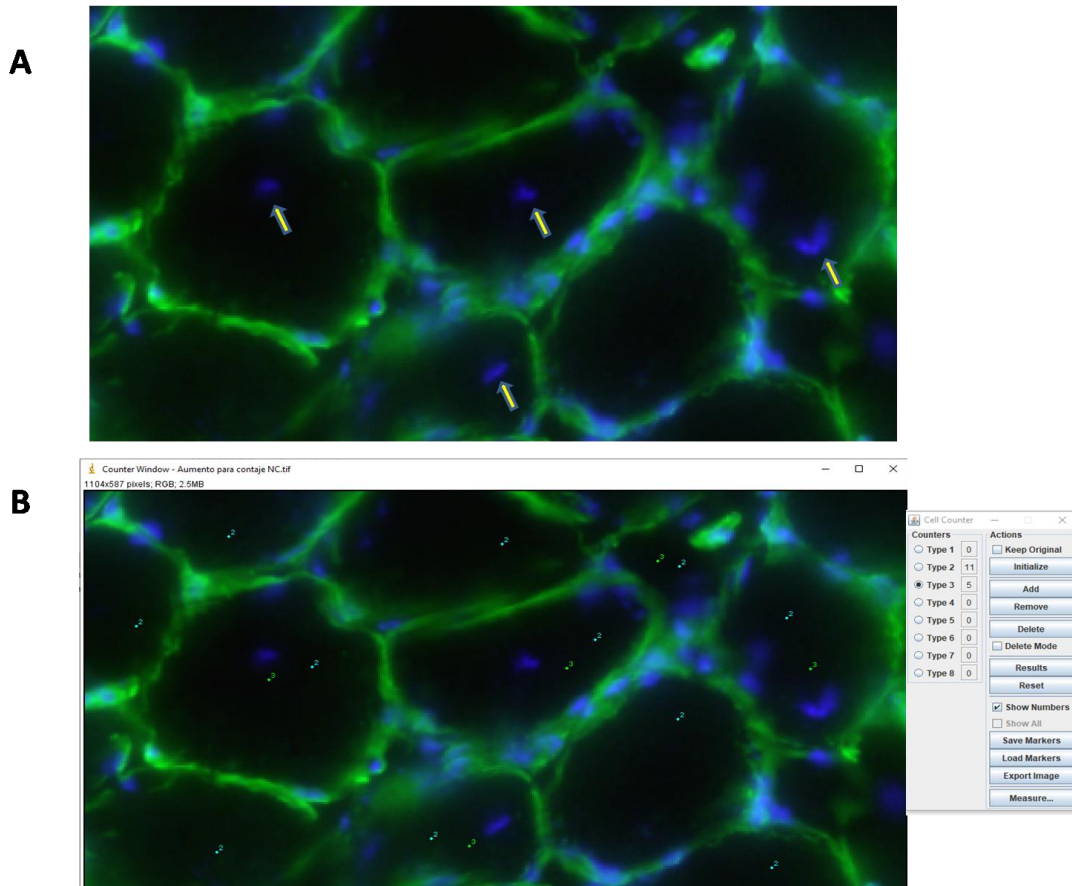


Figura 33. Imagen representativa de una inmunofluorescencia con los anticuerpos específicos para la proteína LAM (verde) y el marcador específico para la tinción de núcleos Dapi (azul). A) Las flechas amarillas señalan núcleos centrales que se han considerado para la cuantificación de CNF. B) Imagen utilizada para la cuantificación de NC de las fibras musculares de los distintos músculos mediante el *plugin* de *ImageJ Cell Counter*. A la derecha de la imagen se muestra el contador que aparece una vez se inicia dicho *plugin*, en este caso se han utilizado el contador tipo 2 (*Counters=>Type 2*) para identificar las fibras que aparecen en la imagen y el contador tipo 3 (*Counters=>Type 3*) para identificar cuáles de estas fibras presentan NC. De esta forma, el porcentaje de fibras que presentarían NC resultaría del cociente entre fibras con NC y fibras totales expresado en porcentaje (5/11=> 45,45 % en este ejemplo).^[380-382]

Mediante el programa *Image J*, versión 1.37 y el *plugin Cell Counter* (NIH, USA)^[380-382] (Fig. 33 B), se delimitaron tanto las fibras musculares como los núcleos centrales en ellas, realizándose el conteo de las fibras musculares que presentaban núcleos centrales así como el número total de fibras musculares. La proporción de núcleos centrales de las fibras musculares se obtuvo calculando el porcentaje que el número de fibras con núcleos centrales suponía en relación con el número total de fibras contadas (Fig. 33 B), que es el dato que aparece en las gráficas de resultados. Este proceso se repitió para cada genotipo y grupo de edad así como para cada músculo estudiado.

3.8.3 Cuantificación del tamaño promedio de las fibras musculares

Para realizar la cuantificación del tamaño promedio de las fibras musculares se analizaron secciones de músculos *soleus*, EDL, QUAD, TA y GAST de ratones WT y McA, de 8, 35 y 70 semanas de edad. Las diferentes secciones se tiñeron para Laminina y Dapi tal como se ha descrito con anterioridad (**véase apartado 3.8**). Seguidamente, con el programa *Image J*, versión 1.37 y el *plugin minimal Feret's diameter* (NIH, USA)^[380-382] se calculó el tamaño promedio de las fibras musculares, de tal forma que se seleccionaron las fibras menos influenciadas por el ángulo de corte,^[383] contándose entre 240 y 1.444 fibras (media de 459 fibras) de al menos tres ratones diferentes por genotipo y grupo de edad. Este proceso se repitió para cada genotipo y grupo de edad así como para cada músculo estudiado.

3.8.4 Cuantificación del tamaño promedio para cada tipo de fibra muscular

Para realizar la cuantificación del tamaño promedio de las fibras musculares específicas se analizaron secciones de músculo *soleus* de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad que se incubaron para MHC I, MHC IIa, MHC IIx y el reactivo Dapi (**véase apartado 3.8**). Seguidamente, con el programa *Image J*, versión 1.37 y el *plugin minimal Feret's diameter* (NIH, USA)^[380-382] se calculó el tamaño promedio de las fibras musculares, de tal forma que se seleccionaron las fibras menos influenciadas por el ángulo de corte (**Fig. 34**).^[383] Para este cálculo se contaron entre 35 y 61 fibras tipo I, entre 132 y 157 fibras tipo IIa y entre 56 y 80 fibras tipo IIx, de al menos tres ratones diferentes por genotipo y grupo de edad.

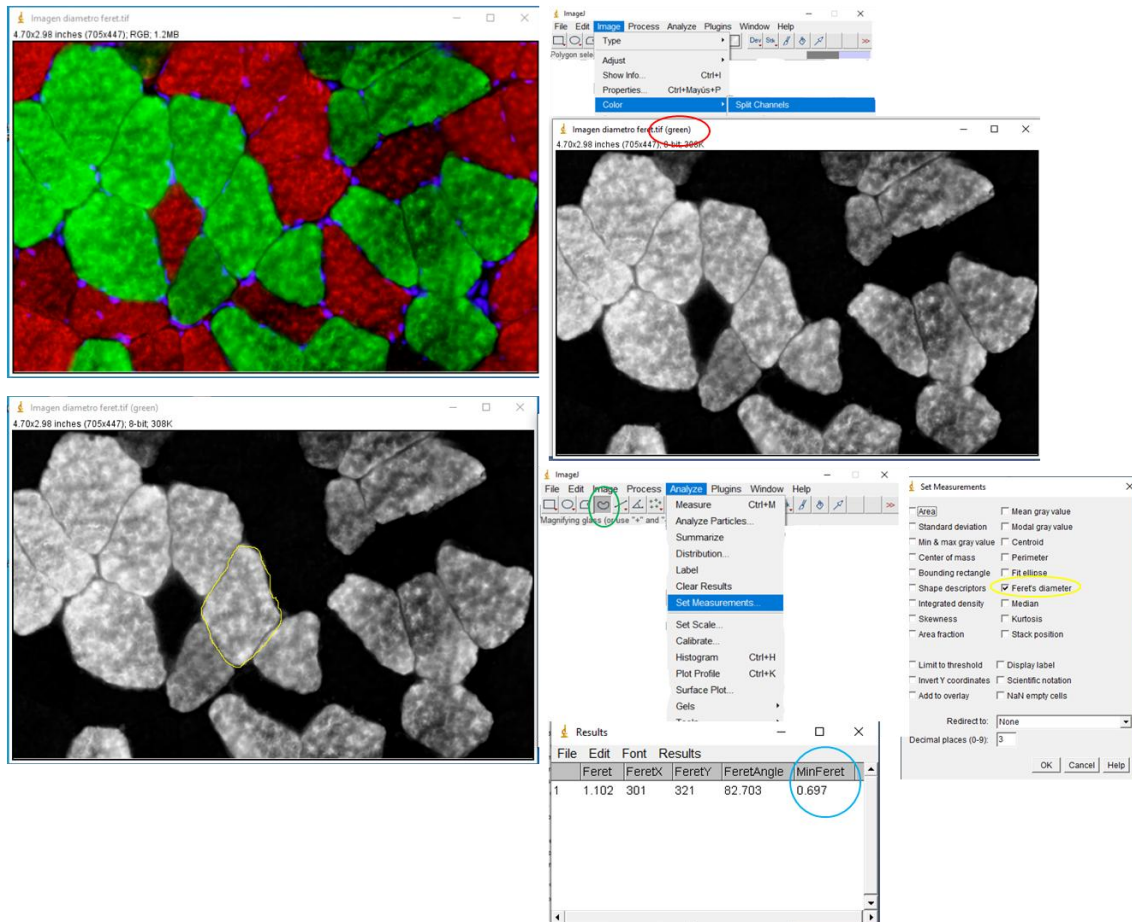


Figura 34. Imagen representativa del procedimiento utilizado para calcular el tamaño promedio de los distintos tipos de fibras musculares. En este caso se trata de una muestra del músculo *soleus* de un ratón McA de 8 semanas de edad, en la que se ha realizado una inmunofluorescencia con los anticuerpos específicos para el tipo de fibra I (verde) y el tipo de fibra IIa (rojo) así como la tinción de los núcleos mediante Dapi (azul). Inicialmente se procede a seleccionar sólo las fibras de interés, en este caso las tipo I, mediante la separación de los distintos canales de la imagen (*Color=>Split channels*). Como para este ejemplo se realiza la medición en las fibras tipo I seleccionamos el canal verde (*green*, rodeado en rojo en la imagen superior derecha). Una vez tenemos separadas las fibras tipo I, mediante la herramienta *freehand selections* (rodeada en verde en la imagen inferior derecha) seleccionamos individualmente la fibra concreta que queremos medir (fibra rodeada en amarillo en la imagen inferior izquierda). Seguidamente se selecciona en el menú *Analyze* las mediciones que nos dará el programa de la fibra seleccionada *Set measurements*, eligiendo la opción *Feret diameter* (rodeada en amarillo en la imagen inferior derecha). Finalmente el programa muestra una hoja de resultados (*Results*) en la que el valor de interés es *MinFeret* (rodeado en azul en la imagen inferior central). Este procedimiento se realizó con cada fibra individualmente y se expresó el resultado final como el promedio de todas las mediciones obtenidas.^[380-382]

3.8.5 Cuantificación de núcleos centrales de las fibras musculares específicas

Con el fin de obtener la proporción de CNF para cada tipo de fibra (Fig. 35), se incubaron las secciones de *soleus*, EDL y TA de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad, con anticuerpos específicos para cada una de ellas (MHC I, MHC IIa, MHC IIx y MHC IIb; ver apartado 3.8) y el reactivo Dapi, siguiendo estas combinaciones:

- Fibras tipo I y IIa/Dapi.
- Fibras tipo IIa y IIx/Dapi.
- Fibras tipo IIx y IIb/Dapi.

Posteriormente, mediante el *software Image J, versión 1.37* y el *plugin Cell Counter* (NIH, USA) [380-382] se delimitaron las fibras musculares y los núcleos centrales presentes en ellas y se realizó el conteo de las fibras musculares de los distintos tipos que presentaban núcleos centrales así como del número total de fibras de cada tipo (**Fig. 35**). Las proporciones de las CNF se obtuvieron calculando el porcentaje que el número de CNF presentes en cada tipo suponía en relación con el número total de fibras contadas de ese tipo. Para el cálculo de la proporción de CNF en las fibras tipo IIa se calculó el promedio de las proporciones de CNF obtenidas en las inmunofluorescencias de fibras tipo I/IIa y IIa/IIx, de esta forma se intentó reducir la posibilidad de conteo doble de los núcleos de las fibras tipo IIa al estar teñidas por duplicado en dos secciones distintas consecutivas. Este mismo procedimiento se siguió con las fibras tipo IIx utilizando para ello las inmunofluorescencias de fibras tipo IIa/IIx y IIx/IIb. Los aquí descritos son los datos representados en las gráficas de resultados. Posteriormente se repitió este proceso para cada genotipo y grupo de edad así como para cada músculo estudiado.

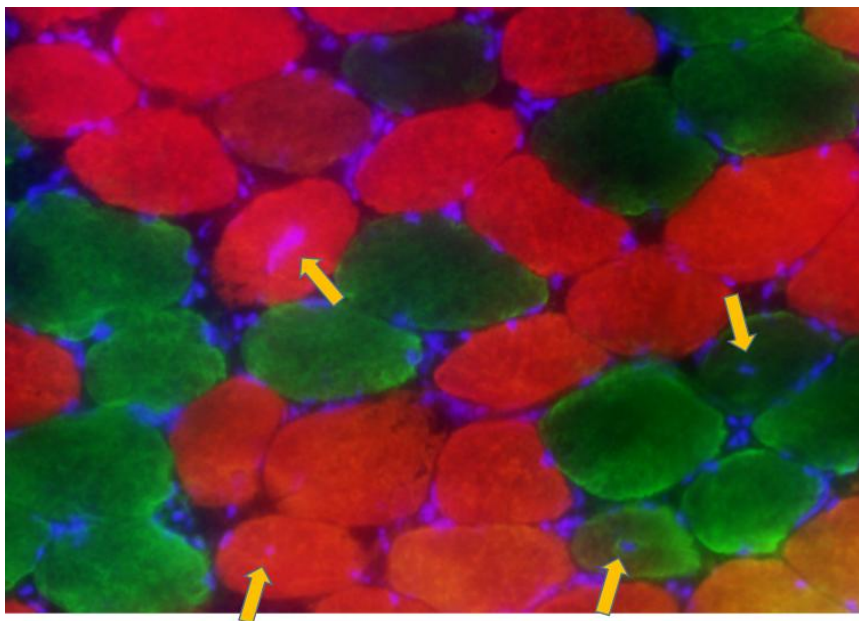


Figura 35. Imagen representativa de una inmunofluorescencia con los anticuerpos específicos para las proteínas MHC I (verde) y MHC IIa (rojo), así como del marcador específico para la tinción de núcleos Dapi (azul). Las flechas amarillas señalan una muestra de la posición de los núcleos que se han considerado para la cuantificación de CNF en los tipos de fibras específicos.

3.8.6 Cuantificación de fibras musculares positivas para MHCe

Para realizar la cuantificación de fibras musculares positivas para el marcador MHCe, se utilizaron secciones de *soleus*, TA y QUAD de ratones WT y McA de 8 y 70 semanas de edad, que se incubaron con los anticuerpos de la proteína COL IV y MHCe (véase apartado 3.8) mediante inmunofluorescencia. Posteriormente, mediante el *software Image J, versión 1.37* y

el *plugin Cell Counter* (NIH, USA) se delimitaron y contaron las fibras positivas para el marcador MHCe así como el número total de fibras.^[380-382] Para el cálculo de la proporción de fibras positivas para el marcador MHCe se calculó el porcentaje que suponía el número de fibras positivas para dicho marcador en relación con el número total de fibras contadas, un mínimo de 619 fibras y un máximo de 2.250 fibras (media de 1.462 fibras), de al menos tres ratones diferentes por genotipo y grupo de edad, que es el dato representado en las gráficas de resultados. Finalmente se repitió este proceso para cada genotipo y grupo de edad así como para cada músculo estudiado.

3.8.7 Cuantificación de la proporción de los distintos tipos de fibras

Para la cuantificación de la proporción de los distintos tipos de fibras musculares se analizaron secciones de *soleus*, EDL y TA de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad. Las inmunofluorescencias con los marcadores específicos para cada tipo de fibra se realizaron con la siguiente distribución:

- Fibras tipo I y IIa.
- Fibras tipo IIa y IIx.
- Fibras tipo IIx y IIb.

El conteo se realizó mediante el *software Image J, versión 1.37* y el *plugin Cell Counter* (NIH, USA)^[380-382]. Las proporciones de cada uno de los tipos específicos de fibras I, IIb y mixtas tipo I/IIa, IIa/IIx y IIx/IIb se obtuvieron calculando el porcentaje que suponía el número de fibras de cada uno de esos tipos en relación con el número total de fibras contadas. Para el cálculo de la proporción de las fibras tipo IIa se calculó el promedio de las proporciones obtenidas para ellas en las inmunofluorescencias de las fibras tipo I/IIa y IIa/IIx, de esta forma se intentó reducir la posibilidad del conteo doble de las fibras tipo IIa al estar teñidas por duplicado en dos secciones distintas consecutivas. Este mismo proceso se siguió con las fibras tipo IIx utilizando para ello las inmunofluorescencias de las fibras tipo IIa/IIx y IIx/IIb. Estos datos son los representados en las gráficas de resultados. Posteriormente se repitió el proceso para cada genotipo y grupo de edad así como para cada músculo estudiado.

3.8.8 Cuantificación de la proporción de tipos de fibras oxidativas y glucolíticas

Para calcular la proporción de fibras oxidativas y glucolíticas se analizaron secciones de *soleus*, EDL y TA de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad, previamente incubadas mediante inmunofluorescencia con los anticuerpos específicos para cada tipo de fibra (**véanse apartados 3.8 y 3.8.7**). Una vez contados los tipos de fibras como se ha descrito en el **apartado 3.8.7**, se establecieron como fibras oxidativas las tipo I, IIa y mixtas de ambos tipos I/IIa, y

como fibras glucolíticas las tipo IIX, IIb, y mixtas IIA/IIX y IIX/IIb.^[384] Posteriormente se sumaron el total de fibras contadas incluidas en cada una de estas categorías, oxidativas y glucolíticas, y se calculó su porcentaje con respecto al total de fibras contadas, que es el dato representado en las gráficas de resultados. Posteriormente se repitió el proceso para cada genotipo y grupo de edad así como para cada uno de los músculos estudiados.^[384]

3.8.9 Cuantificación de fibras musculares positivas para el transportador de glucosa

GLUT 4

Para el cálculo de la proporción de fibras positivas para el transportador GLUT4 se analizaron secciones de *soleus*, GAST y TA de ratones WT y McA de 20 semanas de edad, previamente incubadas mediante inmunofluorescencia con los anticuerpos específicos para los tipos de fibras I, IIA y IIb y para GLUT4 (**véase apartado 3.8**). Para los contajes se consideraron fibras positivas para el marcador GLUT4 aquellas que presentaban un marcaje membranoso de este marcador, que como se ha descrito previamente indica que este transportador está activo,^[163, 164] y se calculó el porcentaje que este número de fibras tipo I, IIA ó IIb positivas para este marcador suponía en el total de cada uno de estos tipos de fibras, que es el dato representado en las gráficas de resultados. Este proceso se repitió para cada genotipo así como para cada músculo estudiado.

3.9 Cuantificación bioquímica de glucógeno

Para la cuantificación bioquímica de glucógeno se utilizaron muestras de músculos TA, GAST y QUAD de ratones WT y McA de 8 y 70 semanas de edad, utilizándose un mínimo de 3 ratones por genotipo y edad.

Las muestras fueron homogeneizadas y pulverizadas en un mortero de cerámica refrigerado con nieve carbónica y nitrógeno líquido, a fin de preservar las propiedades biológicas de las mismas. A continuación se pesaron en una balanza de precisión *Adventure Pro* (OHAUS, USA) los tubos *ependorfs* vacíos y con el pulverizado, para poder calcular el peso neto de cada una de las muestras. Una vez pulverizadas y pesadas las muestras, éstas se digirieron en 0,5 mL/muestra con una solución de hidróxido potásico al 30 % (KOH) saturada con 15 g de sulfato sódico (NaSO₄). Así mismo, se preparó una curva patrón de glucógeno (concentración inicial 2 mg/mL) incluyendo las siguientes concentraciones: 0; 0,016; 0,016; 0,032; 0,64; 0,125; 0,25; 0,5 y 1 mg/mL; al igual que las muestras, éstas fueron también diluidas en la solución de KOH al 30 % saturada con NaSO₄. Posteriormente tanto las muestras obtenidas como la curva patrón se hirvieron durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se añadieron 0,6 mL de

etanol al 95 %, tanto a las muestras como a la curva patrón, y se dejaron reposar en hielo durante 30 minutos. Seguidamente a la incubación en hielo, las muestras y la curva patrón se centrifugaron a 860 g durante 30 minutos.

Después de la centrifugación, se descartó el sobrenadante de las muestras y de la curva patrón y se resuspendió cada *pellet* utilizando los siguientes criterios:

-Los puntos de la curva patrón: 0; 0,016x2; 0,032; 0,064; 0,125; 0,25 y 0,5 mg/mL se resuspendieron en 0,6 mL de agua destilada.

-El punto 1 mg/mL se resuspendió en 1,2 mL de agua destilada.

-Las muestras obtenidas de los ratones WT se resuspendieron en 0,3 mL de agua destilada. El volumen utilizado para esta resuspensión se determinó teniendo en cuenta que la concentración de glucógeno en las mismas, en teoría, no era tan elevada como para interferir en la medida real de la cantidad de glucógeno que poseen.

-Los *pellets* procedentes de las muestras de ratones McA que superaban un peso de 50 mg se resuspendieron en 0,6 mL de agua destilada, mientras que los de un peso inferior se resuspendieron en 0,15 mL de la misma.

Tanto el punto 1 mg/mL como las muestras de ratones McA se resuspendieron en un mayor volumen de agua destilada debido a la gran concentración de glucógeno que presentaban, evitando así que ésta pudiera interferir en la medida real de la cantidad de glucógeno que se evalúa mediante esta técnica.

Finalmente, a las muestras de ratones McA se les realizó diluciones 1/10 y 1/20. De estas diluciones, del resto de muestras y de la curva patrón se tomaron 100 µL a los que se añadieron 100 µL de fenol al 5 % y 0,5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄), para la reacción colorimétrica, que se pipetearon en una placa *ELISA p96* (Sarstedt, Numbrecht, Alemania) para posteriormente medir su absorbancia mediante un espectrofotómetro (*Universal microplate reader* ELx800 de BIO-TEK INSTRUMENTS, INC., USA) y el programa *Gen5* (BIO-TEK INSTRUMENTS, INC., USA) a 490 nm de longitud de onda.

Los resultados fueron expresados en miligramos de glucógeno por gramo de tejido obtenido.

3.10 Estudios de expresión de mRNA

El RNA total del músculo GAST se extrajo mediante el protocolo^[385] de *TRIzol* (Invitrogen), previamente descrito. Una vez extraído el RNA, se trató con *DNase I amplification grade* (Invitrogen) con el fin de eliminar cualquier traza remanente de DNA. El DNA complementario se sintetizó a partir del RNA utilizando el *high-capacity complementary DNA archive kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA), que utiliza primers aleatorios. Así mismo se utilizó una

PCR en tiempo real, con una sonda *TaqMan fluorogenic probes* en una *7900 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y el *software Sequence Detection System v.2.4.1* (SDS 2.4.1, Applied Biosystems, USA) para evaluar los niveles de RNA de los genes *Pygm* (Mm00478582_m1), *Pygb* (Mm00464080_m1) y *Pygl* (Mm00500078_m1). Posteriormente, la determinación de la cuantificación relativa se realizó mediante el *software RQ Manager v.1.2.2* (Applied Biosystems, USA) y finalmente los resultados se normalizaron con los niveles de mRNA del gen peptidilpropil isomerasa A (ciclofilina A, *Ppia*) (Mm02342430_g1).

3.11 Obtención de extractos proteicos de tejido hepático, tejido muscular y tejido adiposo

Se realizó la extracción de proteínas de muestras de tejido hepático, muscular (GAST y TA) y adiposo de ratones de 8 (hígado), 20 (hígado, músculo y tejido adiposo) y 70 (tejido adiposo) semanas de edad. Las muestras fueron inicialmente pulverizadas en un mortero y resuspendidas en 120 µL de buffer de extracción (Tris HCl 20 Mm pH 7,5, NaCl 150 mM, Tritón 1 %) con inhibidores de proteasas, *Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets Easypack*, y fosfatasa, *PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets Easypack* (ROCHE, Basilea, Suiza). A continuación se centrifugaron las muestras de tejido hepático y muscular a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C, y a 12.000 g las muestras de tejido adiposo. Finalmente los sobrenadantes correspondientes a los extractos se almacenaron a -80 °C hasta su utilización. Las muestras se mantuvieron en frío durante todo el proceso de extracción.

3.12 Medición cuantitativa de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas para las muestras descritas en el apartado anterior, se realizó utilizando el kit *Bio-Rad DC Protein Assay* (Bio Rad, Hercules, CA, USA), que se basa principalmente en el método de Lowry.^[386]

En los distintos pocillos de una placa *ELISA p96* (Sarstedt, Alemania) se pipetearon por duplicado 5 µL de cada una de las muestras a analizar (diluidas 1/10 y 1/20 en buffer de extracción) y de la recta patrón. Ésta consiste en concentraciones crecientes de albúmina de suero bovino (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) de 0 a 1 mg/mL. A continuación se añadieron a cada pocillo 25 µL del reactivo A' (1 mL solución A y 20 µL de solución S) y 200 µL de la solución B del kit, y se dejaron incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente. Mediante un espectrofotómetro (*Universal microplate reader ELx800* de BIO-TEK INSTRUMENTS, INC.) y el programa *Gen5* (BIO-TEK INSTRUMENTS, INC., Winooski, VT, USA) se realizaron medidas de absorbancia a 630 nm de longitud de onda, de las distintas muestras.

La concentración de proteínas de cada muestra se calculó interpolando la absorbancia obtenida para las distintas muestras en la recta patrón realizada con las absorbancias correspondientes a cada concentración de BSA.

3.13 Western blot

Los extractos de proteína de tejido hepático, adiposo y muscular (GAST y TA) se separaron mediante electroforesis con un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 10 %, en presencia de tampón 0,25 M Tris pH 8,3, 1,92 M Glicina y 0,1 % SDS. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad, USA) mediante transferencia en húmedo. Ésta se realizó utilizando un tampón de transferencia que contenía Tris pH 8,3 0,25 M, Glicina 1,92 M, SDS 0,1 % y Metanol 20 %. Tras la misma, la membrana se tiñó con una solución de *Ponceau-S red* (Rojo Ponceau 0,5 %, Ácido acético 5 %) (Thermo Scientific, USA) para comprobar que la transferencia se había realizado correctamente.

A continuación las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de tampón tris salino (TWEEN 20 0,1 % + Tris-HCl pH 7,4 0,5 M NaCl 1,5 M (TTBS)) y el 5 % de leche sin grasa, para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana. La inmunodetección se realizó incubando las membranas durante toda la noche en cámara fría, a 4 °C, con los anticuerpos primarios correspondientes diluidos, como se indica en la **Tabla 7**. Posteriormente se realizaron tres lavados con TTBS de 10 minutos cada uno, y las membranas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios específicos diluidos (**Tabla 7**). Por último se realizaron otros tres lavados con TTBS de 10 minutos cada uno y las proteínas se expusieron a un reactivo quimioluminiscente (MILLIPORE, Billerica, MA, USA), en proporción 1:1, detectándose mediante *Odyssey Fc* (LI-COR Bioscience, Lincoln, NE, USA) y cuantificándose mediante el programa *Image Studio Software 5.x* (LI-COR Bioscience, USA).

Para la normalización de los valores obtenidos de cada proteína se utilizó como control de carga, la cuantificación del Ponceau de las membranas resultantes o de la proteína GAPDH, mediante los programas *Image Studio Software 5.x* (LI-COR Bioscience, USA) o *Image J, versión 1.37* (NIH, USA)^[380-382] respectivamente, y se normalizaron respecto al valor de un ratón WT.

Anticuerpo (Ac)	Casa comercial	Ac. Primario	Ac. Secundario	Tejido
AGL	(TA310177 Origene)	1/1000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/4000 con 5% leche en TTBS	Adiposo, Hígado
AMPK	(02/2017#2532/Cell Signaling Technology)	1/2000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/5000 con 5% leche en TTBS	Adiposo
ATGL	(ab135093/Abcam)	1/750 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/5000 con 5% leche en TTBS	Músculo, Adiposo
CD36	(GTX100642/GeneTex)	1/1000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/5000 con 5% leche en TTBS	Músculo
G6Pc	(ab83690 Abcam)	1/1000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/4000 con 5% leche en TTBS	Hígado
GAA	(ab102815/Abcam)	1/2000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/5000 con 5% leche en TTBS	Músculo
GAPDH	(AM4300/Ambion)	1/5000 con 5% leche en TTBS	Ratón 1/7000 con 5% leche en TTBS	Músculo, Hígado
GBE	(ab180596 Abcam)	1/1000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/4000 con 5% leche en TTBS	Adiposo, Hígado
GSK3t	(NBPI-19364 Novus Biologicals)	1/1000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/4000 con 5% leche en TTBS	Hígado
GYS-1	(01/2014#3893/Cell Signaling Technology)	1/2000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/5000 con 5% leche en TTBS	Adiposo
GYS-2	(ab83550 Abcam)	1/1000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/4000 con 5% leche en TTBS	Músculo, Hígado
HADH	(PA5-31157/Invitrogen)	1/2000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/5000 con 5% leche en TTBS	Músculo
HK-1	(ab110529 Abcam)	1/1000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/4000 con 5% leche en TTBS	Hígado
HSL Total	(03/2017#4107/Cell Signaling Technology)	1/750 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/5000 con 5% leche en TTBS	Músculo, Adiposo
Nrf2	(sc-365949/Santa Cruz)	1/2000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/5000 con 5% leche en TTBS	Músculo
p-AKT	(03/2014 92755 Cell Signaling Technology)	1/1000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/4000 con 5% leche en TTBS	Hígado
p-AMPK	(01/2014#25315 Cell Signaling Technology)	1/1000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/4000 con 5% leche en TTBS	Adiposo, Hígado
PCB	(ab126707/Abcam)	1/1000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/4000 con 5% leche en TTBS	Hígado
PCK2	(ab137580/Abcam)	1/1000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/4000 con 5% leche en TTBS	Hígado
PDHE 1-A	(ABS204/Merck)	1/2000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/5000 con 5% leche en TTBS	Músculo, Hígado
PFKL	(ab181064/Abcam)	1/1000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/4000 con 5% leche en TTBS	Hígado
PFKM	(ab154804/Abcam)	1/2000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/5000 con 5% leche en TTBS	Músculo
PGM	(ab192876/Abcam)	1/1000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/4000 con 5% leche en TTBS	Hígado
p-GSK3 α/β	(03/2014 93315/Cell Signaling Technology)	1/1000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/4000 con 5% leche en TTBS	Hígado
p-GYS 641	(07/2015 38915/Cell Signaling Technology)	1/1000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/4000 con 5% leche en TTBS	Músculo, Hígado
Phkb	(13400-1-AP/Protein Tech)	1/2000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/5000 con 5% leche en TTBS	Hígado
p-HSL Ser 565	(08/2010#4137/Cell Signaling Technology)	1/750 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/5000 con 5% leche en TTBS	Músculo, Adiposo
p-HSL Ser 660	(07/2012#4126/Cell Signaling Technology)	1/750 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/5000 con 5% leche en TTBS	Adiposo
PKM2	(ab137971/Abcam)	1/2000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/5000 con 5% leche en TTBS	Músculo
PLIN 5	(PA1-46215/Thermo Scientific)	1/750 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/5000 con 5% leche en TTBS	Músculo, Adiposo
PPAR δ	(GTX113250/GeneTex)	1/2000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/5000 con 5% leche en TTBS	Músculo
PYGB	(ab154969/Abcam)	1/2000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/5000 con 5% leche en TTBS	Adiposo
PYGL	(HPA0009627 Sigma-Aldrich)	1/1000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/4000 con 5% leche en TTBS	Hígado
PYGM	(19716-1-AP/Protein Tech)	1/2000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/5000 con 5% leche en TTBS	Músculo
UGP2	(GTX107616/GeneTex)	1/1000 con 5% leche en TTBS	Conejo 1/4000 con 5% leche en TTBS	Hígado

Tabla 7. Anticuerpos utilizados para el estudio metabólico de ratones McA mediante WB en tejido muscular, adiposo y hepático.

3.14 Actividad Glucógeno sintasa

La medición de la actividad glucógeno sintasa se realizó en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Joan Guinovart (<https://www.irbbarcelona.org/es/research/metabolic-engineering-and-diabetes-therapy>).

Se utilizaron muestras hepáticas con un peso mínimo de 100 mg, que fueron homogeneizadas mediante *Mini-BeadBeater-24* (Biospec Products) en 1 mL de buffer de homogenización enfriado con hielo (Tris HCl 10 mM pH = 7, KF 150 mM, EDTA 15 mM, 2-mercaptoetanol 15 mM, sacarosa 0,6 M, ácido okadaíco 25 nM, Ortovanadato de sodio 1 mM, leupeptina 10 µg/mL, aprotinina 10 µg/mL, pepstatina 10 µg/mL, benzamidina 1 mM, PMSF 1 mM (Sigma Aldrich)). La actividad en todos los homogenados se midió tanto en presencia como en ausencia de glucosa-6-fosfato 6,6 mM.^[387]

3.15 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente utilizando un test no paramétrico para muestras independientes (*Mann-Whitney test*) así como un test ANOVA de una vía para muestras no paramétricas (*Kruskal-Wallis test*) con comparaciones múltiples (*Dunn's multiple comparisons test*) mediante el programa *GraphPad 6 Prism* (La Jolla, CA, USA).

3.16 Bases de datos consultadas

Durante la realización de esta tesis se consultaron las siguientes bases de datos:

-GeneCards: <https://www.genecards.org/>

-National Center for Biotechnology Information (NCBI): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

-Orphanet: <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>

-Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): <https://omim.org/>

4. Resultados

4.1 Desviación de la herencia Mendeliana en los ratones McArdle

En el periodo comprendido desde enero de 2013 hasta mayo de 2018 se llevó a cabo un seguimiento de la colonia de ratones McA con el fin de obtener información sobre su supervivencia, el número de crías obtenidas al cruzar los distintos genotipos, la mortalidad perinatal asociada a esta enfermedad (en ratón) así como si existe desproporción entre los distintos genotipos obtenidos en la colonia, respecto de lo esperado por herencia Mendeliana. Durante este tiempo se realizaron un total de 139 cruces, de los cuales 19 fueron WT x HTZ, 47 HTZ x HTZ, 64 McA x HTZ y 9 McA x McA, dando lugar a un total de 583 camadas con 2.227 crías [1.133 machos (51 %) y 1.094 hembras (49 %)] (**Tabla 8**).

	Breedings (2013–2018)						Statistics	Total
	WT x HTZ		HTZ x HTZ	McA x HTZ		McA x McA		
	WT (M) x HTZ (F)	HTZ (M) x WT (F)	HTZ (M) x HTZ (F)	McA (M) x HTZ (F)	HTZ (M) x McA (F)	McA (M) x McA (F)		
Total number of breedings	9	10	47	58	6	9	N.A	139
Total number of litters	17	41	273	179	43	30	N.A	583
Total number of mice	103	189	1149	617	130	39	N.A	2227
Total number of males	45	102	578	325	64	19	N.A	1133
% of males	43,7	54,0	50,3	52,7	49,2	48,7	N.A	50,9
Total number of females	58	87	571	292	66	20	N.A	1094
% of females	56,3	46,0	49,7	47,3	50,8	51,3	N.A	49,1
Mice/litter	6,06 (±3,75)	4,61 (±3,69)	4,21 (±3,33)	3,45 (±2,75)	3,02 (±2,15)	1,30 (±1,74)	p < 0.0001	3,77 (±1,61)
	5,03 (±3,73)		4,21 (±3,33)	3,36 (±2,64)		1,30 (±1,74)		
Nº litters with 100% mortality	3	13	61	48	7	14	N.A	146
% litters with 100% mortality	5,5		22,3	24,8		35,9	N.A	22,1

Tabla 8. Resultados de los cruzamientos de la colonia de ratones McA en el período comprendido entre enero de 2013 y mayo de 2018. Abreviaturas: (M) Machos; (F) Hembras; N.A. No aplica. Para el análisis estadístico se utilizó un test ANOVA de una vía con un análisis post-hoc con el test *Tukey Honestly Significant Difference* (HSD). Estos datos fueron obtenidos en colaboración con los Dras. Astrid Brull y Noemí de Luna. Real-Martínez, A. et al. (2019). *Low survival rate and muscle fiber-dependent aging effects in the McArdle disease mouse model.*^[388]

El número de animales por camada resultó ser significativamente diferente para los distintos cruces, revelándose que cuanto más elevada era la presencia del alelo mutante *p.R50X* en los progenitores, más significativamente se reducía el número de crías por camada en la descendencia, asociándose así mismo la presencia de este alelo mutado en los progenitores con un incremento del porcentaje de camadas con una tasa de mortalidad del 100 %. En este sentido, cuando se cruzaron ratones HTZ x HTZ y McA x HTZ, se obtuvo una mayor proporción de crías heterocigotas, del 62,3 y 82,6 % respectivamente, que las esperadas por herencia Mendeliana, 50 y 75 % respectivamente (**Tabla 9**).

Breeding	Post-weaning genotyping									Embryo genotyping		
	WT x HTZ			HTZ x HTZ			HTZ x McA			HTZ x HTZ		
Offsprings	WT	HTZ	McA	WT	HTZ	McA	WT	HTZ	McA	WT	HTZ	McA
N° mice per genotype	96	137	N.A	368	718	67	N.A	580	122	12	17	9
Genotype %	41.2	58.8	N.A	31.9	62.3	5.8	N.A	82.6	17.4	31.5	44.7	23.6
Expected Genotype %	50	50	N.A	25	50	25	N.A	50	50	25	50	25
Statistics	Fisher's test p = 0.035			Chi-square test p < 0.001			Fisher's test p < 0.001			Chi-square test p = 0.864		

Tabla 9. Resultados de los genotipajes de la colonia de ratones McA en el período comprendido entre enero de 2013 y mayo de 2018. Abreviaturas: N.A. No aplica. Para el análisis estadístico se utilizó un test de Fisher (*Fisher's exact test*) para la comparación de ratones obtenidos con respecto a los esperados entre dos grupos, y un test Chi cuadrado (*Chi-square test*) para esta misma comparación en el caso de analizar tres grupos. Real-Martínez, A. *et al.* (2019).^[388]

El posterior genotipaje de 38 embriones procedentes de cruces HTZ x HTZ demostró una distribución mendeliana normal de embriones McA, por lo que estos resultados sugieren una elevada mortalidad perinatal de los ratones McA.

4.2 Elevada tasa de mortalidad de los ratones McArdle

Cuando se analizaron los datos obtenidos para todos aquellos ratones genotipados después del destete (21 días después del nacimiento) se realizó una curva de supervivencia (Fig. 36) (N = 2.088; WT = 464; HTZ = 1.435; McA = 189; incluyendo machos y hembras).

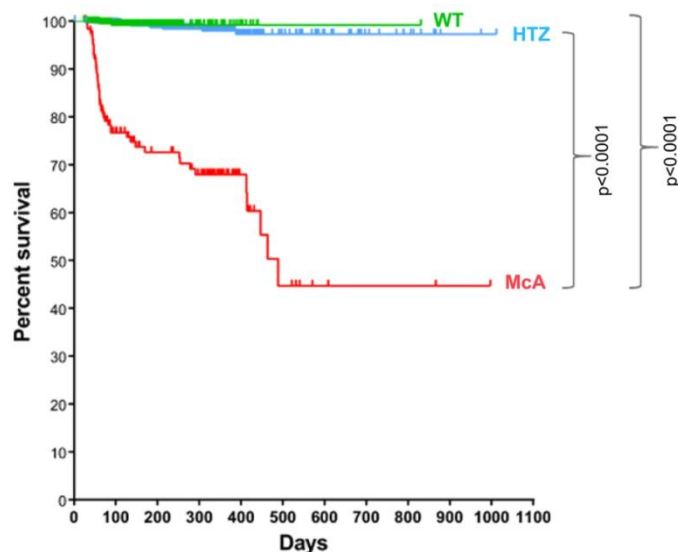


Figura 36. Curva de supervivencia de Kaplan y Meier para los ratones WT, HTZ y McA nacidos entre el 01/01/2013 y el 05/08/2018. Existe una reducción significativa de la tasa de supervivencia de los ratones McA con respecto a los WT y HTZ [p valor <0,0001; *log-rank (Mantel-Cox test)*]. De los 464 ratones WT, 461 fueron censurados y 3 muertes espontáneas en 831 días, de los 1.435 ratones HTZ, 1.420 fueron censurados y 15 muertes espontáneas en 1.012 días; y finalmente de los 189 ratones McA, 137 fueron censurados y 52 muertes espontáneas en 997 días. Real-Martínez, A. *et al.* (2019).^[388]

Los datos obtenidos muestran una tasa de supervivencia significativamente menor de los ratones McA que los WT y HTZ; siendo la supervivencia acumulada de los ratones WT del 99,3 % medida en un tiempo continuado de 831 días, del 98,9 % en los HTZ en 1.012 días y de tan

sólo un 44,7 % en los McA en 997 días. Estos datos sugieren una elevada mortalidad perinatal en los ratones McA.

4.3 Diferencias fenotípicas y asociadas a la edad en la anatomía y la bioquímica de los ratones McArdle

A continuación, realizamos una caracterización anatómica y bioquímica de los ratones McA a dos edades distintas, 20 y 70 semanas de edad, con el fin de averiguar si se producía una progresión fenotípica de la enfermedad asociada al envejecimiento.

La comparación visual de ratones de 70 semanas de edad evidenciaba una clara diferencia de tamaño corporal y de grasa abdominal entre ratones WT y McA, tal y como se observa en la **figura 37**, no presente en ratones de 20 semanas de edad.



Figura 37. Imagen de ratones WT (derecha) y McA (izquierda) de 70 semanas de edad con apertura abdominal tras disección. Se muestra una clara diferencia de tamaño y de cantidad de grasa abdominal entre ambos genotipos.

La determinación longitudinal del peso evidenció que los ratones McA presentaban menor peso que los ratones WT y HTZ ya a partir de las 30 semanas de edad (**Figs. 38 A y B**). Así mismo, realizando una separación por sexo como muestran las **figuras 38 C, D, E y F**, los ratones McA machos, con respecto a los WT y HTZ, presentaban unas diferencias de peso perceptibles ya a las 20 semanas de edad (**Figs. 38 C y D**), mientras que en las hembras estas diferencias, al igual que en el computo global, empezaban a apreciarse a partir de las 30 semanas de edad (**Figs. 38 E y F**).

En relación con los ratones WT y McA de 20 semanas de edad, existen diferencias significativas en el peso de su grasa abdominal, en el peso relativo de ésta y en el peso del corazón, siendo estos parámetros inferiores en los ratones McA. Así mismo, entre ambos genotipos existen diferencias significativas en el peso relativo del hígado, siendo éste superior en los ratones McA (**Tabla 10**).

Así pues, entre los ratones WT y McA de 70 semanas de edad existen diferencias significativas del peso, del peso de su grasa abdominal, del peso relativo de la misma, del peso del hígado y del peso del corazón, siendo manifiestamente inferiores los valores observados para todos estos parámetros en los ratones McA. Así mismo, cabe destacar que el peso relativo del corazón de los ratones McA de esta edad es algo mayor que el de los WT (**Tabla 10**).

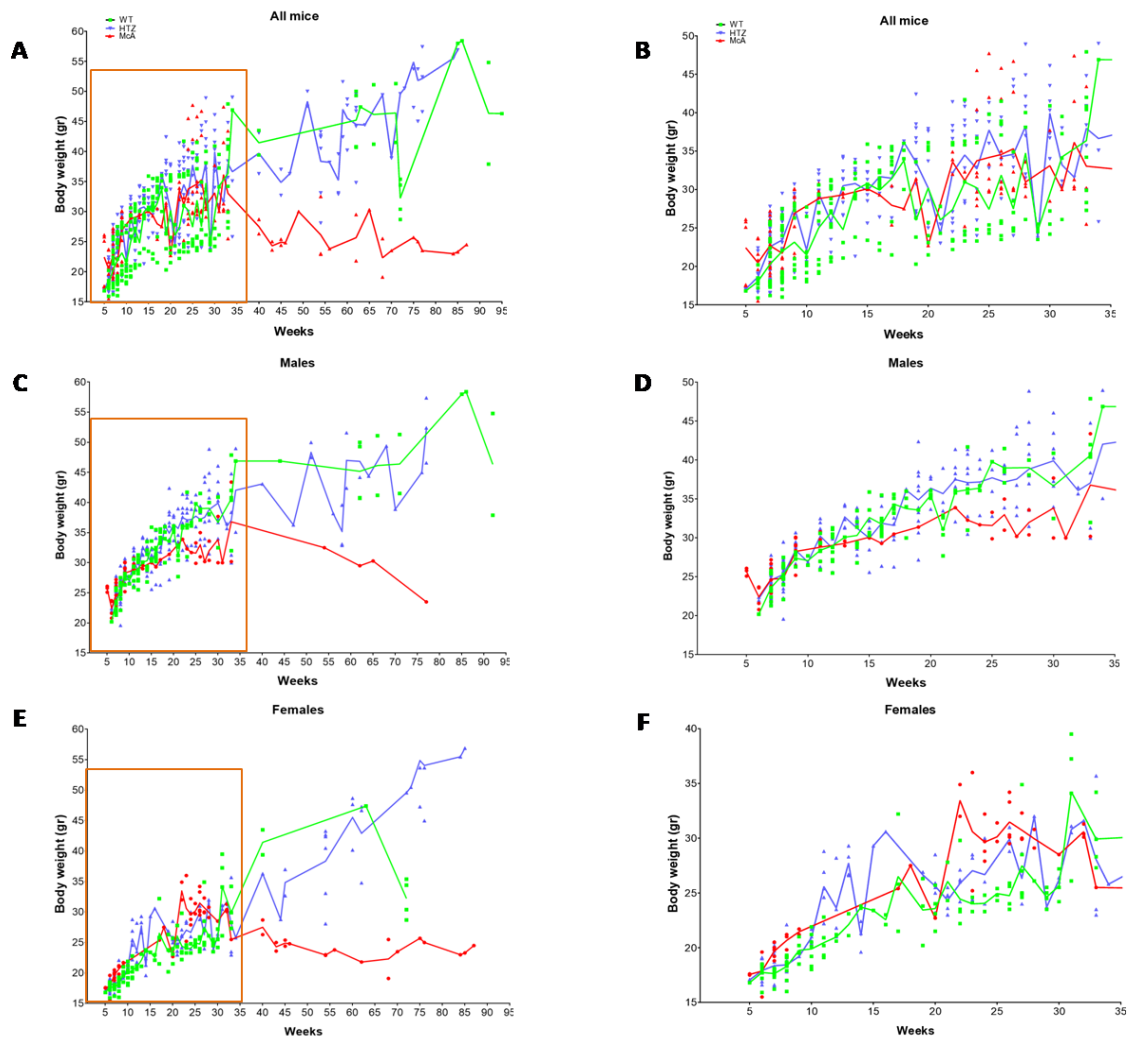


Figura 38. Estudio del peso corporal de ratones WT, HTZ y McA a distintas edades. La línea y puntos verdes representan la tendencia y los valores de los ratones WT. La línea y los puntos azules representan la tendencia y los valores de los ratones HTZ. La línea y los puntos rojos representan la tendencia y los valores de los ratones McA. Cada punto representa el valor de un sólo animal. Los gráficos se agrupan en ratones de ambos sexos de 5 a 95 y de 5 a 35 semanas de edad (Figs. 39 A y B respectivamente), ratones machos de 5 a 95 y de 5 a 35 semanas de edad (Figs. 39 C y D respectivamente) y ratones hembras de 5 a 95 y de 5 a 35 semanas de edad (Figs. 39 E y F respectivamente).

Atendiendo ahora a las diferencias anatómicas que presenta cada uno de los genotipos con el envejecimiento, comparando ratones de 20 y 70 semanas de edad, se observa para los ratones WT un aumento significativo del peso de su grasa abdominal, del peso relativo de ésta y del peso del hígado con la edad, así como un descenso significativo del peso del QUAD y del peso

relativo del corazón. En el caso de los ratones McA, entre las diferencias anatómicas que se observan con el envejecimiento cabe destacar un aumento significativo del peso relativo de la grasa abdominal (**Tabla 10**).

	<i>Pygm genotype</i>				<i>Statistics</i>			
	WT 20w	McA 20w	WT 70w	McA 70w	<i>Genotype effects</i>		<i>Aging effects</i>	
					<i>WT vs McA 20w</i>	<i>WT vs McA 70w</i>	<i>WT 20w vs 70w</i>	<i>McA 20w vs 70w</i>
N (M+F)	6 (3+3)	4 (3+1)	8 (4+4)	6 (3+3)				
Age (weeks)	20,2 ± 0,4	23,5 ± 12,4	70,3 ± 2,7	72,8 ± 9,1	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Body weight (g)	30,4 ± 5,5	26,2 ± 3,6	39,3 ± 8,6	26,2 ± 2,9	p=0,333	p=0,003	p=0,081	p=0,562
Gast. Length (cm)	1,04 ± 0,09	1,04 ± 0,10	1,00 ± 0,11	0,94 ± 0,06	p>0,999	p=0,237	p=0,593	p=0,133
Gast. Weight (mg)	132,7 ± 15,5	156,0 ± 27,3*	134,9 ± 29,2	108,0 ± 26,3	P=0,167	p=0,197	p=0,798	p=0,143
TA length (cm)	0,87 ± 0,09	0,94 ± 0,08	0,95 ± 0,09	1,01 ± 0,04	p=0,505	p=0,211	p=0,064	p=0,229
TA weight (mg)	46,9 ± 14,9	47,2 ± 15,9	51,9 ± 13,5	48,2 ± 6,2*	p=0,829	p=0,803	p=0,548	p>0,999
Quad. Length (cm)	1,08 ± 0,09	1,05 ± 0,17	1,01 ± 0,13	1,06 ± 0,17	p=0,767	p=0,686	p=0,428	p=0,701
Quad weight (mg)	144,9 ± 17,2	131,9 ± 59,1	109,6 ± 26,9	101,6 ± 53,6*	p=0,562	p=0,779	p=0,029	p=0,413
Abdominal Fat (gr)	1,09 ± 0,48	0,32 ± 0,27	2,76 ± 0,82	0,59 ± 0,18	p=0,019	p<0,001	p=0,001	p=0,114
% Abdominal Fat	3,48 ± 1,08	1,14 ± 0,67	6,96 ± 1,08	2,29 ± 0,74	p=0,019	p<0,001	p<0,001	p=0,038
Liver (gr)	1,11 ± 0,19	1,15 ± 0,14	1,59 ± 0,42	1,05 ± 0,30	P=0,752	p=0,02	p=0,029	p=0,195
% Liver	3,69 ± 0,35	4,39 ± 0,44	4,04 ± 0,43	3,99 ± 0,92	p=0,019	p=0,548	p=0,178	p=0,352
Heart Weight (gr)	0,16 ± 0,04	0,12 ± 0,02	0,17 ± 0,05	0,14 ± 0,03	p=0,014	p=0,038	p=0,732	p=0,236
% Heart	0,53 ± 0,08	0,47 ± 0,04	0,43 ± 0,08	0,51 ± 0,08	p=0,243	p=0,059	p=0,023	p=0,381

Tabla 10. Valores de las distintas mediciones anatómicas realizadas en ratones WT y McA de 20 y 70 semanas de edad. Debajo de cada genotipo y edad se encuentra representado el número de ratones utilizados en cada medición (N) y entre paréntesis su separación por géneros (M = Machos y F= Hembras). Para el análisis estadístico se utilizó el test no paramétrico *Mann-Whitney*. En negrita y recuadradas en verde se resaltan aquellas diferencias que tras el análisis estadístico resultan significativas, y recuadradas en naranja aquellas que, pese a no ser significativas estadísticamente, presentan una tendencia relevante. Los asteriscos indican una N inferior por falta de datos de alguno de los ratones utilizados para ese tejido, genotipo y edad (Gast. Weight McA 20w N = 3, TA Weight McA 70w N = 5 y QUAD Weight McA 70w N = 5).

El análisis bioquímico realizado en estos mismos genotipos y grupos de edad muestra así mismo importantes diferencias. Por un lado, a las 20 semanas de edad se observa una tendencia en los ratones McA a presentar menores niveles de concentración de glucosa en sangre que los WT de la misma edad, y por otro lado cabe destacar que a las 70 semanas de edad se observan los ratones McA con respecto a los WT presentan unos niveles

significativamente menores en sangre de la concentración de glucosa, de insulina y lactato, así como unos niveles significativamente mayores de las concentraciones sanguíneas de CK y de aspartato aminotransferasa (AST) y una tendencia a presentar mayores niveles de concentración de amonio.

	<i>Pygm genotype</i>				<i>Statistics</i>			
	WT 20w	McA 20w	WT 70w	McA 70w	<i>Genotype effects</i>		<i>Aging effects</i>	
					<i>WT vs McA 20w</i>	<i>WT vs McA 70w</i>	<i>WT 20w vs 70w</i>	<i>McA 20w vs 70w</i>
Glucose mg/dL	176,6 ± 46,6	120,0 ± 50,4	155,6 ± 22,0*	101,2 ± 41,5	p=0,067	p=0,018	p=0,419	p=0,576
Insulin (IU/ml)	N.D.	N.D.	560,7 ± 407,2*	221,7 ± 75,9	N.D.	p=0,038	N.D.	N.D.
Triglycerides (mg/dL)	48,0 ± 27,0*	N.D.	60,9 ± 23,5	44,0 ± 14,7*	N.D.	p=0,146	p=0,226	N.D.
Ammonium (µmols/L)	216,5 ± 87,3*	N.D.	228,7 ± 125,5*	348,2 ± 151,8	N.D.	p=0,093	p=0,702	N.D.
CK (U/L)	690,0 ± 811,2*	N.D.	128,1 ± 78,0*	726,0 ± 1043,2*	N.D.	p=0,003	p=0,029	N.D.
Lactate (mmols/L)	5,9 ± 2,1*	N.D.	8,4 ± 3,8*	2,7 ± 1,3*	N.D.	p<0,001	p=0,084	N.D.
ALT (U/L)	7,9 ± 4,1*	N.D.	24,3 ± 12,0*	31,1 ± 25,5*	N.D.	p=0,801	p=0,017	N.D.
AST (U/L)	43,3 ± 18,3*	N.D.	47,3 ± 15,2*	136,0 ± 72,9*	N.D.	p=0,007	p=0,949	N.D.

Tabla 11. Valores de las distintas mediciones bioquímicas realizadas en ratones WT y McA de 20 y 70 semanas de edad. El número de ratones utilizados por genotipo y edad en aquellas casillas donde aparece un asterisco es: WT 20w N = 9, WT 70w N = 11 en las mediciones de Lactato y Glucosa, N = 10 en las mediciones de Amonio, ALT y AST, N = 7 en la medición de CK y N = 4 en la medición de Insulina, y McA 70w N= 8 en las mediciones de CK y Lactato, N = 7 en las mediciones de ALT y AST y N = 4 en la medición de Triglicéridos. Todas aquellas casillas que no presentan asterisco indican una N igual a la de la tabla anterior (Tabla 10). N.D. no determinado. Para el análisis estadístico se utilizó el test no paramétrico *Mann-Whitney*. En negrita y recuadradas en verde se resaltan aquellas diferencias que tras el análisis estadístico resultaron significativas, y recuadradas en naranja aquellas que, pese a no ser significativas estadísticamente, presentan una tendencia relevante. El análisis estadístico para los ratones McA de 20 semanas de edad no se pudo realizar para ciertos parámetros por falta de datos.

Si atendemos ahora al envejecimiento, comparando ratones de 20 y 70 semanas de edad, se observa para los ratones WT un aumento significativo de la concentración en sangre de alanina aminotransferasa (ALT) y una tendencia al aumento de las concentraciones sanguíneas de lactato, así como un descenso significativo de la concentración de CK, con la edad. En este estudio, la falta de datos de ratones McA de 20 semanas de edad nos impide completar más en detalle el análisis (Tabla 11).

Estos resultados sugieren un comportamiento distinto de los ratones McA y WT. En términos generales, los ratones McA presentan un menor aumento de masa corporal, tanto total como de alguno de sus órganos y tejidos, así como importantes diferencias en la captación de glucosa, función y afectación muscular, que en conjunto contrastan con la evolución que parecen tener los ratones WT, que presentan un mayor aumento de su peso corporal

acompañado con el de algunos órganos y tejidos, y no parecen sufrir alteraciones en la captación de glucosa o en la función y afectación muscular.

4.4 Incremento de la desestructuración, la fibrosis y la nucleofilia a nivel histológico en los músculos de los ratones McArdle

Los análisis histológicos de las biopsias de pacientes de McArdle así como la caracterización histológica realizada posteriormente en el modelo murino de esta enfermedad, que muestran alteraciones en la forma y tamaño de las fibras musculares así como grandes acumulaciones de glucógeno en ellas, nos ha hecho plantearnos un estudio más completo sobre la evolución y progresión de la enfermedad en los distintos tipos de músculo.^[312, 316, 317]

Así pues, inicialmente realizamos una evaluación histopatológica de los músculos *soleus*, GAST, EDL, TA y QUAD, abarcando los tipos metabólicos musculares oxidativo, mixto y glucolítico, de ratones McA de 8, 35 y 70 semanas de edad mediante tinción H&E, observándose la presencia de fibras desestructuradas, una gran variabilidad del tamaño de las mismas, la presencia de vacuolas y núcleos centrales (NC), así como un incremento del área de la matriz extracelular, resultando mucho más evidente en ratones de 70 semanas de edad (**Fig. 39**).

Al analizar en detalle las imágenes del músculo EDL de ratones McA de 8, 35 y 70 semanas de edad, se observaron zonas con una gran proporción de NC y un incremento del número de los mismos por fibra, especialmente en ratones de 70 semanas de edad (**Fig. 40**).

Posteriormente, para determinar si el incremento del área de la matriz extracelular de los músculos objeto de estudio estaba asociado a procesos de fibrosis, se incubaron las secciones musculares con los marcadores específicos de matriz extracelular LAM, COL IV y FBN, según el procedimiento descrito en el **apartado 3.8**.

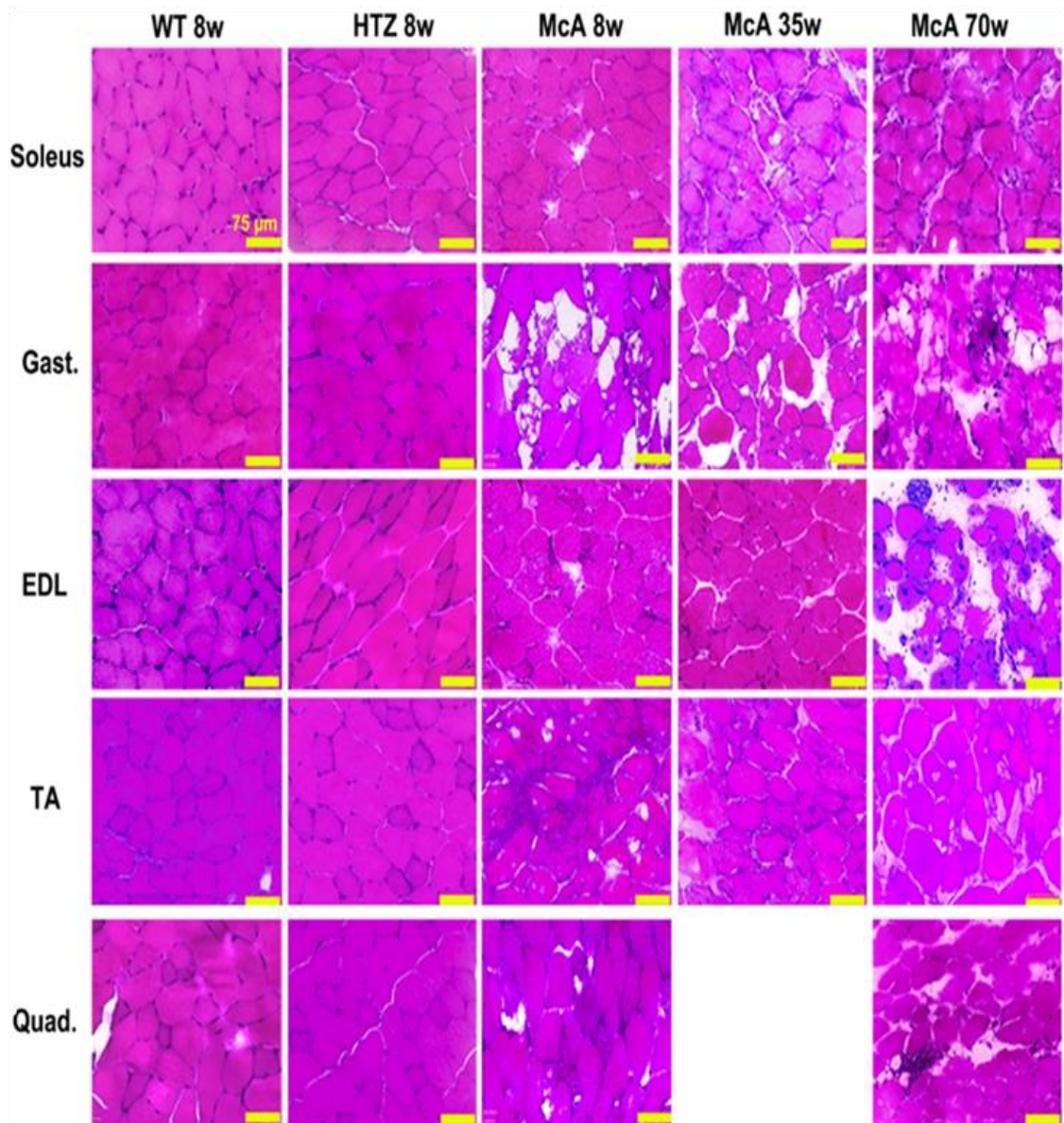


Figura 39. Imágenes de la caracterización histológica de ratones McArdle. Tinciones H&E de los músculos *soleus*, *GAST*, *EDL*, *TA* y *QUAD* de ratones WT y HTZ de 8 semanas de edad y *McA* de 8, 35 y 70 semanas de edad. Todas las barras de escala se corresponden con 75 µm. El hueco presente en la imagen se debe a la falta de muestra de *QUAD* de ratones *McA* de 35 semanas de edad en el momento de realizar el estudio. Real-Martínez, A. *et al.* (2019). "Low survival rate and muscle fiber-dependent aging effects in the McArdle disease mouse model" ^[388]

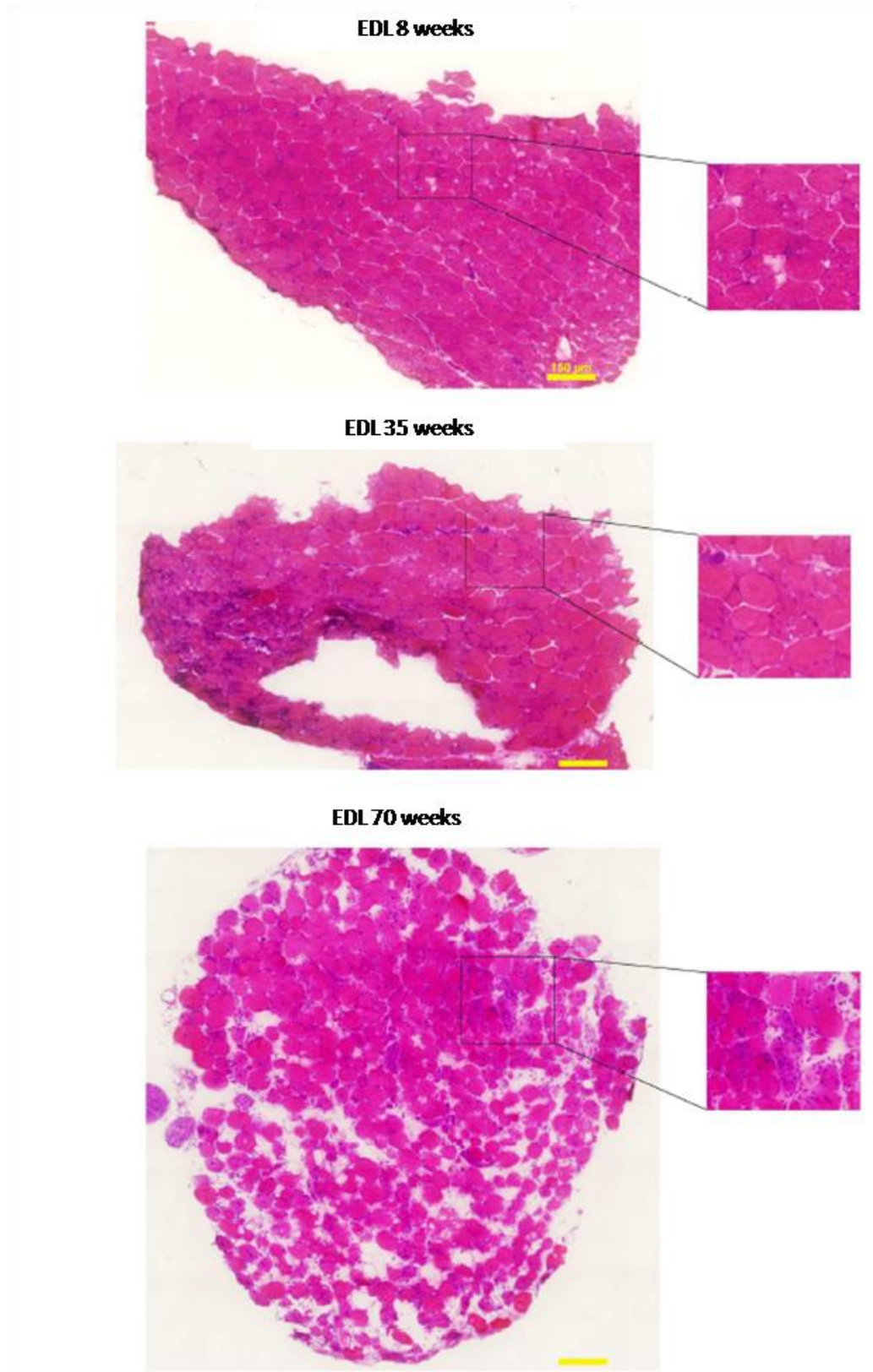


Figura 40. Tinció H&E del músculo EDL de ratones McA de 8, 35 y 70 semanas de edad. Todas las barras de escala se corresponden con 150 µm. Se observa un claro incremento del espacio intersticial en la muestra de ratón McA de 70 semanas de edad. Real-Martínez, A. *et al.* (2019).^[388]

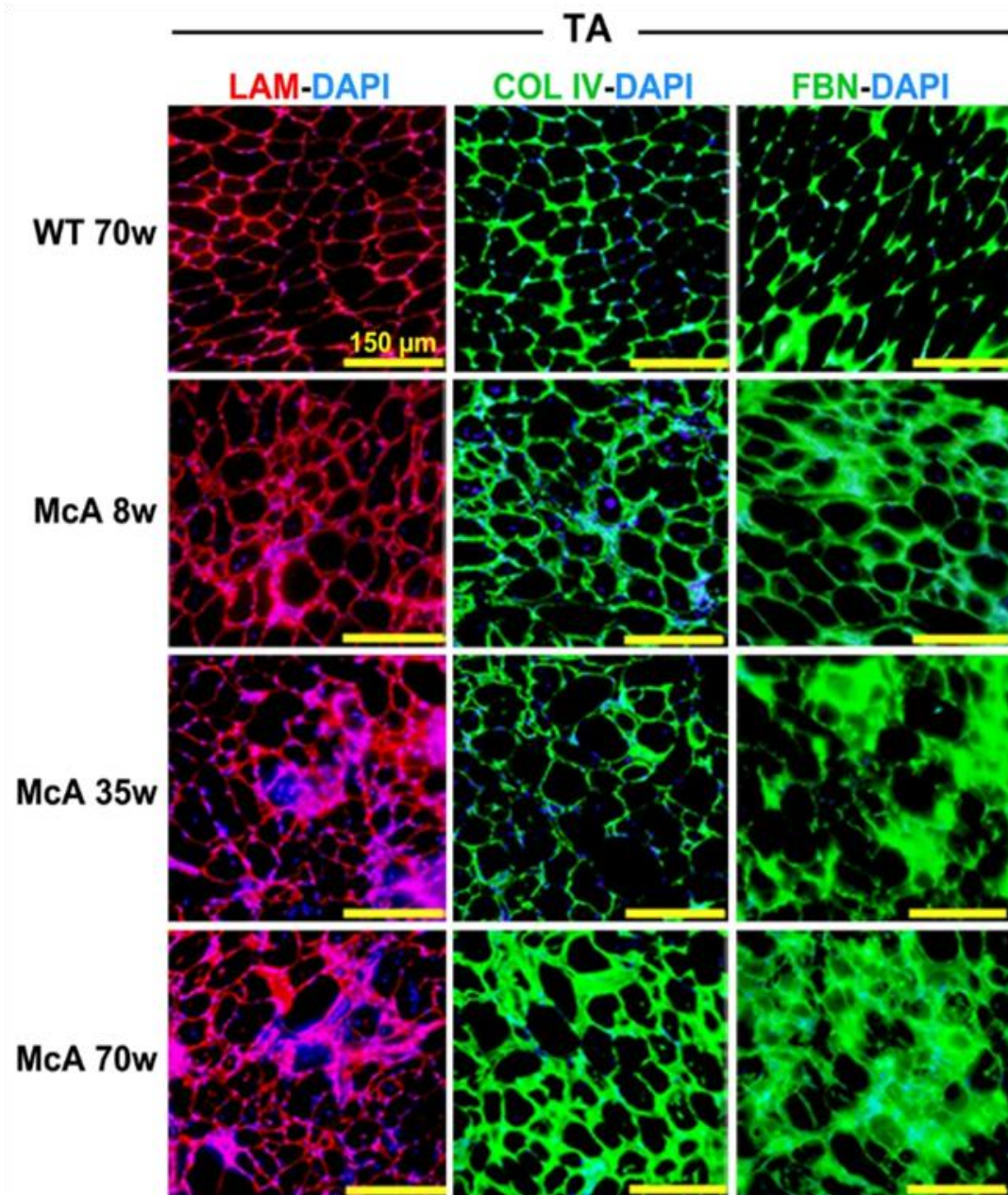


Figura 41. Tinciones de LAM-DAPI, Col IV-DAPI y FBN-DAPI del músculo TA de ratones WT de 70 semanas y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad. Todas las barras de escala se corresponden con 150 µm. Real-Martínez, A. *et al.* (2019).^[388]

Las imágenes tomadas del músculo TA muestran claros procesos de fibrosis en las secciones musculares correspondientes a ratones McA de 8, 35 y 70 semanas de edad con respecto a las de ratones WT de 70 semanas de edad (Fig. 41). Los hallazgos observados en los músculos EDL, QUAD y *soleus* utilizando estos mismos marcadores, ponen de manifiesto que los de LAM y FBN presentan un especial incremento del área fibrótica en ratones McA de 70 semanas de edad, tanto en EDL como en *soleus*, mientras que en el QUAD este incremento es mucho menor (Fig. 42).

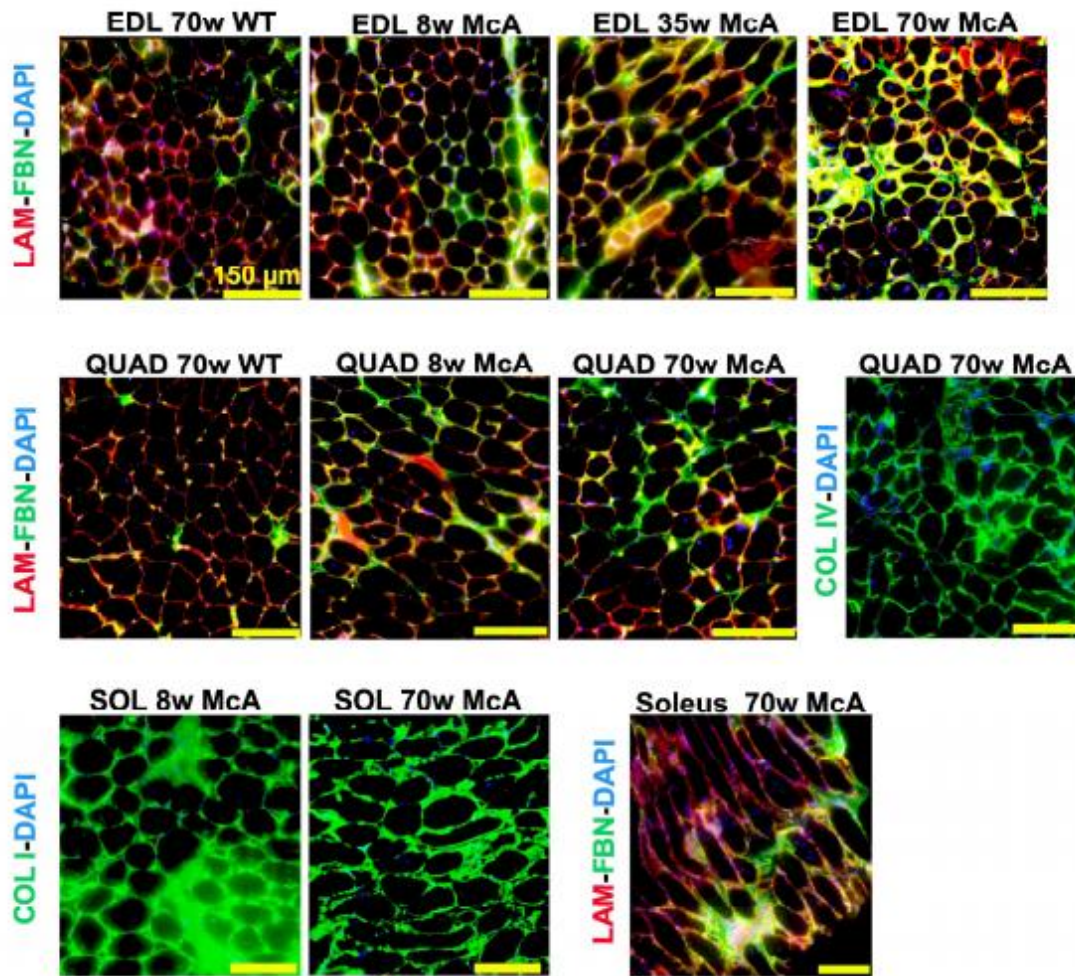


Figura 42. Tinciones dobles de LAM-FBN y simples de COL I y IV en los músculos EDL, QUAD y *soleus* de ratones McA. Todas las barras de escala se corresponden con 150 μm . Real-Martínez, A. *et al.* (2019).^[388]

Por último, mediante un marcaje con LAM y Dapi, también puede observarse el aumento de núcleos alrededor de la membrana sarcoplasmática de las fibras de los músculos *soleus* y TA, siendo éste más leve en ratones de 8 semanas de edad y más evidente en ratones McA de 35 y 70 semanas de edad (Fig. 43). La presencia de esta acumulación de núcleos rodeando la membrana de las fibras musculares podría indicar un incremento de células pro-inflamatorias tales como neutrófilos y macrófagos, que responderían ante los procesos de fibrosis que se presentan según avanza la enfermedad.

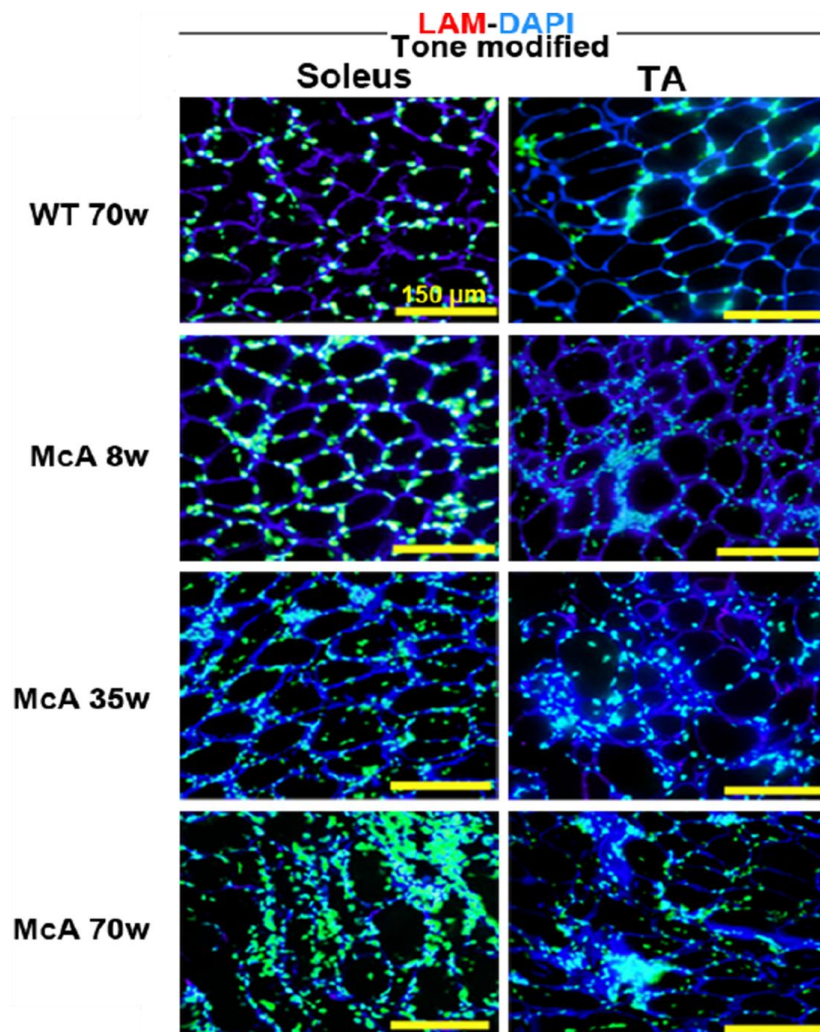


Figura 43. Tinciones LAM-DAPI de los músculos *soleus* y TA de ratones WT de 70 semanas y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad. El tono de las imágenes ha sido modificado (la saturación y el tono fueron captados a -105 y +25 respectivamente, mediante Adobe® Photoshop®). Debido a esta modificación la Laminina queda teñida en un color azul oscuro mientras que el DAPI toma un color verde azulado que realza los núcleos. Todas las barras de escala se corresponden con 150 μm. Real-Martínez, A. *et al.* (2019).^[388]

En esta línea se realizó una tinción de inmunofluorescencia con los marcadores específicos de matriz extracelular COL IV, de membrana de macrófagos CD68^[389] y Dapi (**Fig. 44**) en los músculos TA y QUAD de ratones McA de 70 semanas de edad. Como puede observarse en la **figura 44**, el marcaje con CD68 co-localiza en ambos músculos con las zonas donde existe una mayor presencia de núcleos rodeando la membrana sarcoplasmática (**Figs. 44 A y B**), lo que refleja la activación de una respuesta inflamatoria.

Estos resultados en conjunto sugieren diferencias en el grado de afectación de los distintos músculos objeto de estudio según avanza la enfermedad, así mientras el QUAD y el *soleus* mantienen su estructura, los músculos EDL, TA y GAST presentan una pérdida más evidente de su conformación con la evolución de la misma.

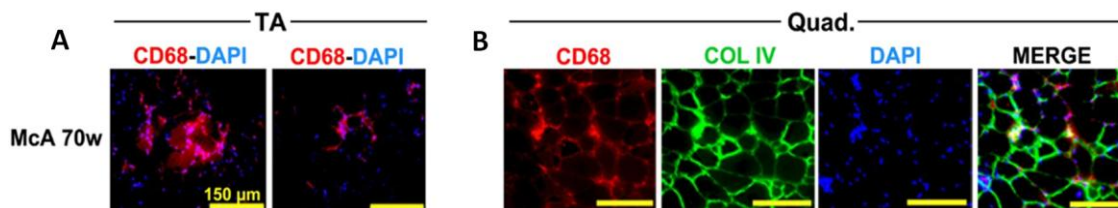


Figura 44. Tinciones CD68-DAPI y CD68-COL IV-DAPI de los músculos TA y QUAD de ratones McA de 70 semanas de edad. Todas las barras de escala se corresponden con 150 μm . Real-Martínez, A. *et al.* (2019).^[388]

Así mismo, indicarían que procesos como la fibrosis y la inflamación están relacionados con esta afectación en el músculo esquelético de los ratones McA.

4.5 Mayor proporción del área fibrótica en los músculos de los ratones

McArdle

A la vista de los resultados histológicos observados y teniendo en cuenta que en caso de daño progresivo se produce un aumento de los niveles de los componentes de la matriz extracelular dando lugar a un tejido más fibrótico de lo habitual,^[81, 84, 95-98] el siguiente paso ha sido analizar cuantitativamente la fibrosis en la evolución de la enfermedad de McA.

Para este análisis se han utilizado muestras de los músculos *soleus*, EDL y TA de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad, en las que mediante el uso de marcadores específicos de fibrosis tales como LAM, FBN y COL IV, se ha medido la proporción del área total que representa cada uno de estos tres componentes fibróticos en ambos genotipos (**véase en apartado 3.8.1**).

Así, los datos obtenidos en el *soleus* para muestran una tendencia de los ratones McA a presentar una mayor proporción del área de LAM que los WT en los tres grupos de edad objeto de estudio, siendo las diferencias del ≈ 8 , 1 y 5 % respectivamente (**Fig. 45 A**), mientras que en el caso del área de COL IV, lo más destacable es la tendencia de los ratones McA a presentar una mayor proporción que los WT, en el grupo de 70 semanas de edad, con una diferencia del ≈ 7 % (**Figs. 45 B**). En todo caso, ninguna de las diferencias mencionadas son estadísticamente significativas.

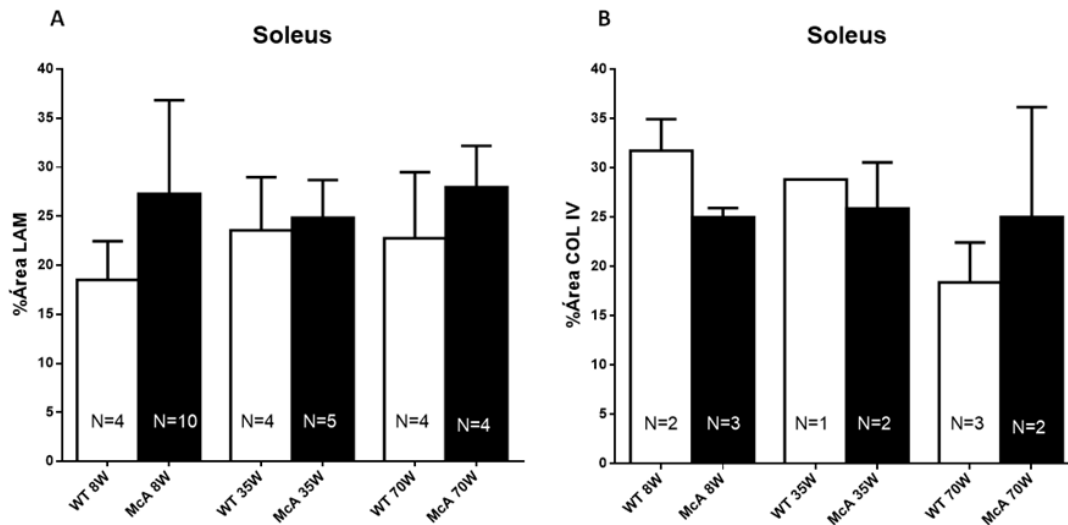
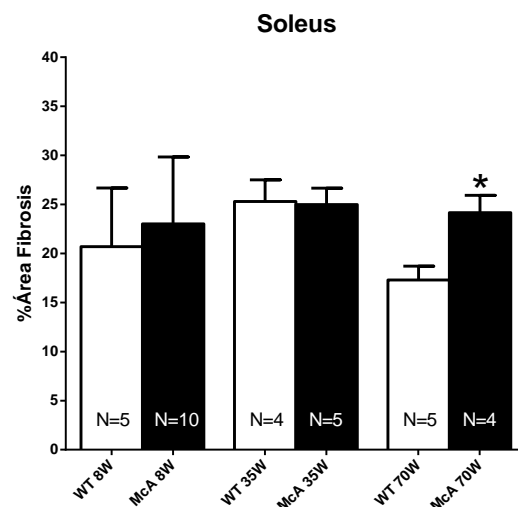


Figura 45. Estudio cuantitativo longitudinal de la fibrosis muscular en el músculo soleus de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad. Cada columna representa el % medio del área de LAM y COL IV, respectivamente, de los distintos genotipos (WT en blanco y McA en negro) en los grupos de edad objeto de estudio. El número total de ratones utilizado de cada genotipo y grupo de edad (N) está indicado en la parte inferior de las columnas de la gráfica. A) En cada columna se midió entre $41.184,88 \mu\text{m}^2$ (mínimo) y $531.136.332,27 \mu\text{m}^2$ (máximo) con un promedio de $12.666.087,71 \mu\text{m}^2$. B) En cada columna se midió entre $59.477,98 \mu\text{m}^2$ (mínimo) y $1.220.982,84 \mu\text{m}^2$ (máximo) con un promedio de $291.323,9 \mu\text{m}^2$. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (SD). Se utilizaron los tests no paramétricos *Mann-Whitney* y *Kruskal Wallis* ANOVA de una vía con el test de comparaciones múltiples (*Dunn's test*) para su análisis estadístico.

Los datos obtenidos en el *soleus* del promedio del área de los tres marcadores de fibrosis utilizados, LAM, FBN y COL IV, ponen de manifiesto que para los grupos de edad de 8 y 70 semanas, los ratones McA presentan mayor proporción de área fibrótica que los WT, con diferencias del ≈ 2 y 7% respectivamente, siendo significativa ésta a las 70 semanas de edad, por el contrario, no se observan diferencias entre ambos genotipos en la proporción de área fibrótica para el grupo de 35 semanas de edad (Fig. 46).

Figura 46. Estudio cuantitativo longitudinal de la fibrosis muscular en el músculo *soleus* de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad. Cada columna representa el % medio del área fibrótica de los distintos genotipos (WT en blanco y McA en negro) en los grupos de edad objeto de estudio. El número total de ratones utilizado de cada genotipo y grupo de edad (N) está indicado en la parte inferior de las columnas de la gráfica. En cada columna se midió entre $404.921,66 \mu\text{m}^2$ (mínimo) y $532.498.186 \mu\text{m}^2$ (máximo) con un promedio de $22.162.755,8 \mu\text{m}^2$. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (SD). Se utilizaron los tests no paramétricos *Mann-Whitney* y *Kruskal Wallis* ANOVA de una vía con el test de comparaciones múltiples (*Dunn's test*) para su análisis estadístico. El asterisco representa un p valor $< 0,05$.



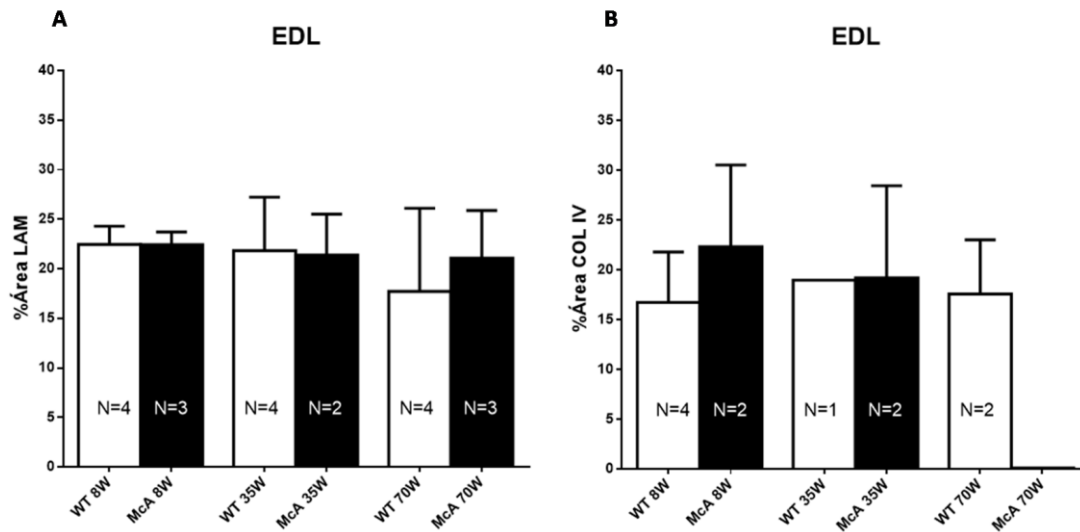
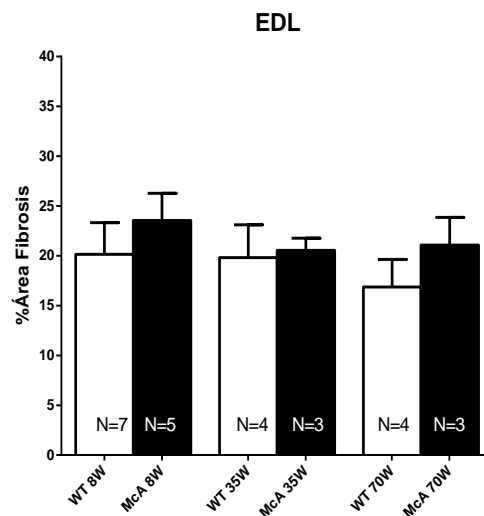


Figura 47. Estudio cuantitativo longitudinal de la fibrosis muscular en el músculo EDL de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad. Cada columna representa el % medio del área de LAM y COL IV, respectivamente, de los distintos genotipos (WT en blanco y McA en negro) en los grupos de edad objeto de estudio. El número total de ratones utilizado de cada genotipo y grupo de edad (N) está indicado en la parte inferior de las columnas de la gráfica. A) En cada columna se midió entre $133.200,8 \mu\text{m}^2$ (mínimo) y $357.061.008,4 \mu\text{m}^2$ (máximo) con un promedio de $8.086.036,62 \mu\text{m}^2$. B) En cada columna se midió entre $66.673,47 \mu\text{m}^2$ (mínimo) y $613.416,35 \mu\text{m}^2$ (máximo) con un promedio de $231.011,18 \mu\text{m}^2$. Las barras de error corresponden a desviación estándar (SD). Se utilizaron los tests no paramétricos *Mann-Whitney* y *Kruskal Wallis* ANOVA de una vía con el test de comparaciones múltiples (*Dunn's test*) para su análisis estadístico.

Los datos obtenidos en el músculo EDL de los marcadores de fibrosis LAM y COL IV analizados individualmente muestran una tendencia de los ratones McA a presentar una mayor proporción del área de LAM que los WT para el grupo de 70 semanas de edad, siendo la diferencia del $\approx 3\%$ (Fig. 47 A); para el marcador COL IV, dada la falta de individuos para el análisis de algunos grupos de edad, lo más destacable es la tendencia, no significativa estadísticamente, de los ratones McA a presentar una mayor proporción del área de COL IV que los WT para el grupo de 8 semanas de edad, con una diferencia del $\approx 5\%$ (Figs. 47 B).

Figura 48. Estudio cuantitativo longitudinal de la fibrosis muscular en el músculo EDL de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad. Cada columna representa el % medio del área fibrótica de los distintos genotipos (WT en blanco y McA en negro) en los grupos de edad objeto de estudio. El número total de ratones utilizado de cada genotipo y grupo de edad (N) está indicado en la parte inferior de las columnas de la gráfica. En cada columna se midió entre $77.579,56 \mu\text{m}^2$ (mínimo) y $391.507.365 \mu\text{m}^2$ (máximo) con un promedio de $29.995.694,2 \mu\text{m}^2$. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (SD). Se utilizaron los tests no paramétricos *Mann-Whitney* y *Kruskal Wallis* ANOVA de una vía con el test de comparaciones múltiples (*Dunn's test*) para su análisis estadístico.



Los datos agrupados de los tres marcadores de fibrosis en el músculo EDL indican una tendencia de los ratones McA a presentar una mayor proporción de área fibrótica que los WT para los tres grupos de edad estudiados, principalmente para los de 8 y 70 semanas de edad, con diferencias del $\approx 4\%$ en ambos grupos, mientras que en el de 35 semanas esta tendencia es menor, suponiendo tan sólo el $\approx 1\%$. En cualquier caso, cabe destacar que en ninguno de los tres grupos de edad estudiados estas diferencias entre genotipos son significativas (**Fig. 48**).

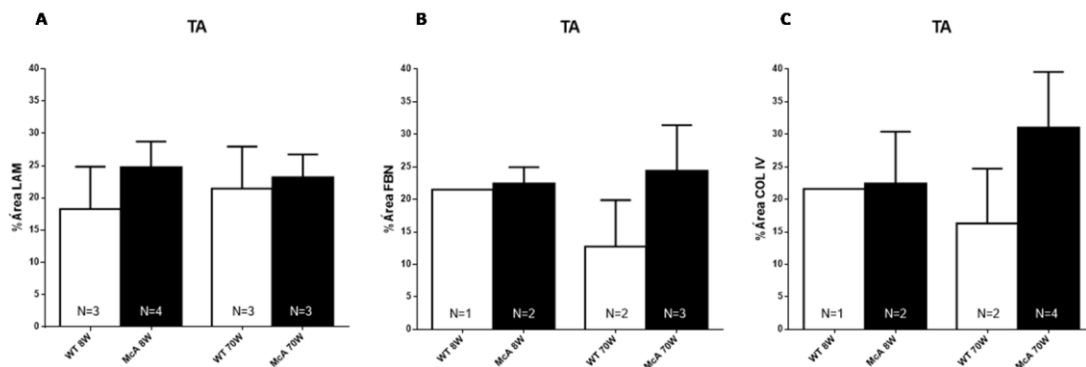
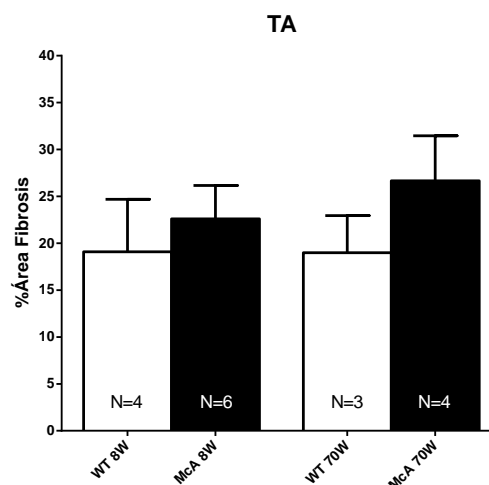


Figura 49. Estudio cuantitativo longitudinal de la fibrosis muscular en el músculo TA de ratones WT y McA de 8 y 70 semanas de edad. Cada columna representa el % medio del área de LAM, FBN y COL IV de los distintos genotipos (WT en blanco y McA en negro) en los grupos de edad objeto de estudio. El número total de ratones utilizado de cada genotipo y grupo de edad (N) está indicado en la parte inferior de las columnas de la gráfica. A) En cada columna se midió entre $68.434,63 \mu\text{m}^2$ (mínimo) y $5.731.234 \mu\text{m}^2$ (máximo) con un promedio de $526.352 \mu\text{m}^2$. B) En cada columna se midió entre $58.676,28 \mu\text{m}^2$ (mínimo) y $3.086.820,32 \mu\text{m}^2$ (máximo) con un promedio de $1.365.858,92 \mu\text{m}^2$. C) En cada columna se midió entre $71043,27 \mu\text{m}^2$ (mínimo) y $386.0574,13 \mu\text{m}^2$ (máximo) con un promedio de $611.509,05 \mu\text{m}^2$. Las barras de error corresponden a desviación estándar (SD). Se utilizó el test no paramétrico *Mann-Whitney* para su análisis estadístico.

En el análisis de los datos obtenidos en el músculo TA, para cada uno de los tres marcadores de fibrosis, LAM, FBN y COL IV, y los grupos de edad de 8 y 70 semanas, se observa una tendencia de los ratones McA a presentar una mayor proporción del área de LAM que los WT, en ambos grupos de edad, con diferencias del $\approx 7\%$ y 2% respectivamente (**Fig. 49 A**); para los otros dos marcadores, dada la falta de individuos para el análisis de algunos grupos de edad, lo más destacable es una tendencia de los ratones McA a presentar mayor proporción del área de FBN y COL IV que los WT de 70 semanas de edad, con unas diferencias del $\approx 11\%$ y 15% , respectivamente (**Figs. 49 B y C**). En ninguno de los casos descritos las diferencias observadas presentan significación estadística. Por último, el análisis del área correspondiente a la agrupación de los tres marcadores de fibrosis estudiados en el músculo TA, realizado únicamente en ratones WT y McA de 8 y 70 semanas de edad, revela una tendencia de los ratones McA a presentar una mayor proporción de área fibrótica que los WT en ambos grupos de edad, con diferencias del $\approx 4\%$ y 8% respectivamente, valores que de nuevo carecen de significación estadística (**Fig. 50**).

Figura 50. Estudio cuantitativo longitudinal de la fibrosis muscular en el músculo TA de ratones WT y McA de 8 y 70 semanas de edad. Cada columna representa el % medio del área fibrótica de los distintos genotipos (WT en blanco y McA en negro) en los grupos de edad objeto de estudio. El número total de ratones utilizado de cada genotipo y grupo de edad (N) está indicado en la parte inferior de las columnas de la gráfica. En cada columna se midió entre 626.979,26 μm^2 (mínimo) y 7.389.045,32 μm^2 (máximo) con un promedio de 2.939.671,54 μm^2 . Las barras de error corresponden a la desviación estándar (SD). Se utilizó el test no paramétrico *Mann-Whitney* para su análisis estadístico.



En términos generales, gran parte de los datos obtenidos a lo largo de este estudio de los tres marcadores de fibrosis en los músculos analizados, carecen de significación estadística. Esta ausencia de significación puede ser debida a la heterogeneidad que presenta la fibrosis en estos músculos, dando lugar a un patrón donde se observan áreas con una clara presencia de fibrosis y otras donde ésta es menos perceptible, de esta forma en la cuantificación global, las diferencias de la proporción del área fibrótica quedarían enmascaradas.

4.6 Diferencias en el grado de afectación de los distintos músculos de los ratones McArdle con la edad

Los resultados obtenidos de la caracterización histopatológica mediante tinción H&E de los distintos músculos analizados, sugieren una afectación diferencial en la progresión fenotípica de la enfermedad para cada uno de ellos. Por tanto, a continuación realizamos una cuantificación de los procesos de degeneración/regeneración con el fin de determinar qué músculos se ven más afectados por la enfermedad y por la progresión de la misma, para lo que se realizó una cuantificación de la proporción de fibras que presentan núcleos centrales (*centrally nucleated fibers*, CNF), que son marcadores de referencia de este tipo de procesos.^[4, 99-101] Esta cuantificación muestra que los ratones McA presentan una mayor proporción de CNF que los WT en todos los grupos de edad y músculos objeto de estudio. Así mismo, en el *soleus* se observa un aumento significativo del porcentaje de CNF con la edad, 8, 35 y 70 semanas, que no se refleja en ninguno de los otros músculos estudiados (Fig. 51 A).

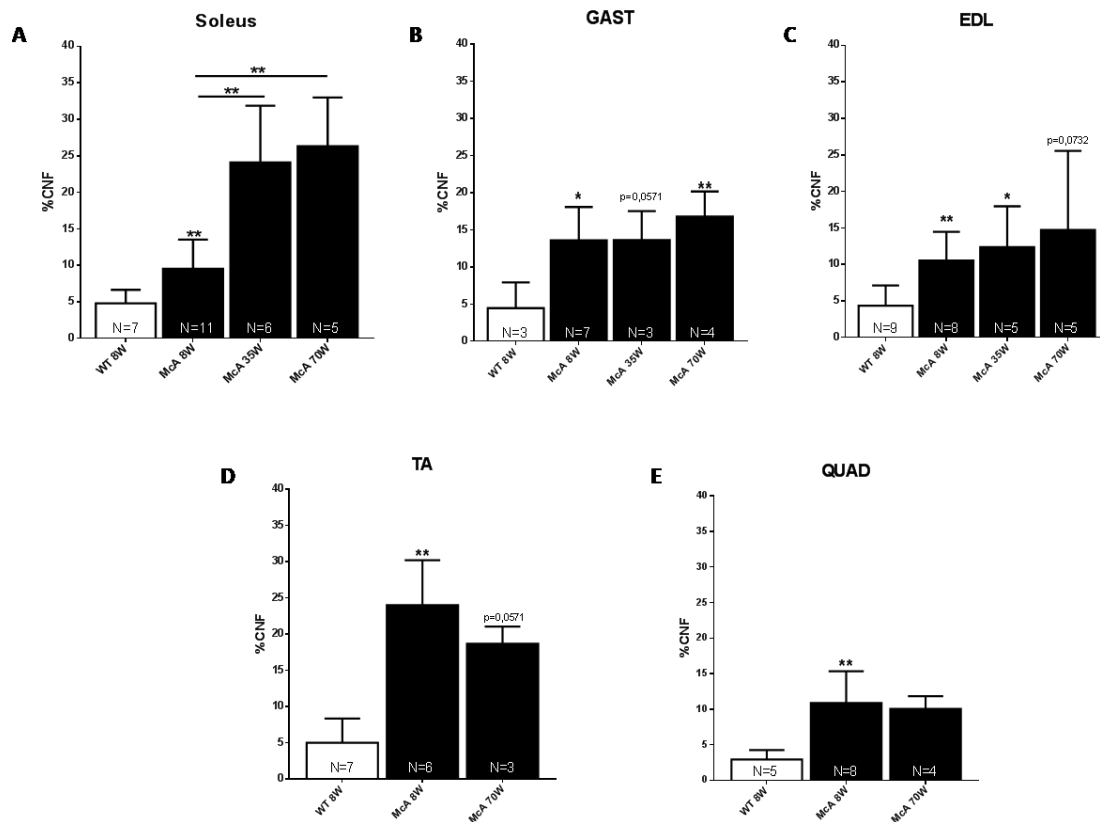


Figura 51. Estudio cuantitativo longitudinal de la regeneración de fibras musculares en *soleus*, *GAST*, *EDL*, *TA* y *QUAD* de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad. Cada columna representa el % medio de CNF de los distintos genotipos (WT en blanco y McA en negro) en los grupos de edad objeto de estudio. El número total de ratones utilizado para cada genotipo y grupo de edad (N) está indicado en la parte inferior de las columnas de la gráfica. Las barras de error corresponden a desviación estándar (SD). Se utilizaron los tests no paramétricos *Mann-Whitney* y *Kruskal Wallis* ANOVA de una vía con el test de comparaciones múltiples (*Dunn's test*) para su análisis estadístico. Los asteriscos representan un p valor <0,05 y los dobles un p valor <0,01.

Así, los datos obtenidos en el músculo *soleus* muestran mayor proporción de CNF en los ratones McA que en los WT de 8 semanas de edad, con diferencias del ≈ 5 , 20 y 22 % en 8, 35 y 70 semanas de edad respectivamente (Fig. 51 A). En el músculo *GAST*, los datos obtenidos muestran mayor proporción de CNF en los ratones McA que los WT de 8 semanas de edad, con diferencias del ≈ 9 , 9 y 12 % en 8, 35 y 70 semanas de edad respectivamente (Fig. 51 B). En el caso del músculo *EDL*, los datos muestran mayor proporción de CNF en los ratones McA que en los WT de 8 semanas de edad, con diferencias del ≈ 6 , 8 y 10 % en 8, 35 y 70 semanas de edad respectivamente (Fig. 51 C). Los datos del músculo *TA* muestran mayor proporción de CNF en los ratones McA que los WT de 8 semanas de edad, con diferencias del ≈ 19 y 13 % en 8 y 70 semanas de edad respectivamente (Fig. 51 D). Finalmente, en el músculo *QUAD* se observa mayor proporción de CNF en los ratones McA que en los WT de 8 semanas de edad, con diferencias del ≈ 8 y 8 % en 8 y 70 semanas de edad respectivamente (Fig. 51 E).

Estas diferencias observadas son estadísticamente significativas en todos los músculos y grupos de edad analizados salvo en el QUAD de ratones McA de 70 semanas de edad.

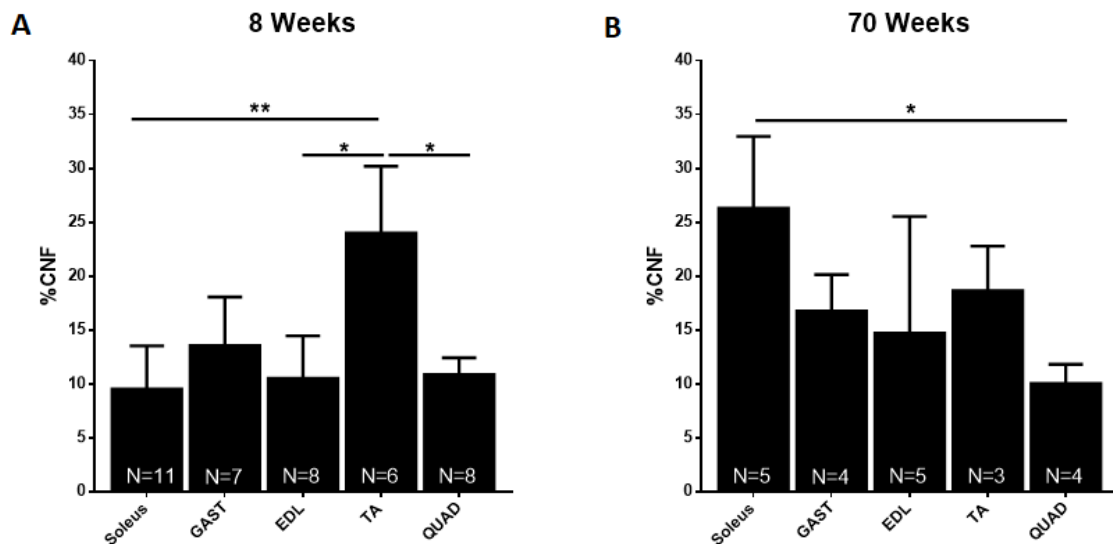


Figura 52. Gráficas que representan el porcentaje medio de CNF de los ratones McA. A) Porcentaje medio de CNF de los ratones McA de 8 semanas de edad. B) Porcentaje medio de CNF de los ratones McA de 70 semanas de edad. El número total de ratones utilizado (N) está indicado en la parte inferior de las columnas de la gráfica. Las barras de error corresponden a desviación estándar (SD). Se utilizó el test no paramétrico *Kruskal Wallis ANOVA* de una vía con el test de comparaciones múltiples (*Dunn's test*) para su análisis estadístico. Los asteriscos representan un p valor <0,05 y los dobles un p valor <0,01.

En el estudio realizado también se observa que mientras que el TA parece ser el músculo más afectado por estos procesos de degeneración/regeneración en los ratones McA de 8 semanas de edad, siendo significativa su mayor proporción de CNF con respecto a los músculos *soleus*, EDL y QUAD (Fig. 52 A), es el *soleus* el que presenta sin embargo una mayor proporción de CNF que el resto de músculos evaluados en ratones McA de 70 semanas de edad, siendo significativa esta diferencia con respecto al QUAD (Figs. 52 B).

Esta mayor afectación del *soleus* con la edad se confirma también con la cuantificación del promedio de núcleos centrales (*central nuclei*, CN) por fibra, siendo este músculo de nuevo el único que presenta un incremento progresivo para 8, 35 y 70 semanas de edad, con diferencias significativas entre todos los grupos de edad analizados (Fig. 53 A, B, C, D y E). Así mismo, en el músculo TA, también se observa un incremento significativo de NC por fibra entre ratones McA de 8 y 70 semanas de edad (Fig. 53 D). Estos resultados indicarían que efectivamente existen diferencias en el grado de afectación que presentan los distintos músculos estudiados, siendo también distinta su capacidad de regeneración, destacando el comportamiento de los músculos *soleus* y TA a lo largo de la enfermedad, en relación con estos procesos de degeneración/regeneración.

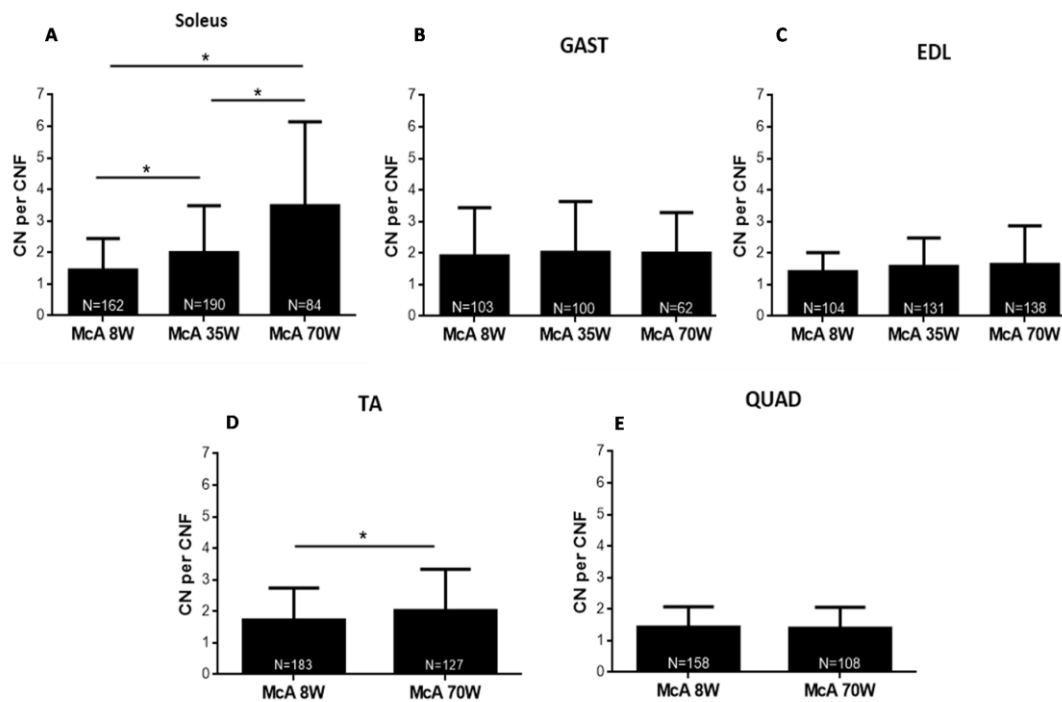


Figura 53. Gráficas que representan el número medio de NC (CN) por fibra con NC (CNF) en los músculos *soleus* (A), GAST (B), EDL (C), TA (D) y QUAD (E) de los ratones McA de 8, 35 y 70 semanas de edad. El número total de fibras cuantificado (N) está indicado en la parte inferior de las columnas de las gráficas. Las barras de error corresponden a desviación estándar (SD). Se utilizó el test no paramétrico *Mann-Whitney* su análisis estadístico. Los asteriscos representan un p valor <0,05.

4.7 Diferencias en el tamaño promedio de las fibras musculares de los distintos músculos de los ratones McArdle con la edad

Como los procesos de degeneración/regeneración en enfermedades crónicas pueden llegar a afectar al tamaño de las fibras musculares,^[61, 62] el siguiente paso en nuestro estudio ha sido analizar si estos procesos afectan al tamaño de las fibras de los músculos *soleus*, GAST, EDL, TA y QUAD en la enfermedad de McArdle, para lo que se realizó la cuantificación del diámetro mínimo de Feret (mFd) tanto en ratones WT como McA de 8, 35 y 70 semanas de edad.

Esta cuantificación muestra que el tamaño promedio de las fibras de los músculos *soleus* y QUAD de los ratones McA de 70 semanas de edad, presentan un incremento significativo respecto de los correspondientes a 8 semanas, del ≈ 18 y 4 % respectivamente (Fig. 54 A). Sin embargo, en los músculos EDL, TA y GAST se aprecia un descenso significativo del tamaño promedio de sus fibras musculares, del ≈ 4 , 6 y 19 % respectivamente, comparando los mismos grupos de edad (Fig. 54 B).

De los resultados obtenidos se deduciría una menor afectación por la enfermedad de McArdle, de las fibras musculares del QUAD y el *soleus* que de las del resto de músculos estudiados.

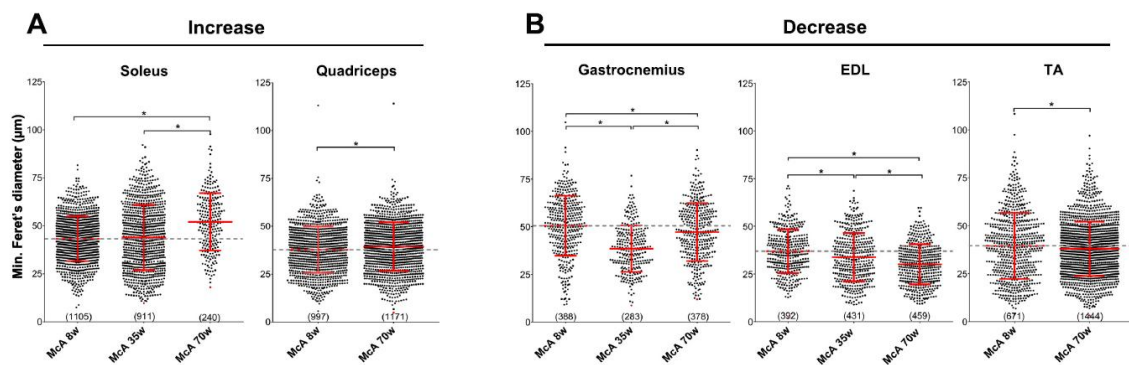


Figura 54. Gráficas que muestran un incremento y un descenso del tamaño promedio de las fibras musculares entre los ratones McA de 8 y 70 semanas de edad de los músculos *soleus* y QUAD y GAST, EDL y TA, tras la determinación del mFd respectivamente. Los datos están representados en un gráfico tipo *Scatter Plot*. Cada punto representa el mFd de una única fibra. La línea discontinua gris representa el promedio de los valores de los ratones McA de 8 semanas de edad de cada músculo objeto de estudio. En cada grupo, la media y la SD están representadas en rojo. Bajo la representación de los puntos se indica entre paréntesis el total de fibras analizadas. Para cada grupo se utilizaron entre 3 y 5 ratones. Como análisis estadístico se utilizó un test ANOVA de una vía con un análisis post-hoc con el test *Tukey Honestly Significant Difference* (HSD). Los asteriscos representan un p valor <0,05. Real-Martínez, A. *et al.* (2019).^[388]

4.8 Diferencias en el grado de afectación y tamaño promedio de los distintos tipos de fibras musculares, en los músculos de los ratones

McArdle con la edad

Una vez cuantificadas las diferencias del tamaño promedio de las fibras de los ratones McA, para los distintos músculos objeto de estudio según avanza la enfermedad, y deducido por tanto el distinto grado de afectación de éstos así como la capacidad de regeneración que presentan sus fibras, se planteó que estas diferencias podrían ser debidas a la distinta composición específica de cada músculo en cuanto a sus tipos de fibras.^[105] Este planteamiento impulsó la realización de un estudio inmunohistológico longitudinal específico en los músculos *soleus* y TA, de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad, mediante inmunofluorescencias con los marcadores específicos para los distintos tipos de fibras (véase apartado 3.8 y tabla 6), con objeto de determinar si existe un daño diferencial para los distintos tipos de fibras musculares.

Los resultados obtenidos en el *soleus* muestran que a nivel estructural las fibras tipo I mantienen su morfología y prácticamente su tamaño, presentando un ligero aumento según avanza la enfermedad, mientras que las fibras tipo IIa y IIx se muestran más dañadas, con una degeneración clara que comporta una disminución progresiva del tamaño de las mismas (Figs. 55 A y 56 A). En el TA por su parte, aunque también se observa ese mismo grado de afectación

de las fibras tipo IIa y IIx, las fibras mixtas tipo IIx/IIb parecen estar menos dañadas (Figs. 55 B y 56 B).

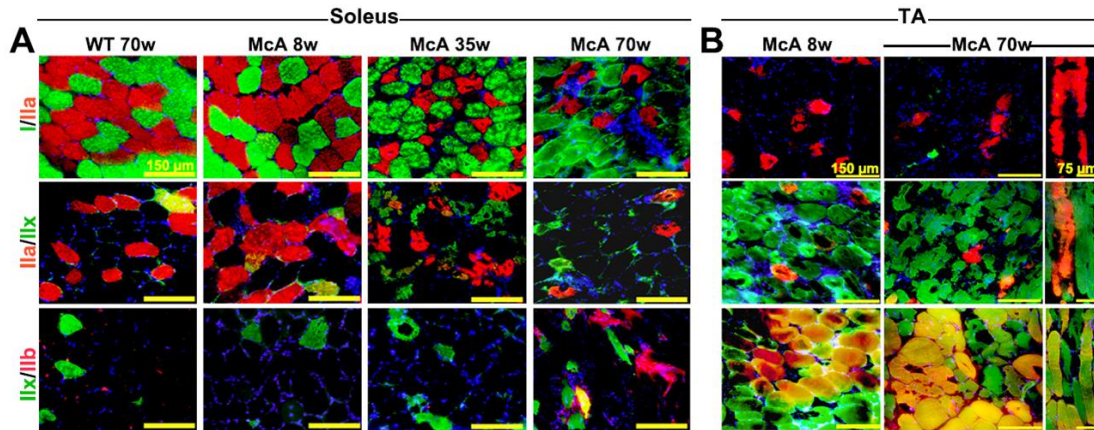


Figura 55. Imágenes representativas de la degeneración de las fibras tipo IIa y IIx en los músculos *soleus* y TA. A) Inmunofluorescencias dobles para las MHC I, IIa, IIx y IIb en el músculo *soleus* de ratones WT de 70 semanas de edad y McA de 8, 35 y 70 semanas, que muestran que las fibras tipo I no están estructuralmente afectadas por la acumulación de glucógeno en los grupos de edad analizados, mientras que las fibras tipo IIa, IIx y mixtas tipo IIa/IIx presentan un incremento de la degeneración según avanza la enfermedad. Todas las barras de escala corresponden a 150 μm. B) Inmunofluorescencias dobles para las mismas MHC en el músculo TA de ratones McA de 8 y 70 semanas de edad que muestran la degeneración de las fibras tipo IIa, IIx y mixtas tipo IIa/IIx en ratones McA de 8 semanas de edad, y que se exagera en los de 70 semanas. Las fibras mixtas tipo IIx/IIb parecen estar protegidas frente a la degeneración. Se muestran también secciones longitudinales. Todas las barras de escala corresponden a 150 μm. Real-Martínez, A. *et al.* (2019).^[388]

Partiendo de nuevo de los resultados obtenidos en el estudio longitudinal de las fibras musculares de los ratones McA, que ponen de manifiesto diferencias del tamaño promedio de las mismas en los músculos objeto de estudio según avanza la enfermedad, se planteó realizar la cuantificación longitudinal comparativa del mFd de los distintos tipos de fibras del músculo *soleus* de ratones McA de 8, 35 y 70 semanas de edad, para ver si se confirman los resultados observados en el estudio inmunohistológico anterior. Con esta cuantificación se confirma que las fibras tipo I son significativamente más grandes que las fibras tipo IIa y IIx en ratones McA de 8 semanas de edad (Figs. 57 A y B), aumentando su tamaño en un $\approx 8\%$ según avanza la enfermedad, hecho que contrasta con la disminución de tamaño que sufren con dicho avance, en un $\approx 8\%$ y 11% respectivamente, las fibras tipo IIa y IIx (Figs. 57 A y B). Esta disminución de tamaño promedio resulta significativa para las fibras tipo IIa de los ratones McA entre 8 y 35 semanas y entre 35 y 70 semanas, y para las fibras tipo IIx entre 8 y 35 semanas (Figs. 57 A y B).

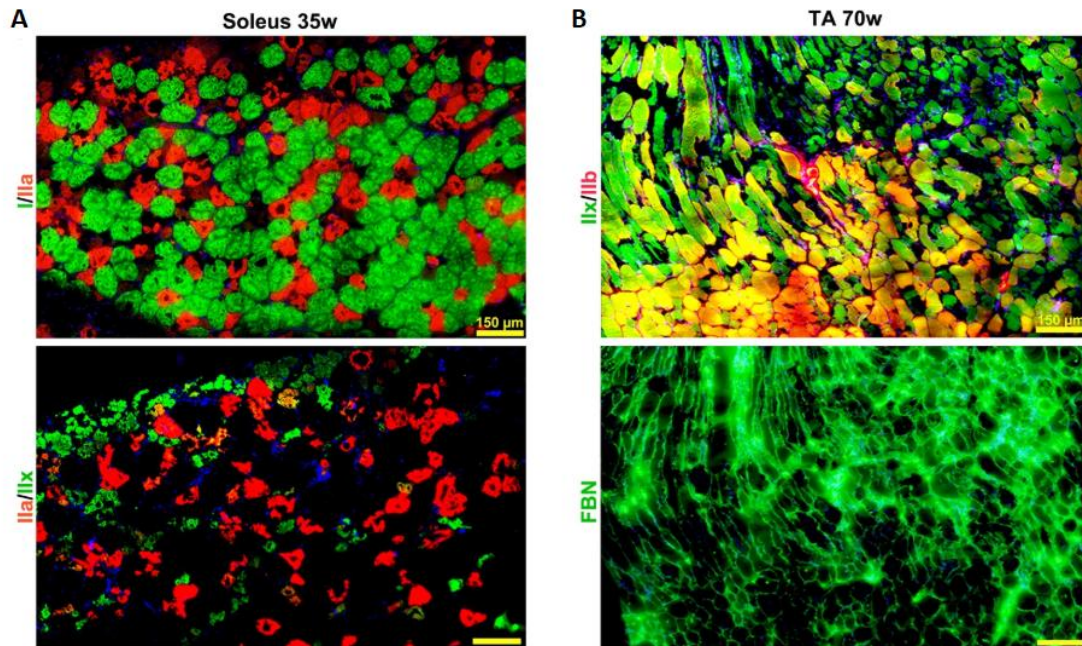


Figura 56. Imágenes representativas de la atrofia de las fibras tipo IIa y IIx de los músculos *soleus* y TA. A) Inmunofluorescencias de secciones consecutivas del músculo *soleus* de ratones McA de 35 semanas de edad incubadas para las fibras tipo I, IIa y IIx, que muestran las fibras tipo I prácticamente intactas mientras que las fibras tipo IIa y IIx presentan un elevado grado de degeneración. Todas las barras de escala corresponden a 150 μm . B) Inmunofluorescencias de secciones consecutivas del músculo TA de ratones McA de 70 semanas de edad incubadas para las fibras tipo IIx y IIb y para FBN, que muestran la presencia de fibrosis en aquellas regiones del músculo que poseen una mayor cantidad de fibras tipo IIx y no en aquellas con fibras mixtas tipo IIx/IIb. Todas las barras de escala corresponden a 150 μm . Real-Martínez, A. *et al.* (2019).^[388]

Los resultados obtenidos tanto en el estudio inmunohistológico como en la cuantificación de tamaño promedio de los distintos tipos de fibras sugieren que el tamaño de las fibras tipo I se ve menos afectado por los sucesivos procesos de degeneración/regeneración que el de las fibras tipo IIa y IIx, indicando así que estos últimos podrían ser más susceptibles a la degeneración.

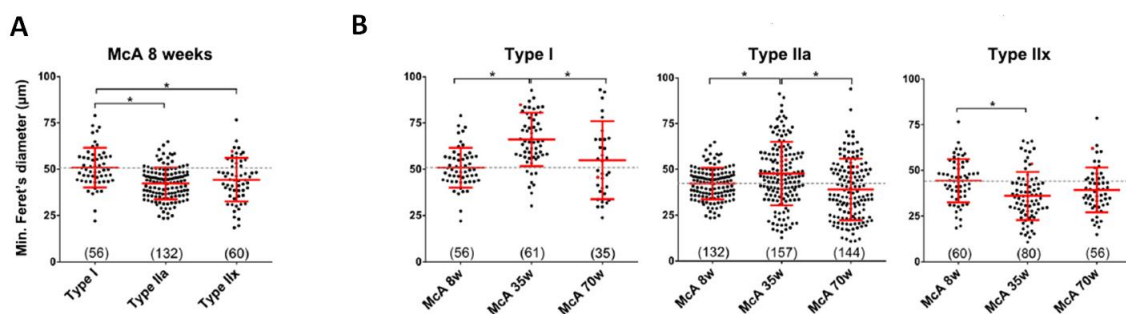


Figura 57. Gráficas que representan el aumento del tamaño promedio de las fibras tipo I y un descenso del mismo en las fibras tipo IIa y IIx en el músculo *soleus* de ratones McA de 8, 35 y 70 semanas de edad, tras la determinación del mFd. A) Tamaño promedio de las fibras tipo I, IIa y IIx en ratones McA de 8 semanas de edad. B) Evolución del tamaño promedio de las fibras tipo I, IIa y IIx en ratones McA de 8, 35 y 70 semanas de edad. Los datos están representados en un gráfico tipo *Scatter Plot*. Cada punto representa el mFd de una única fibra. La línea discontinua gris representa el promedio de los valores de los ratones McA de 8 semanas de edad. En cada grupo la media y la SD están representadas en rojo. Bajo la representación de los puntos se indica entre paréntesis el total de fibras analizadas. Para cada grupo se utilizaron entre 3 y 5 ratones. Como análisis estadístico se utilizó un test ANOVA de una vía con un análisis post-hoc con el test *Tukey Honestly Significant Difference (HSD)*. Los asteriscos representan un p valor <0,05. Real-Martínez, A. *et al.* (2019).^[388]

4.9 Diferencias de la capacidad regenerativa de los distintos tipos de fibras musculares en los músculos de los ratones McArdle

Una vez observada la susceptibilidad de las fibras tipo IIa y IIx y la aparente resistencia de las fibras tipo I y mixtas tipo IIx/IIb a los procesos de degeneración/regeneración, el siguiente paso fue realizar una cuantificación de la proporción de núcleos centrales que presentan los distintos tipos de fibras de los músculos *soleus*, EDL y TA, según avanza la enfermedad, con objeto de valorar esos niveles de susceptibilidad o resistencia. Para su determinación se realizaron inmunofluorescencias con los marcadores específicos para cada tipo de fibra muscular junto con el marcador Dapi, que tiñe específicamente los núcleos celulares (vease apartado 3.8).

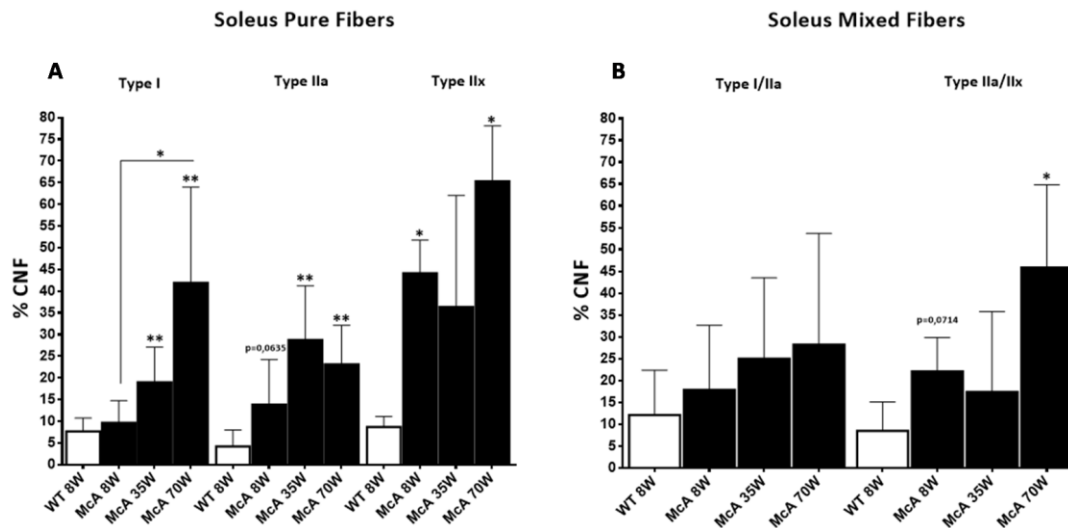


Figura 58. Estudio longitudinal de la cuantificación de NC en los tipos de fibras musculares del músculo *soleus* de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad. Cada columna representa el % medio de CNF para cada genotipo (WT en blanco y McA en negro) y grupo de edad objeto de estudio. Un número mínimo de tres ratones se utilizó para cada genotipo y grupo de edad. Las barras de error corresponden a desviación estándar (SD). El número de fibras cuantificado fue: Type I WT mín. = 19 y máx. = 288 (Mediana = 179) y McA mín. = 36 y máx. = 272 (Mediana = 148), Type IIa WT mín. = 66 y máx. = 293 (Mediana = 127) y McA mín. = 28 y máx. = 270 (Mediana = 88), Type IIx WT mín. = 0 y máx. = 50 (Mediana = 15) y McA mín. = 0 y máx. = 182 (Mediana = 22), Type I/IIa WT mín. = 0 y máx. = 137 (Mediana = 24) y McA mín. = 0 y máx. = 76 (Mediana = 9) y Type IIa/IIx WT mín. = 0 y máx. = 76 (Mediana = 15) y McA mín. = 0 y máx. = 109 (Mediana = 22). Se utilizaron los tests no paramétricos *Mann-Whitney* y *Kruskal Wallis* ANOVA de una vía con el test de comparaciones múltiples (*Dunn's test*) para su análisis estadístico. Los asteriscos representan un p valor <0,05. Los asteriscos dobles representan un p valor <0,01.

Los datos obtenidos en el *soleus* muestran una mayor proporción de NC en los ratones McA que en los WT para todos los tipos de fibras y en los tres grupos de edad objeto de estudio. Esta mayor proporción es significativa para las fibras tipo I en los grupos de 35 y 70 semanas de edad, siendo las diferencias de porcentajes con respecto a los de los WT del ≈ 11 y 34 % respectivamente; para las fibras tipo IIa en en los grupos de 35 y 70 semanas de edad, con unas diferencias respecto de los ratones WT del ≈ 25 y 19 % respectivamente; para las fibras

tipo IIx en los grupos de 8 y 70 semanas de edad con unas diferencias del ≈ 35 y 56 % respectivamente, y para las fibras tipo IIa/IIx en el grupo de 70 semanas de edad con una diferencia del ≈ 37 % (**Figs. 58 A y B**). Cabe destacar así mismo, que las fibras tipo I y tipo I/IIa de los ratones McA son las únicas que presentan un aumento progresivo de la proporción de NC con la edad, siendo especialmente significativo dicho aumento en las de tipo I, con una diferencia del ≈ 32 % entre 8 y 70 semanas de edad (**Figs. 58 A y B**).

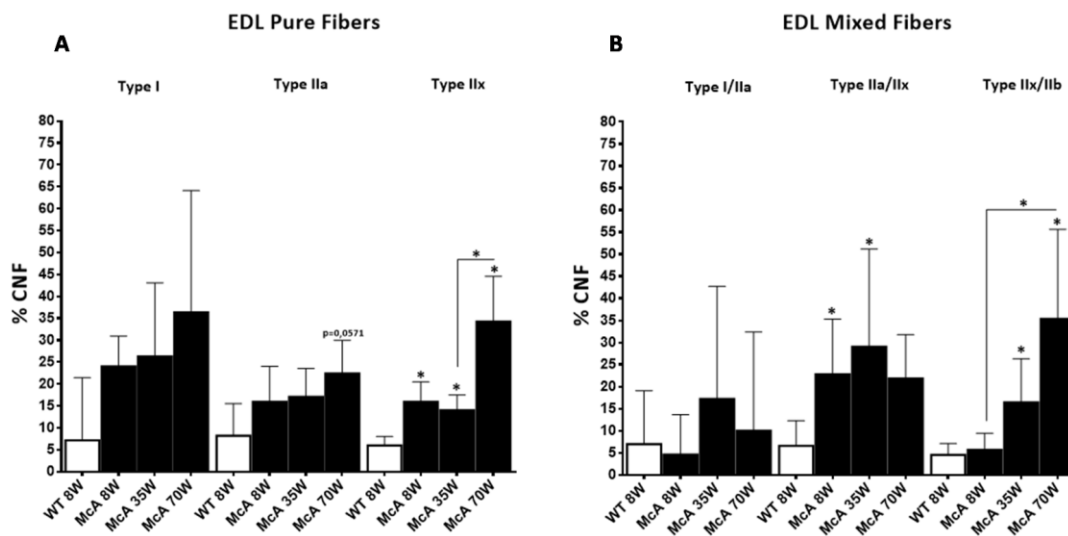


Figura 59. Estudio longitudinal de la cuantificación de NC en los tipos de fibras musculares del músculo EDL de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad. Cada columna representa el % medio de CNF para cada genotipo (WT en blanco y McA en negro) y grupos de edad objeto de estudio. Un número mínimo de tres ratones se utilizó para cada genotipo y grupo de edad. Las barras de error corresponden a desviación estándar (SD). El número de fibras cuantificado fue: Type I WT mín. = 0 y máx. = 27 (Mediana = 6) y McA mín. = 0 y máx. = 64 (Mediana = 9), Type IIa WT mín. = 19 y máx. = 123 (Mediana = 75) y McA mín. = 13 y máx. = 159 (Mediana = 64), Type IIx WT mín. = 32 y máx. = 243 (Mediana = 106) y McA mín. = 35 y máx. = 251 (Mediana = 89), Type I/IIa WT mín. = 0 y máx. = 35 (Mediana = 0) y McA mín. = 0 y máx. = 11 (Mediana = 3), Type IIa/IIx WT mín. = 5 y máx. = 54 (Mediana = 20) y McA mín. = 3 y máx. = 100 (Mediana = 40) y Type IIx/IIb WT mín. = 62 y máx. = 255 (Mediana = 154) y McA mín. = 36 y máx. = 247 (Mediana = 132). Se utilizaron los tests no paramétricos *Mann-Whitney* y *Kruskal Wallis* ANOVA de una vía con el test de comparaciones múltiples (*Dunn's test*) para su análisis estadístico. Los asteriscos representan un p valor <0,05.

Los resultados observados en el músculo EDL, muestran también una mayor proporción de NC en los ratones McA que en los WT, para todos los tipos de fibras y grupos de edad objeto de estudio. Esta diferencia llega a ser estadísticamente significativa para las fibras tipo IIx en los tres grupos de edad, con diferencias del ≈ 10 , 8 y 28 % respectivamente, en las fibras tipo IIa/IIx para 8 y 35 semanas de edad, cuyas diferencias con respecto a los WT son del ≈ 17 y 22 % respectivamente, y para las fibras tipo IIx/IIb para 35 y 70 semanas de edad, con diferencias del ≈ 11 y 30 % respectivamente (**Figs. 59 A y B**). Así mismo puede observarse un aumento progresivo de la proporción de NC para las fibras tipo I de ratones McA, como ya se observara en el *soleus*, para las fibras tipo IIa y para las fibras mixtas tipo IIx/IIb, siendo este último significativo, con una diferencia entre ratones McA de 8 y 70 semanas de edad del ≈ 29 %, si

bien es cierto que en el caso de las fibras tipo I también se observa este aumento progresivo de NC en los ratones WT (Figs. 59 A y B).

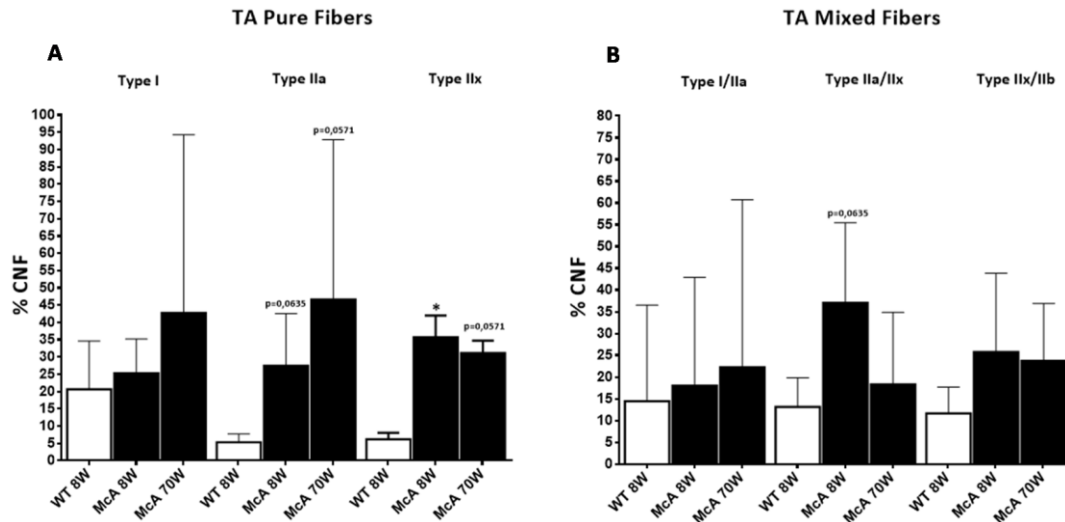


Figura 60. Estudio longitudinal de la cuantificación de NC en los tipos de fibras musculares del músculo TA de ratones WT y McA de 8 y 70 semanas de edad. Cada columna representa el % medio de CNF para cada genotipo (WT en blanco y McA en negro) y grupo de edad objeto de estudio. Un número mínimo de tres ratones se utilizó para cada genotipo y grupo de edad. Las barras de error corresponden a desviación estándar (SD). El número de fibras cuantificado fue: Type I WT mín. = 0 y máx. = 19 (Mediana = 4) y McA mín. = 1 y máx. = 32 (Mediana = 7), Type IIa WT mín. = 15 y máx. = 186 (Mediana = 27) y McA mín. = 2 y máx. = 161 (Mediana = 25), Type IIx WT mín. = 30 y máx. = 380 (Mediana = 157) y McA mín. = 72 y máx. = 208 (Mediana = 136), Type I/IIa WT mín. = 0 y máx. = 9 (Mediana = 0) y McA mín. = 0 y máx. = 10 (Mediana = 1), Type IIa/IIx WT mín. = 7 y máx. = 136 (Mediana = 29) y McA mín. = 2 y máx. = 107 (Mediana = 38) y Type IIx/IIb WT mín. = 76 y máx. = 297 (Mediana = 197) y McA mín. = 109 y máx. = 434 (Mediana = 209). Se utilizó el test no paramétrico *Mann-Whitney* para su análisis estadístico. Los asteriscos representan un p valor <0,05.

Finalmente, los resultados de la cuantificación de NC por tipo de fibra en el músculo TA en los grupos de edad de 8 y 70 semanas, muestran en general una mayor proporción de los mismos en los ratones McA que en los WT, en todos los tipos de fibras y grupos de edad estudiados (Figs. 60 A y B). Esta mayor proporción de NC observada en ratones McA es estadísticamente significativa para las fibras tipo IIx a las 8 semanas de edad, con una diferencia del $\approx 30\%$ respecto de los WT (Figs. 60 A). En relación con la evolución de la enfermedad en el músculo TA, cabe decir que sí se observa en los ratones McA un relativo aumento progresivo de núcleos centrales en las fibras tipo I, IIa y mixtas tipo I/IIa (Figs. 60 A y B). Comparando ahora la evolución de la enfermedad en los distintos tipos de fibras de los músculos objeto de estudio, los resultados obtenidos indicarían que en el *soleus* serían las fibras tipo I las que presentarían una mayor resistencia frente al daño producido por la progresión de la enfermedad mientras que en el músculo EDL serían las fibras mixtas tipo IIx/IIb las que desempeñarían esta función protectora.

Posteriormente, con el marcador específico MHCe, que como se ha descrito previamente es expresado por aquellas fibras que se encuentran en un proceso de regeneración activo ^[20], se realizó un estudio histológico y cuantitativo mediante inmunofluorescencia, para comprobar si la mayor afectación observada en las fibras tipo IIa, IIx y mixtas de ambos tipos coincidía con un marcaje positivo para dicho marcador, reforzando así la idea de que dichas fibras son, efectivamente, las más dañadas en el transcurso de la enfermedad de McArdle.

Las muestras utilizadas para dicho estudio histológico procedían de los músculos *soleus* y TA de ratones McA de todos los grupos de edad, 8, 35 y 70 semanas, y las utilizadas para la cuantificación, de los músculos *soleus*, TA y QUAD de ratones McA de 8 y 70 semanas edad. La elección de estos músculos se basó en los resultados previamente obtenidos y ya descritos, en los que se constató que los músculos más dañados eran el *soleus* y el TA (**apartado 4.6 y Fig. 51**) y que histológicamente las fibras más dañadas eran las tipo IIa, IIx y mixtas de ambos tipos en estos mismos músculos (**apartado 4.8 Figs. 55, 56 y 57**). Así mismo, para la cuantificación de fibras positivas para MHCe se utilizó el músculo QUAD como referencia de músculo menos afectado por el transcurso de la enfermedad (**apartados 4.6 y 4.7 Figs. 51 y 54**).

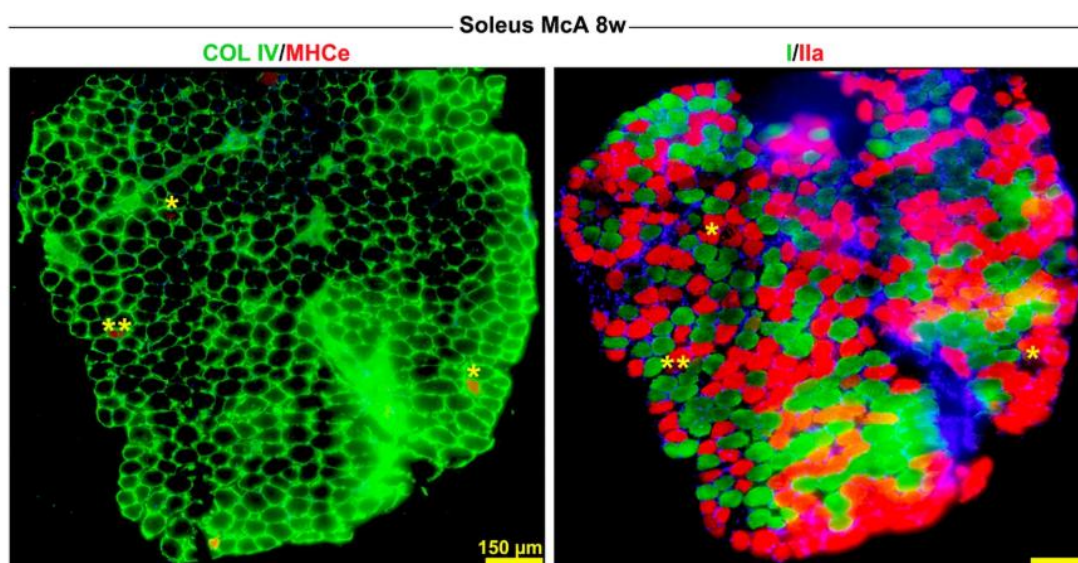


Figura 61. Tinciones inmunofluorescentes de la co-localización del marcador MHCe con fibras tipo IIa en cortes consecutivos del músculo *soleus* de ratones McA de 8 semanas de edad. Izquierda: Tinción inmunofluorescente para los marcadores MHCe (rojo) y COL IV (verde). Derecha: Tinción inmunofluorescente para los marcadores MHC I (verde) y MHC IIa (rojo). Las barras de escala corresponden a 150 µm. Los asteriscos amarillos marcan fibras idénticas en ambas secciones. Real-Martínez, A. *et al.* (2019).^[388]

El análisis histológico muestra que tanto en el *soleus* de ratones McA de 8 y 35 semanas como en el TA de ratones McA de 70 semanas de edad, el marcaje de MHCe co-localiza únicamente con las fibras musculares de los tipos IIa, IIx y mixtas IIa/IIx, no siendo así con las fibras tipo I, en el caso del *soleus*, ni con las mixtas tipo IIx/IIb en el caso del TA (**Figs. 61 y 62**).

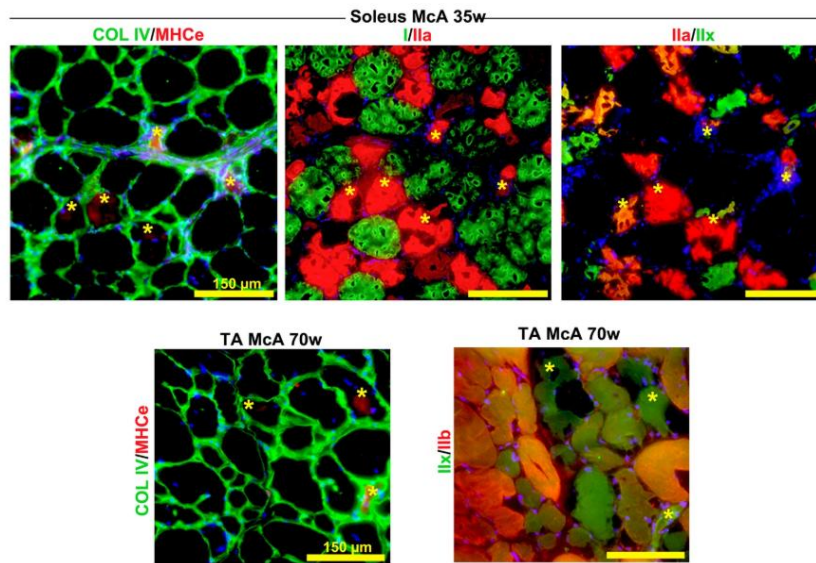


Figura 62. Tinciones inmunofluorescentes de la co-localización del marcador MHCe con fibras tipo IIa y IIx en cortes consecutivos de los músculos *soleus* y TA de ratones McA de 35 y 70 semanas de edad respectivamente. Arriba y abajo izquierda: Tinciones inmunofluorescentes para los marcadores MHCe (rojo) y COL IV (verde). Arriba centro: Tinción inmunofluorescente para los marcadores MHC I (verde) y MHC IIa (rojo). Arriba y abajo derecha: Tinciones inmunofluorescentes para los marcadores MHC IIx (verde) y MHC IIa (rojo) y para MHC IIx (verde) y MHC IIb (rojo), respectivamente. Todas las barras de escala corresponden a 150 μm . Los asteriscos amarillos marcan fibras idénticas entre secciones. Real-Martínez, A. *et al.* (2019).^[388]

Por otra parte, en la cuantificación de la proporción de fibras musculares positivas para el marcador MHCe en los tres músculos objeto de estudio, *soleus*, TA y QUAD, se observa que existe una tendencia al descenso de la proporción de fibras positivas según avanza la enfermedad (Fig. 63).

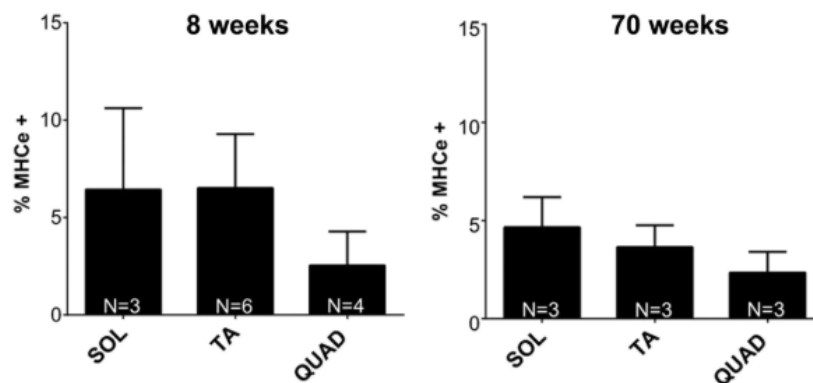


Figura 63. Estudio cuantitativo del % de fibras musculares positivas para el marcador MHCe en los músculos *soleus*, TA y QUAD de ratones McA de 8 y 70 semanas de edad. Cada columna representa el % medio de fibras positivas para el marcador MHCe en los grupos de edad objeto de estudio. Un número mínimo de tres ratones se utilizó para cada genotipo y grupo de edad. El número total de ratones utilizados se indica en la parte inferior de las columnas. En cada columna se contaron entre 619 (mínimo) y 2.250 (máximo) fibras, con un promedio de 1.462 fibras. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (SD). Se utilizó el test no paramétrico *Kruskal Wallis* ANOVA de una vía con el test de comparaciones múltiples (*Dunn's test*) para su análisis estadístico. Real-Martínez, A. *et al.* (2019).^[388]

Los resultados obtenidos indicarían que las fibras tipo IIa, IIx y mixtas tipo IIa/IIx se ven afectadas por la enfermedad con mayor frecuencia que las fibras tipo I y mixtas tipo IIx/IIb, necesitando que los procesos de regeneración sean más activos en ellas, así como que la afectación de este tipo de fibras es independiente de las características metabólicas del músculo al que pertenezcan.

Así mismo, los datos cuantitativos obtenidos de los procesos de regeneración activos según avanza la enfermedad, nos sugieren que la capacidad de los distintos músculos para hacer frente a la degeneración progresiva que ésta provoca, se ve disminuida con la edad.

4.10 Incremento de las proporciones de los tipos de fibras I y IIb y descenso de la de fibras tipo IIa con la edad en los músculos de ratones

McArdle

Teniendo en cuenta los resultados previos en los que observamos un diferente grado de afectación de los distintos músculos estudiados y entre los distintos tipos de fibras musculares con la progresión de la enfermedad, nos planteamos a continuación si el distinto grado de afectación de las fibras pudiera alterar la proporción de éstas en los distintos músculos estudiados.

Para dar respuesta a esta pregunta, seguidamente se realizó un estudio cuantitativo longitudinal de la proporción de los distintos tipos de fibras presentes en los músculos *soleus*, EDL y TA de ratones WT y McA, de los tres grupos de edad, 8, 35 y 70 semanas, salvo en el TA, que no ha sido estudiado para el grupo de 35 semanas de edad.

En el *soleus*, los resultados muestran tanto en ratones WT como McA una tendencia al incremento de la proporción de fibras tipo I entre los de 8 y 70 semanas de edad con unas diferencias del ≈ 17 y 7 % respectivamente, así como de las fibras tipo IIx, en el caso de ratones McA (**Fig. 64 A**), existiendo así mismo en este tipo de fibras, diferencias significativas de su proporción, del ≈ 8 %, entre ratones WT y McA para el grupo de 70 semanas de edad (**Fig. 64 A**).

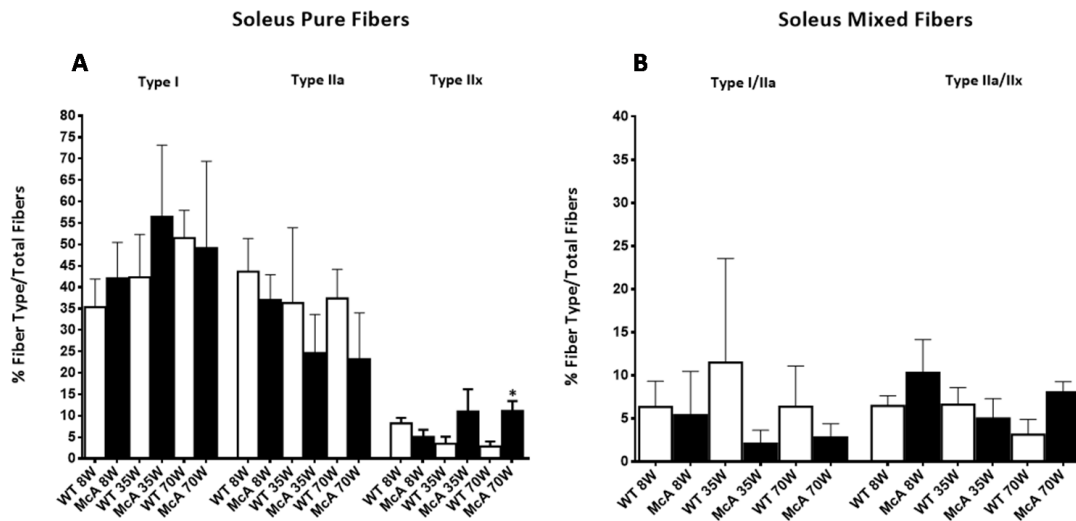


Figura 64. Estudio cuantitativo longitudinal de la proporción de los distintos tipos de fibras musculares en el músculo *soleus* de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad. Cada columna representa el % medio de cada tipo de fibra para cada genotipo y grupo de edad. Las barras de error corresponden a SD El número de fibras cuantificado fue: Type I WT mín. = 76 y máx. = 288 (Mediana = 184) y McA mín. = 36 y máx. = 272 (Mediana = 148), Type IIa WT mín. = 66 y máx. = 293 (Mediana = 127) y McA mín. = 28 y máx. = 270 (Mediana = 88), Type IIx WT mín. = 0 y máx. = 50 (Mediana = 15) y McA mín. = 0 y máx. = 182 (Mediana = 22), Type I/IIa WT mín. = 0 y máx. = 137 (Mediana = 26) y McA mín. = 0 y máx. = 76 (Mediana = 9) y Type IIa/IIx WT mín. = 0 y máx. = 76 (Mediana = 19) y McA mín. = 0 y máx. = 109 (Mediana = 22). Se utilizaron los tests no paramétricos *Mann-Whitney* y *Kruskal Wallis* ANOVA de una vía con el test de comparaciones múltiples (*Dunn's test*) para su análisis estadístico. Los asteriscos representan un p valor <0,05.

En estos resultados también se observa una tendencia al descenso progresivo de la proporción de fibras tipo IIa en los ratones McA (**Fig. 64 A**), así mismo, éstos tienen tendencia a presentar menor proporción de fibras tipo IIa que los WT, en los tres grupos de edad objeto de estudio (**Fig. 64 A**). Finalmente, en los resultados obtenidos para las fibras mixtas del *soleus*, no existen diferencias reseñables en ninguno de los genotipos para los grupos de edad estudiados (**Fig. 64 B**).

En el caso del músculo EDL, los datos obtenidos muestran en ambos genotipos una tendencia al aumento progresivo de la proporción de fibras tipo I con la edad, que resulta significativo entre ratones WT de 35 y 70 semanas de edad. Así mismo, se observa un perfil similar en la evolución de las fibras tipo IIa tanto en ratones WT como en McA, con un aumento de las mismas para ambos genotipos entre las 8 y las 35 semanas, siendo este aumento significativo, $\approx 9\%$, en los ratones WT, y una tendencia al descenso de este tipo de fibras en ambos genotipos entre las 35 y las 70 semanas, siendo éste más acusado en los ratones McA (**Fig. 65 A**). Las proporciones del resto de fibras analizadas, IIx, I/IIa, IIa/IIx y IIx/IIb, no presentan diferencias entre genotipos y grupos de edad (**Fig. 65 A y B**).

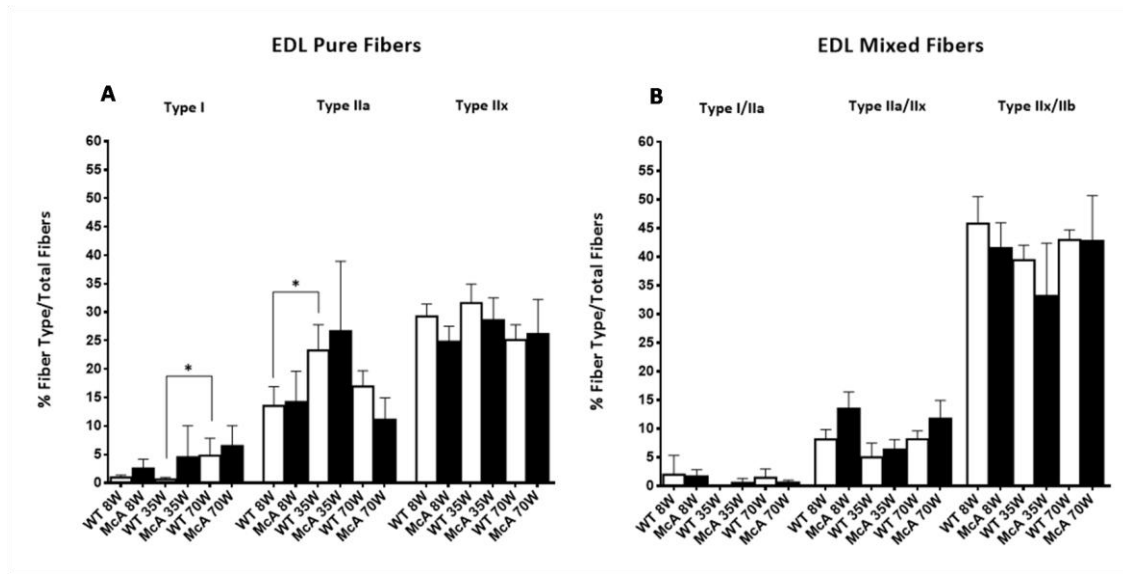


Figura 65. Estudio cuantitativo longitudinal de la proporción de los distintos tipos de fibras musculares en el músculo EDL de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad. Cada columna representa el % medio de cada tipo de fibra para cada genotipo y grupo de edad. Las barras de error corresponden a SD. El número de fibras cuantificadas fue: Type I WT mín. = 0 y máx. = 27 (Mediana = 5) y McA mín. = 0 y máx. = 64 (Mediana = 10), Type IIa WT mín. = 19 y máx. = 123 (Mediana = 75) y McA mín. = 13 y máx. = 159 (Mediana = 64), Type IIx WT mín. = 32 y máx. = 243 (Mediana = 106) y McA mín. = 35 y máx. = 251 (Mediana = 89), Type I/IIa WT mín. = 0 y máx. = 35 (Mediana = 1) y McA mín. = 0 y máx. = 11 (Mediana = 3), Type IIa/IIx WT mín. = 5 y máx. = 54 (Mediana = 20) y McA mín. = 3 y máx. = 100 (Mediana = 36) y Type IIx/IIb WT mín. = 62 y máx. = 255 (Mediana = 154) y McA mín. = 36 y máx. = 247 (Mediana = 132). Se utilizaron los tests no paramétricos *Mann-Whitney* y *Kruskal Wallis* ANOVA de una vía con el test de comparaciones múltiples (*Dunn's test*) para su análisis estadístico. Los asteriscos representan un p valor <0,05.

Por último, los resultados obtenidos en el estudio del músculo TA revelan para las fibras tipo IIa una tendencia a disminuir su proporción entre los grupos de 8 y 70 semanas de edad de ambos genotipos (Fig. 66 A). Igualmente, se observa también una disminución significativa ($\approx 8\%$) de la proporción de fibras mixtas tipo IIa/IIx en los ratones WT de 70 semanas de edad respecto de los de 8 (Fig. 66 B). Por otra parte, los resultados muestran que tanto los ratones McA como los WT presentan una tendencia al incremento de la proporción de fibras mixtas tipo IIx/IIb con la edad y que son los ratones McA los que tienden a presentar mayor proporción de este tipo de fibras para cada grupo de edad (Fig. 66 B).

Los datos obtenidos en esta cuantificación longitudinal de la proporción de los distintos tipos de fibras nos sugieren que en términos generales, no parece existir una gran diferencia en los tipos de fibras dominantes en los distintos músculos objeto de estudio, pero sí que indicarían ciertas preferencias de cada músculo por algunos tipos de fibras cuya proporción cambia con el transcurso de la enfermedad de McArdle. Así, en el caso del *soleus* los datos sugieren un incremento de la proporción de las fibras tipo I mientras que las fibras tipo IIa y I/IIa ven reducida su proporción en los ratones donde la enfermedad está más avanzada.

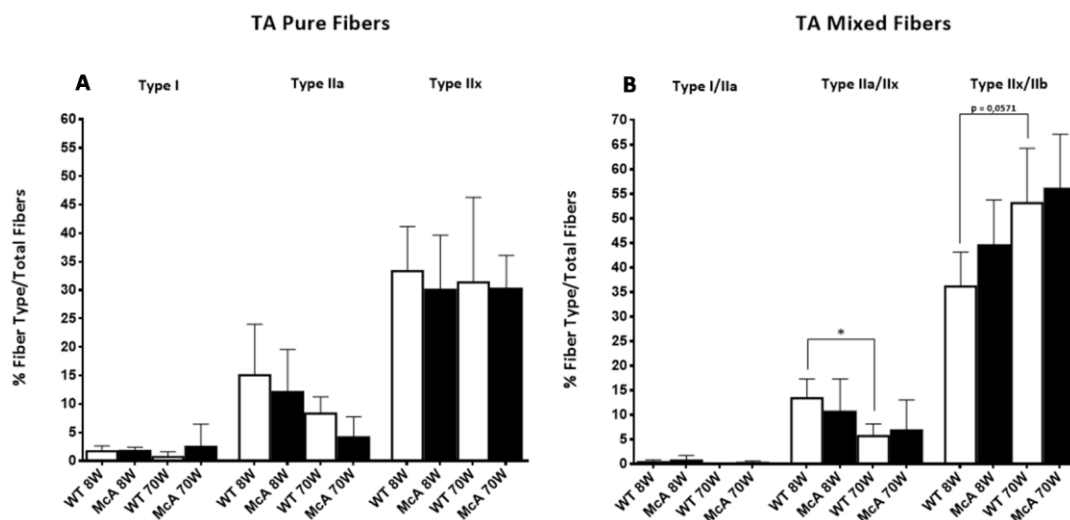


Figura 66. Estudio cuantitativo longitudinal de la proporción de los distintos tipos de fibras musculares en el músculo TA de ratones WT y McA de 8 y 70 semanas de edad. Cada columna representa el % medio de cada tipo de fibra para cada genotipo y grupo de edad. Las barras de error corresponden a SD. El número de fibras cuantificado fue: Type I WT mín. = 0 y máx. = 19 (Mediana = 5) y McA mín. = 1 y máx. = 32 (Mediana = 7), Type IIa WT mín. = 15 y máx. = 186 (Mediana = 27) y McA mín. = 2 y máx. = 161 (Mediana = 25), Type IIx WT mín. = 30 y máx. = 380 (Mediana = 157) y McA mín. = 72 y máx. = 208 (Mediana = 136), Type I/IIa WT mín. = 0 y máx. = 9 (Mediana = 0) y McA mín. = 0 y máx. = 10 (Mediana = 1), Type IIa/IIx WT mín. = 7 y máx. = 136 (Mediana = 29) y McA mín. = 2 y máx. = 107 (Mediana = 38) y Type IIx/IIb WT mín. = 76 y máx. = 297 (Mediana = 197) y McA mín. = 109 y máx. = 434 (Mediana = 209). Se utilizó el test no paramétrico *Mann-Whitney* para su análisis estadístico. Los asteriscos representan un p valor <0,05.

Finalmente, los datos del TA sugieren un incremento de la proporción de fibras mixtas tipo IIx/IIb y un descenso, como también se ha observado en los otros dos músculos estudiados, de la proporción de fibras tipo IIa según avanza la enfermedad.

4.11 Incremento de la proporción de fibras glucolíticas con la edad en el músculo soleus de los ratones McArdle

Una vez obtenida la proporción de los distintos tipos de fibras musculares presentes en el soleus, EDL y TA y puesto de manifiesto el cambio que sufren algunas de estas proporciones según avanza la enfermedad, se planteó la posibilidad de que esas diferencias propiciasen un cambio en el metabolismo de esos músculos con el avance de la misma.

Para el nuevo estudio se realizó una cuantificación longitudinal de la proporción de fibras oxidativas y glucolíticas en los músculos soleus, EDL y TA, de ratones WT y McA, de 8, 35 y 70 semanas de edad. Para ello se agruparon las fibras tipo I, IIa y I/IIa en oxidativas y las fibras tipo IIx, IIa/IIx, IIx/IIb y IIb en glucolíticas.

Los resultados de esta cuantificación en el soleus muestran una evolución del metabolismo distinta en ratones WT y McA, mientras que los ratones WT van presentando proporcionalmente con la edad, una mayor cantidad de fibras oxidativas y por tanto, menor

cantidad de fibras glucolíticas, los ratones McA expresan con la edad una mayor proporción de fibras de metabolismo más glucolítico (**Fig. 67 A**). De las diferencias encontradas resultan estadísticamente significativas tanto el descenso en su proporción que sufren las fibras de metabolismo glucolítico en los ratones WT entre las 8 y 70 semanas de edad como la mayor proporción de fibras de metabolismo glucolítico que presentan los ratones McA respecto de los WT en el grupo de 70 semanas de edad (**Fig. 67 A**). En la cuantificación realizada en los músculos EDL y TA, como en los resultados obtenidos en el *soleus*, también se observa una tendencia en los ratones McA a presentar mayor proporción de fibras de metabolismo glucolítico que los WT, en el grupo de 70 semanas de edad (**Fig. 67 B y C**).

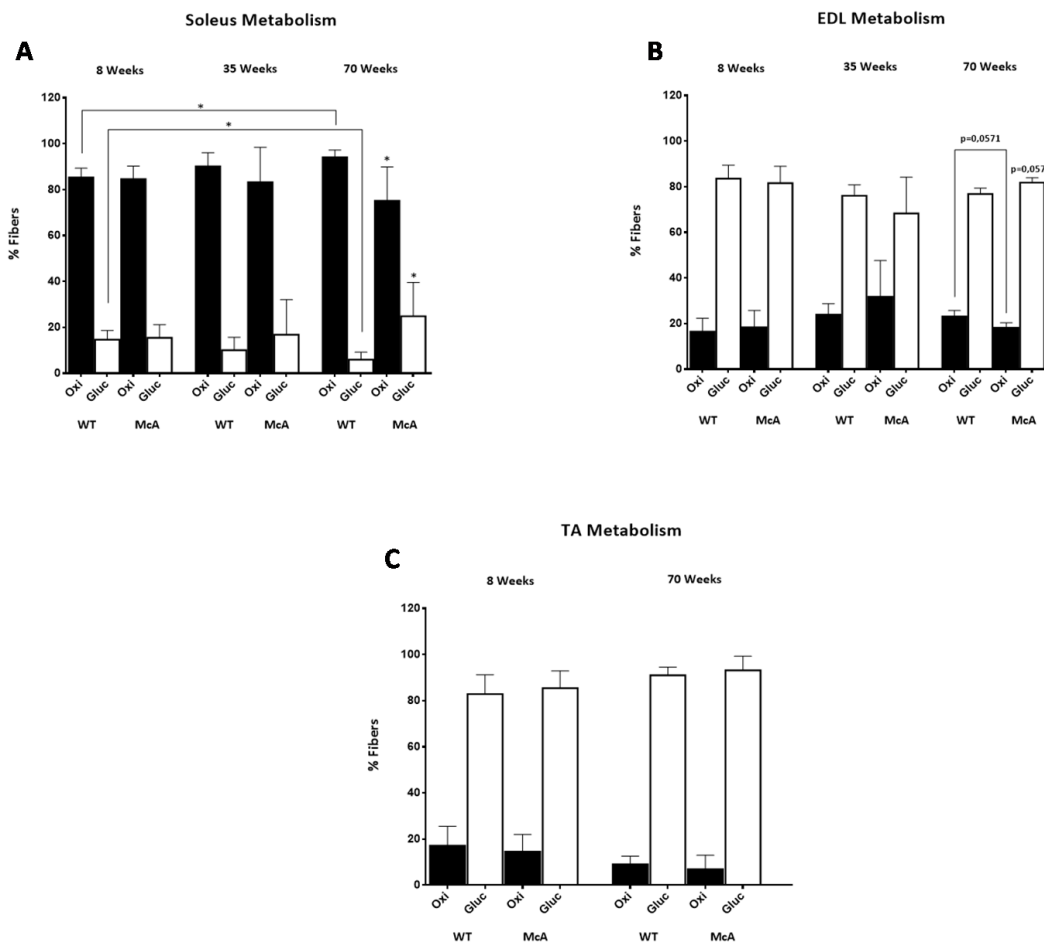


Figura 67. Estudio cuantitativo longitudinal de la proporción de fibras musculares oxidativas y glucolíticas en los músculos *soleus*, EDL y TA de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad. Cada columna representa el % medio de cada tipo metabólico de fibra para cada genotipo y grupo de edad. Para el músculo *soleus* se ha cuantificado una N de entre 4-5 ratones para cada genotipo y grupo de edad con un número de fibras mín. = 933 y máx. = 2.283 en ambas categorías metabólicas (Media = 1.628 y SD = 500,8). En el músculo EDL se ha cuantificado una N de entre 4-5 ratones para cada genotipo y grupo de edad con un número de fibras mín. = 1.222 y máx. = 1.872 en ambas categorías metabólicas (Media = 1.536 y SD = 259). Para el músculo TA se ha cuantificado una N de entre 3-5 ratones para cada genotipo y grupo de edad con un número de fibras mín. = 1.195 y máx. = 2.642 en ambas categorías metabólicas (Media = 1.877 SD = 671,65). Las barras de error corresponden a SD. Se utilizaron los tests no paramétricos *Mann-Whitney* y *Kruskal Wallis* ANOVA de una vía con el test de comparaciones múltiples (*Dunn's test*) para su análisis estadístico. Los asteriscos representan un p valor <0,05.

Los resultados de este estudio sugieren que en el caso del *soleus*, el cambio que se aprecia en la proporción de fibras de tipo oxidativas y glucolíticas con la edad, es únicamente explicable por la enfermedad de McArdle, mientras que en los otros dos músculos estudiados no parece haber ningún tipo de transición metabólica en sus fibras debida a esta patología.

4.12 Ausencia de acumulación progresiva de glucógeno en los músculos de los ratones McArdle

A continuación, para comprobar si la degeneración que se observa en las fibras musculares tipo IIa, IIx y mixtas tipo IIa/IIx de ratones McA según avanza la enfermedad, se debe a la progresiva acumulación de glucógeno muscular, se realizó un estudio histológico mediante tinción PAS en los músculos *soleus*, EDL, TA, GAST y QUAD de ratones McA de 8, 35 y 70 semanas de edad y la cuantificación bioquímica en los músculos TA, GAST y QUAD de ratones McA de 8 y 70 semanas de edad.

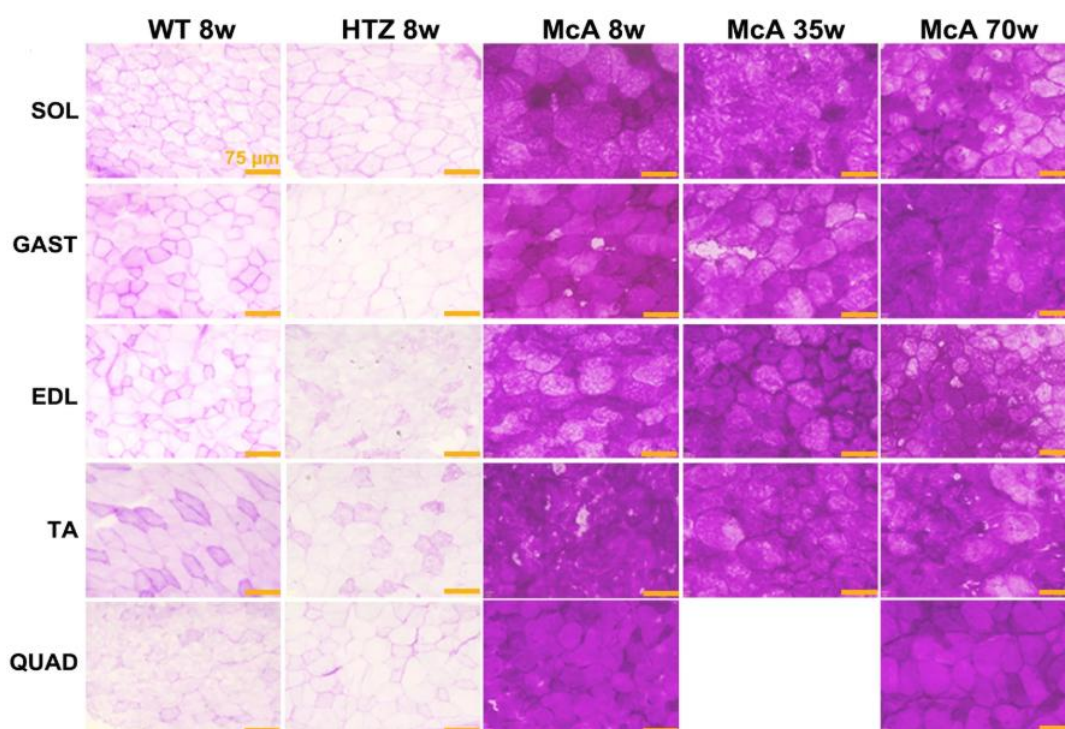


Figura 68. Imágenes de la caracterización histológica longitudinal de la acumulación de glucógeno en ratones McA. Tinciones PAS de los músculos *soleus*, GAST, EDL, TA y QUAD de ratones WT y HTZ de 8 semanas de edad y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad. Todas las barras de escala se corresponden con 75 µm. Real-Martínez, A. *et al.* (2019).^[388]

En el estudio histológico se observa que los niveles de glucógeno de los ratones McA de todas las edades son muy elevados con respecto a los de los ratones WT y HTZ (Fig. 68). Por otra parte, la cuantificación bioquímica de glucógeno revela mayor acumulación de glucógeno en los ratones McA que en los WT, tanto a 8 como a 70 semanas de edad, diendo las diferencias

significativas en todos los músculos y grupos de edad. Así mismo, si comparamos entre sí los niveles de glucógeno de los ratones McA de 8 y 70 semanas de edad, podemos observar que apenas difieren e incluso presentan una tendencia a descender con la edad, como en el caso del músculo TA (**Fig. 69**), por lo que sugieren que el aumento de la degeneración de las fibras musculares con la progresión de la enfermedad no es debido a una acumulación progresiva de glucógeno.

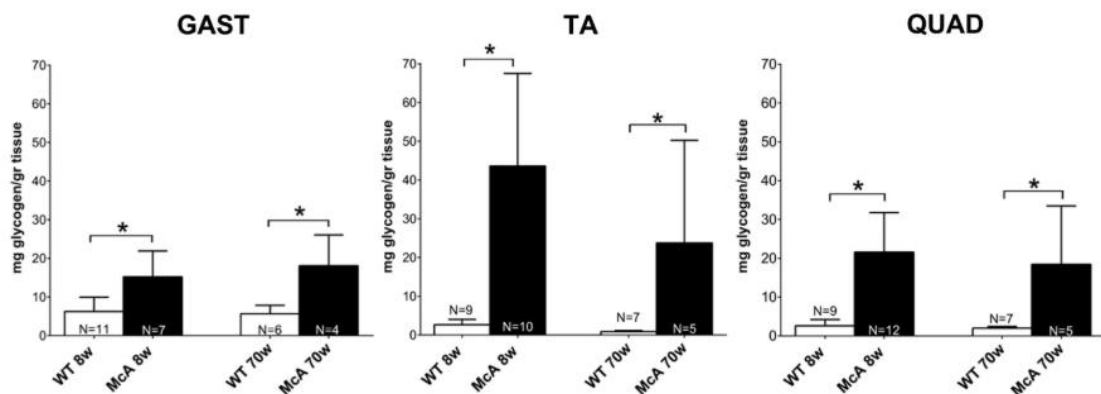


Figura 69. Gráficas que representan la cuantificación bioquímica de la acumulación de glucógeno en los músculos GAST, TA y QUAD de ratones WT y McA de 8 y 70 semanas de edad. Cada columna representa el glucógeno acumulado en ratones WT (blanco) y McA (negro). El número de ratones utilizado para la cuantificación se indica en la parte inferior de cada columna. Las barras de error corresponden a SD. Para el análisis estadístico se utilizó el test no paramétrico *Mann-Whitney*. Los asteriscos representan un p valor <0,05. Real-Martínez, A. et al. (2019).^[388]

Posteriormente analizamos si esa falta de acumulación progresiva de glucógeno en los ratones McA era consecuencia de cambios de la expresión y/o actividad de la enzima glucógeno sintasa (GS) o de la expresión de las diferentes isoformas de la glucógeno fosforilasa, estudiando para ello los músculos GAST y TA de ratones McA de 8, 35 y 70 semanas de edad (**Fig. 70**).

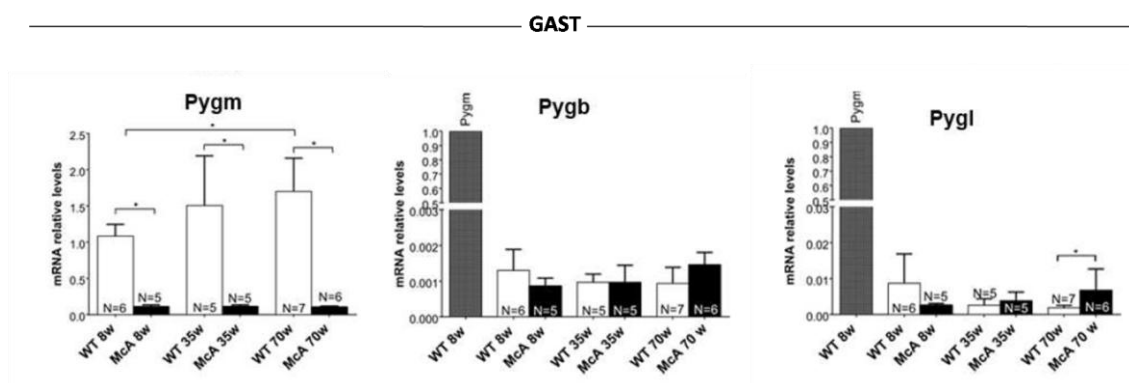


Figura 70. Gráficas que representan el análisis longitudinal de una PCR cuantitativa de las diferentes isoformas de la enzima GP en el músculo GAST de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad. El número de ratones utilizado para la cuantificación se indica en la parte inferior de cada columna. Las barras de error corresponden a SD. Para el análisis estadístico se utilizaron los tests no paramétricos *Mann-Whitney* y *Kruskal Wallis ANOVA* de una vía con el test de comparaciones múltiples (*Dunn's test*). Los asteriscos representan un p valor <0,05. Real-Martínez, A. et al. (2019).^[388]

El análisis cuantitativo de las distintas isoformas de la glucógeno fosforilasa muestra que en el GAST no existen diferencias entre los niveles de mRNA de *Pygm*, *Pygb* y *Pygl* de los ratones McA de 8 y 70 semanas de edad, así como la ausencia total de la proteína GP-M en los músculos GAST y TA de los ratones McA de los tres grupos de edad analizados (Figs. 70 y 71).

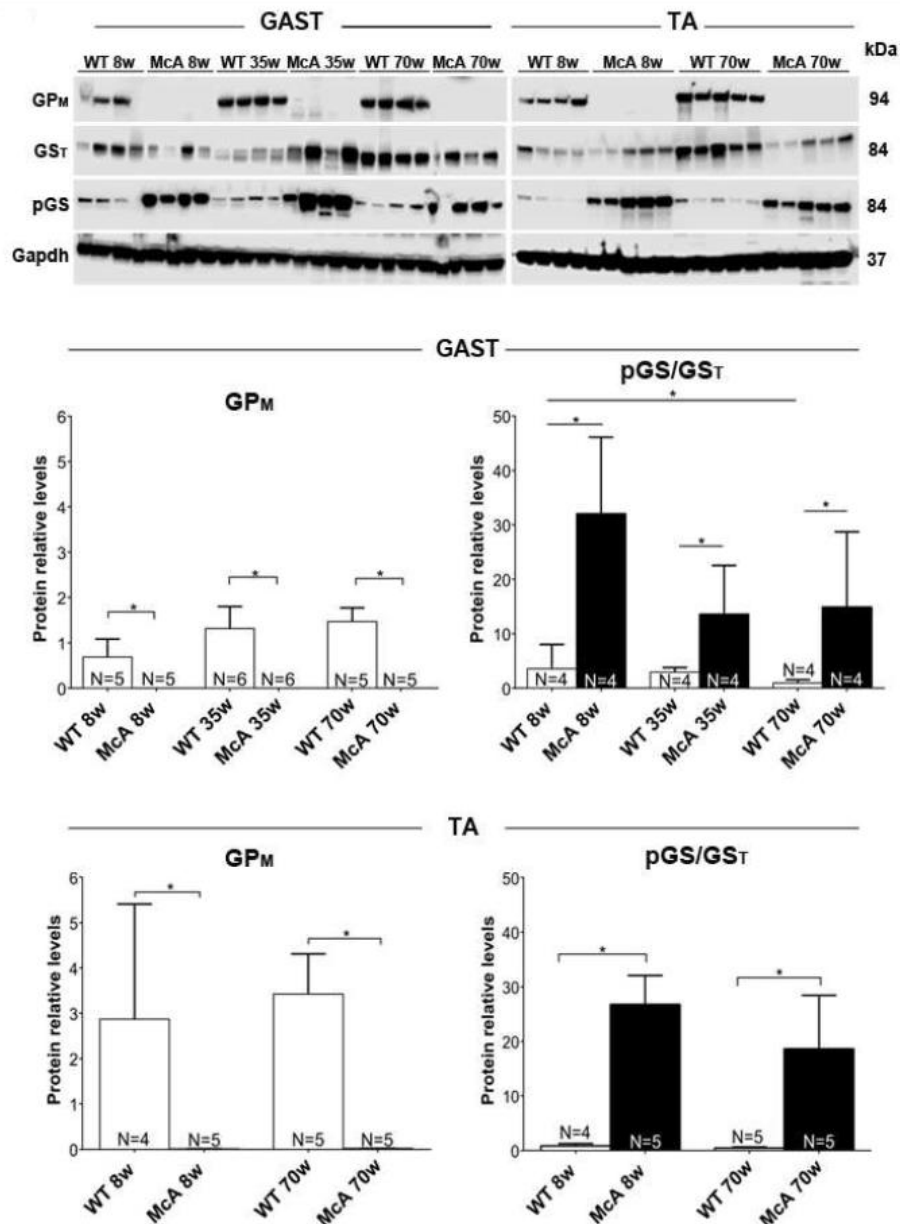


Figura 71. Análisis de las proteínas GP_{Mt} total, GS_T y p-GS Ser 641 mediante *western blot* en los músculos GAST y TA de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas y de 8 y 70 semanas de edad, respectivamente. Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH. Las imágenes de los *westerns* se obtuvieron mediante películas *Fujifilm LAS 3000 imager*. Se muestran imágenes recortadas. Los resultados de las cuantificaciones relativas para la proteína GP_{Mt} provienen del cociente GP_{Mt}/GAPDH previa cuantificación mediante el programa *Image J*, así como los resultados de la cuantificación relativa de la forma inactiva de la proteína GS. Estos resultados provienen del cociente p-GS/GS_T previa cuantificación mediante el programa *Image J*. El número de ratones utilizado para la cuantificación se indica en la parte inferior de cada columna. Las barras de error corresponden a SD. Para el análisis estadístico se utilizaron los tests no paramétricos *Mann-Whitney* y *Kruskal Wallis* ANOVA de una vía con el test de comparaciones múltiples (*Dunn's test*). Los asteriscos representan un p valor <0,05. Real-Martínez, A. *et al.* (2019).^[388]

No obstante lo anterior, sí que se observan mayores niveles de la forma pGS y por tanto, de la inactivación de la enzima GS, en ratones McA que en los WT, tanto en GAST como en TA y en todos los grupos de edad objeto de estudio, si bien esa inactivación de la GS va disminuyendo según avanza la enfermedad (**Fig. 71**).

Por último, para determinar si la ausencia de acumulación progresiva de glucógeno es causada por el incremento de su degradación vía lisosomal, se compararon los niveles de proteína de la enzima GAA en el músculo GAST de ratones WT y McA de 70 semanas de edad, no mostrando el resultado diferencias significativas aunque sí una ligera tendencia en los ratones McA a presentar mayores niveles de esta enzima que los WT y por tanto, mayor degradación por esta vía (**Fig. 72**).

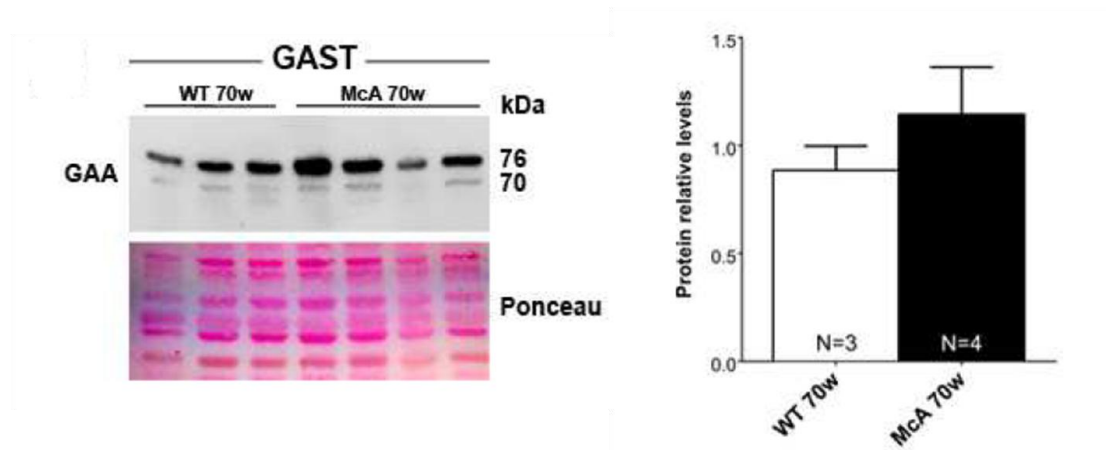


Figura 72. Análisis de la proteína GAA mediante *western blot* en el músculo GAST de ratones WT y McA de 70 semanas de edad. Las imágenes de los *westerns* se detectaron mediante *Odyssey Fc* y se cuantificaron mediante el programa *Image Studio Software 5.x*. Se muestran imágenes recortadas. Los resultados de las cuantificaciones relativas para la proteína GAA provienen del cociente GAA/Ponceau previa cuantificación mediante el programa *Image J*. El número de ratones utilizado para la cuantificación se indica en la parte inferior de cada columna. Las barras de error corresponden a SD. Para el análisis estadístico se utilizó el test no paramétrico *Mann-Whitney*. Real-Martínez, A. *et al.* (2019).^[388]

Los resultados de este estudio sugieren que no se produce un incremento de los niveles de glucógeno en las fibras musculares de los ratones McA según avanza la enfermedad, como muestran los datos obtenidos en los músculos GAST, QUAD y TA. Así mismo, estos resultados indicarían que no se está produciendo un incremento de la síntesis de glucógeno, ya que la forma inactiva de la enzima GS presenta un incremento de sus niveles proteicos, ni tampoco un aumento de la degradación del glucógeno vía lisosomal, porque no parecen ser significativos los mayores niveles proteicos de la enzima GAA, hecho que justificaría la ausencia de dicha acumulación.

4.13 La mayor afectación observada en las fibras musculares tipo IIa de los ratones McArdle se correlaciona a nivel histológico con una mayor acumulación de glucógeno en ellas

Una vez observada la falta de acumulación progresiva de glucógeno en el tejido muscular de ratones McA, nos planteamos si el grado de afectación observado previamente en los distintos tipos de fibras de estos ratones está correlacionado con una mayor acumulación de glucógeno en ellas, así como si existen diferencias en dicha acumulación de glucógeno entre las fibras oxidativas tipo I y IIa, dada la gran diferencia que éstas presentan en su grado de afectación. Con este objetivo se realizó un estudio histológico en cortes consecutivos de los músculos GAST, EDL y *soleus* de ratones WT y McA, mediante tinción PAS, tinción con succinato deshidrogenasa (SDH) y marcadores inmunofluorescentes de los principales tipos de fibras (I, IIa, IIx y IIb) tal y como se describe en el **apartado 3.8**. En este sentido, se utilizó la tinción con SDH, ya que esta enzima se ubica en la membrana interna mitocondrial e interviene en el ciclo de Krebs y la cadena transportadora de electrones^[390] y, por tanto, será especialmente reconocible en aquellas fibras con una mayor presencia de mitocondrias^[391], como es el caso de las fibras tipo I y IIa^[47].

Los resultados de este estudio, según puede observarse en la **figura 73**, revelan que en los tres músculos estudiados en ratones McA, las fibras oxidativas tipo IIa en las inmunofluorescencias con sus marcadores específicos presentan una gran afectación, con agujeros, pérdida de estructura e incluso de tamaño, como hemos ido reflejando en estudios previos (**Fig. 73 A**). Sin embargo, las fibras tipo I, también oxidativas, mantienen en general su estructura y tamaño y no se ven especialmente afectadas en los ratones McA con respecto a los WT (**Fig. 73 A**).

Por otra parte, si observamos la tinción PAS, es reseñable la existencia de una desigual acumulación de glucógeno en las fibras de los ratones McA no observable en los WT, existiendo fibras que acumulan grandes cantidades de glucógeno y otras con menor acumulación (**Fig. 73 A**). En este sentido, al comparar tinciones SDH y PAS para evaluar qué tipos de fibras son las que más glucógeno acumulan, se observa que aquellas con una mayor tinción SDH y por tanto mayor actividad oxidativa, son las que presentan una mayor acumulación de glucógeno en la tinción PAS (**Fig. 73 B**).

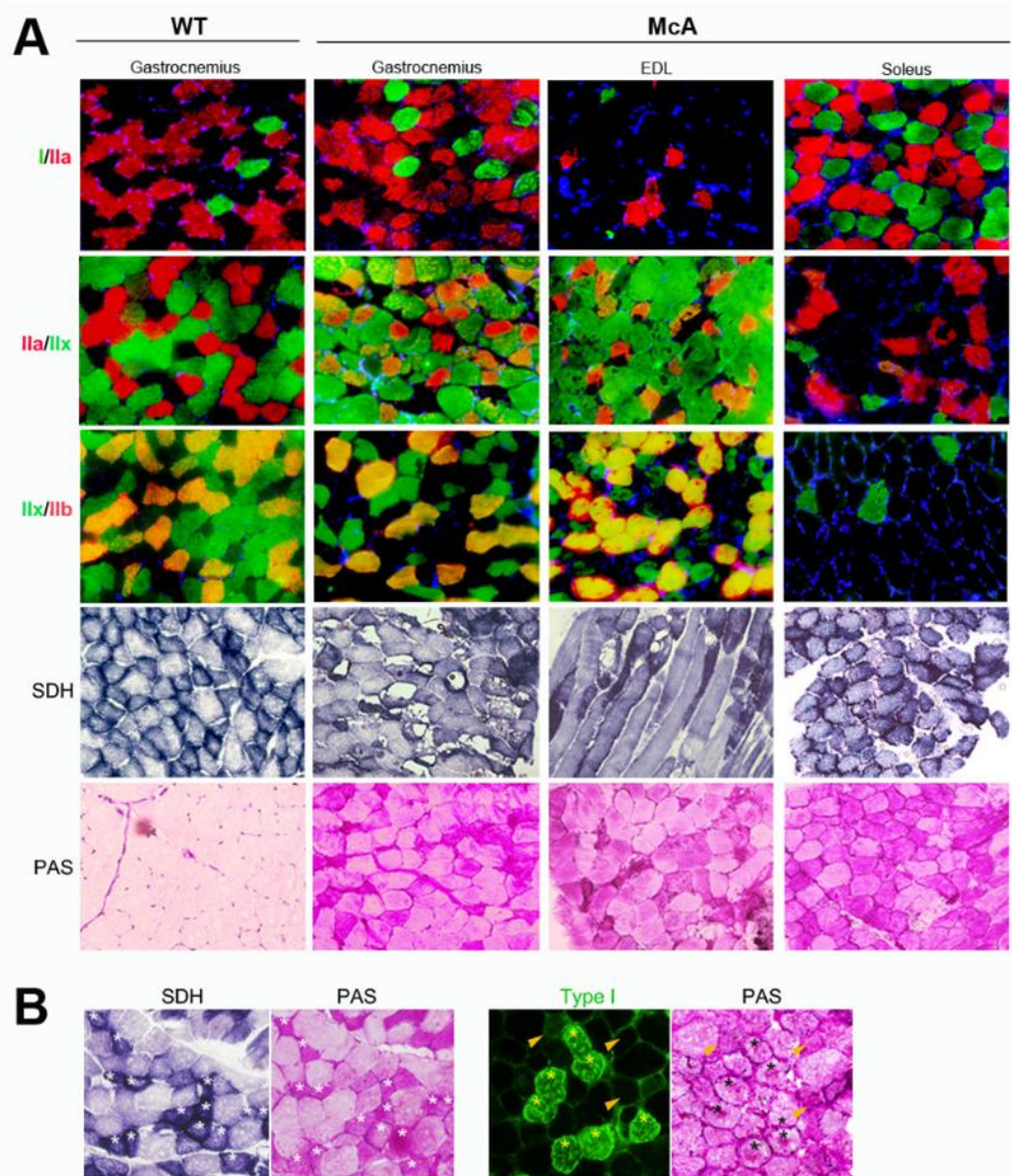


Figura 73. Imágenes de la caracterización histológica de la afectación de los distintos tipos de fibras. A) Imágenes de cortes consecutivos de muestras del músculo GAST de ratones WT y de los músculos GAST, EDL y *soleus* de ratones McA teñidos con marcadores específicos para los tipos de fibra I, IIa, IIx y IIb, SDH y PAS. B) Imágenes de cortes consecutivos del músculo *soleus* de ratones McA que representan la co-localización de fibras con una tinción más evidente de SDH y PAS (izquierda) y la no co-localización de fibras teñidas con el marcador inmunofluorescente específico para fibras tipo I y aquellas que presentan una mayor tinción PAS (derecha). Asteriscos (izquierda): fibras que presentan tanto una mayor tinción de SDH como de PAS en cortes consecutivos. Asteriscos (derecha): fibras tipo I en tinción inmunofluorescente específica y tinción PAS de cortes consecutivos. Puntas de flecha (derecha): fibras que presentan una mayor acumulación de glucógeno en tinción PAS y que no se corresponden con fibras tipo I en tinción inmunofluorescente específica.

Así mismo, cuando se realiza una tinción inmunofluorescente específica con el marcador de fibras tipo I y una tinción PAS de cortes consecutivos se observa que estas fibras oxidativas no son las que acumulan mayor cantidad de glucógeno (Fig. 73 B).

De esta forma, los resultados obtenidos en este estudio histológico muestran que en términos generales son las fibras oxidativas tipo IIa las que presentan una mayor afectación en los

ratones McA, como hemos ido viendo en diferentes resultados previamente expuestos, que las fibras oxidativas acumulan una mayor cantidad de glucógeno y que dentro de este tipo de fibras, no son las de tipo I las que presentan mayor acumulación. De ello, subyace la idea de que son las fibras oxidativas tipo IIa las que presentan mayor acumulación de glucógeno y esto podría explicar por qué se muestran tan dañadas en los ratones McA, mientras que las fibras tipo I mantienen su integridad. En cualquier caso, la continuación de este estudio con tinciones de cortes consecutivos teñidos mediante marcador inmunofluorescente específico para fibras tipo IIa y tinción PAS ayudaría a esclarecer este supuesto.

4.14 Las fibras musculares con marcaje positivo para la enzima COX II presentan una mayor afectación en los ratones McArdle

La enzima citocromo c oxidasa subunidad II (COX II) pertenece al complejo IV mitocondrial que se encarga de la reducción del oxígeno a agua en la cadena transportadora de electrones. Así, la identificación de diferentes variantes del gen que la codifica han sido relacionadas con deficiencias patológicas del complejo IV mitocondrial, que a su vez se asocian a una serie de fenotipos heterogéneos entre los que se incluyen miopatía, hipotonía, debilidad muscular, intolerancia al ejercicio o desarrollo motor tardío.^[392-395] Por lo indicado anteriormente y a la vista de la gran afectación observada en las fibras oxidativas tipo IIa a nivel estructural, de regeneración y de acumulación de glucógeno, nos planteamos si estas fibras presentarían algún tipo de afectación mitocondrial que ayudara a explicar el fenotipo observado en las mismas en los ratones McA. Para ello, se realizó un estudio histológico de los músculos *soleus*, GAST y TA de ratones WT y McA mediante tinción inmunofluorescente específica para los marcadores de tipos de fibras I y IIb y el marcador de la enzima COX II, y se cuantificó en estos mismos músculos, la proporción de NC que presentan las fibras positivas para el marcaje de esta enzima, indicativo de haber sufrido procesos de degeneración/regeneración.

A nivel histológico se aprecia claramente el marcaje positivo para COX II en la membrana de las fibras musculares de los músculos *soleus* y GAST de los ratones WT, y de forma más difusa en el citoplasma (**Figs. 74 A, B y D y 75 A**), mientras que en los ratones McA este marcaje de membrana es más difuso aunque sigue apreciándose predominancia membranosa del mismo, siendo casi igualmente intenso el marcaje citoplasmático (**Figs. 74 A, B, C y D y 75 A**).

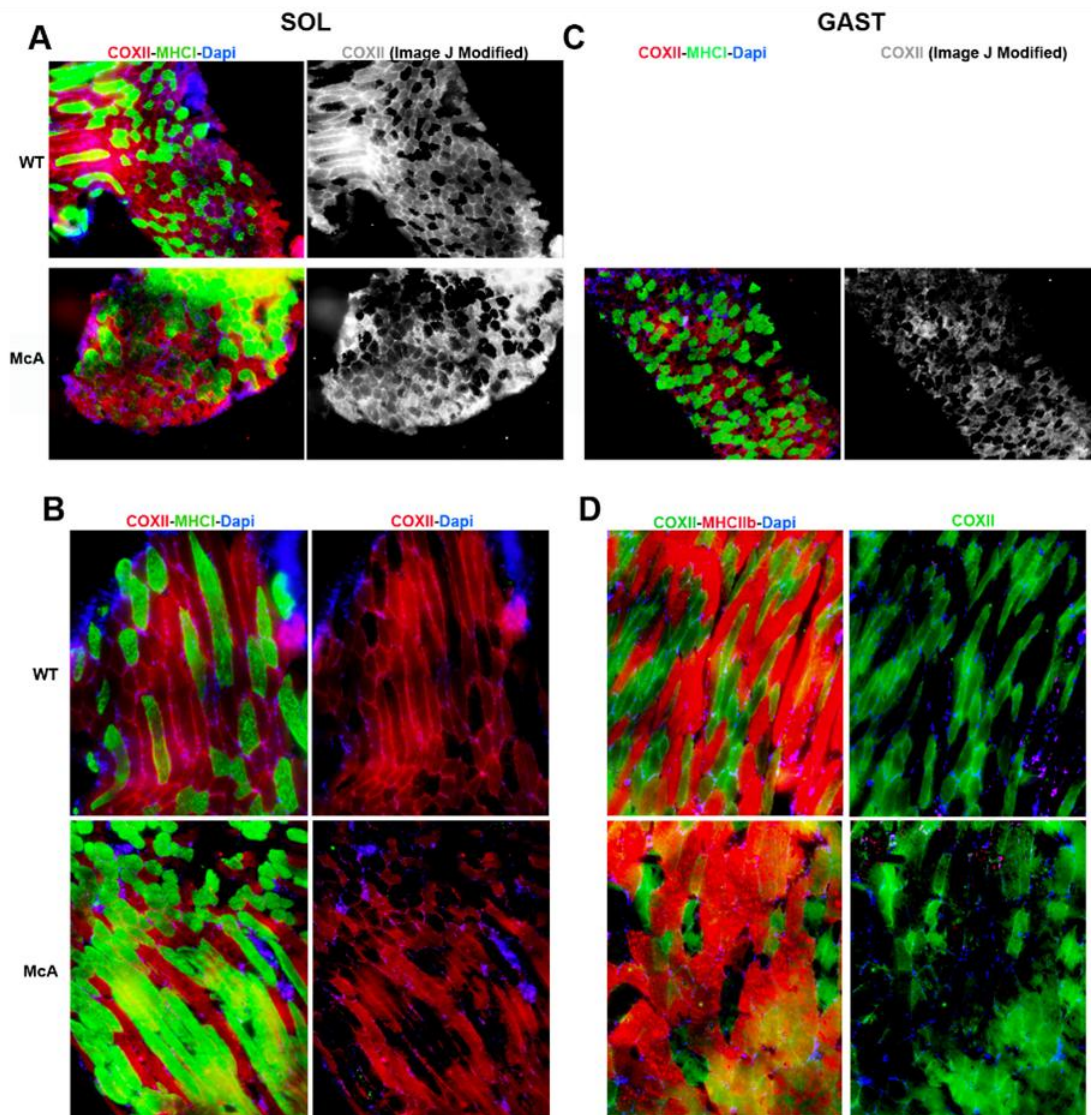


Figura 74. Imágenes de la caracterización histológica muscular de la afectación mitocondrial. A) Imágenes de muestras del músculo *soleus* de ratones WT y McA teñidas con los marcadores inmunofluorescentes específicos para el tipo de fibra I (verde), la enzima COX II (rojo) y Dapi (azul). Las imágenes COX II *modified* son muestras exclusivas del canal de emisión de fluorescencia de la enzima COX II modificadas mediante el *software ImageJ* para observar cómo se distribuye el marcaje de esta enzima en los ratones WT y McA. B) Imágenes de muestras del músculo *soleus* de ratones WT y McA teñidas con los marcadores inmunofluorescentes específicos para el tipo de fibra I (verde), la enzima COX II (rojo) y Dapi (azul) e imágenes tomadas solamente en el canal de emisión de fluorescencia de la enzima COX II para observar la distribución del marcaje de esta enzima en ambos genotipos. C) Imágenes de muestras del músculo GAST de ratones McA teñido con los marcadores inmunofluorescentes específicos para el tipo de fibra I (verde), la enzima COX II (rojo) y Dapi (azul). Las imágenes COX II *modified* son muestras exclusivas del canal de emisión de fluorescencia de COX II modificadas mediante el *software ImageJ* para observar cómo se distribuye el marcaje de esta enzima. Al término de la redacción de esta tesis queda por completar esta figura con imágenes del músculo GAST de ratones WT. D) Imágenes de muestras del músculo GAST de ratones WT y McA teñidas con los marcadores inmunofluorescentes específicos para el tipo de fibra IIb (rojo), la enzima COX II (verde) y Dapi (azul) e imágenes tomadas solamente en el canal de emisión de fluorescencia de la enzima COX II para observar la distribución del marcaje de esta enzima en ambos genotipos.

Así mismo, aunque el marcaje es en sí oxidativo y aparentemente más ligado a fibras tipo IIa, como se desprende de las imágenes del *soleus* de los ratones WT y McA en las **figuras 74 A y B y 75 A**, también se observa en otro tipo de músculos de ratones McA, como en el GAST, músculo de metabolismo intermedio, y en el TA, músculo glucolítico, en los que aparecen

algunas fibras no oxidativas con un marcaje mixto para fibras tipo IIb y COX II (Figs. 74 D y 75 A). Una posible explicación para lo observado en este estudio histológico sería que la necesidad de los ratones McA de utilizar mecanismos metabólicos alternativos de obtención de energía ante la carencia de ésta que presentan, forzara a cierto tipo de fibras de carácter puramente glucolítico, como las IIb^[47], a flexibilizar sus mecanismos de obtención de energía para maximizar el éxito de los mismos.

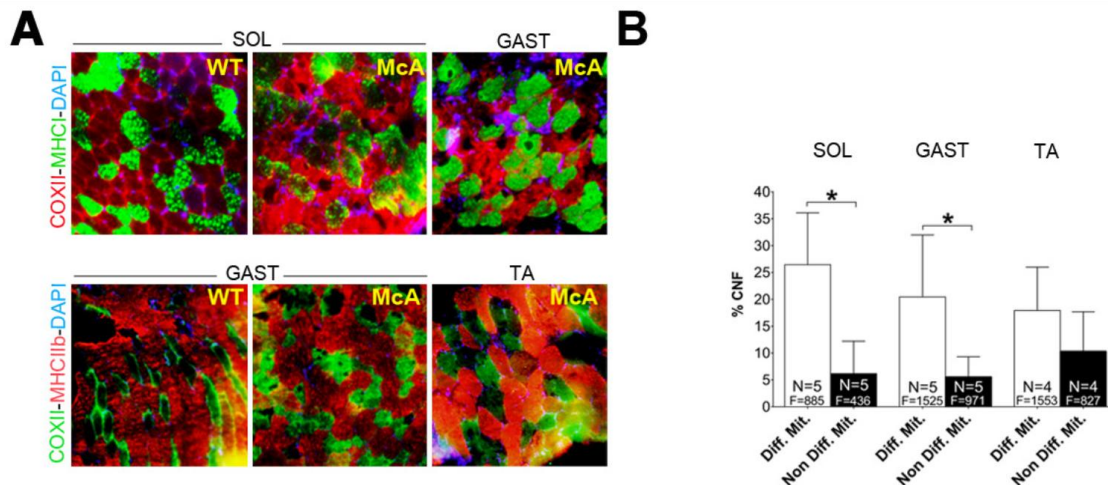


Figura 75. Imágenes de la caracterización histológica muscular de la afectación mitocondrial y de la cuantificación de los NC de las fibras positivas para el marcaje de la enzima COX II. A) Imágenes de muestras de los músculos *soleus* y GAST de ratones WT y *soleus*, GAST y TA de ratones McA teñidas con los marcadores inmunofluorescentes específicos para los tipos de fibras I (verde) y IIb (rojo), la enzima COX II (verde abajo y rojo arriba) y Dapi (azul). B) Gráfica que representa el porcentaje medio de fibras con NC de las fibras con marcaje positivo para la enzima COX II (Diff. Mit.) y negativo para esta enzima (Non Diff. Mit.) en ratones McA. Cada barra representa el porcentaje medio de fibras con NC para cada tipo de marcaje y músculo. Las barras de error corresponden a SD. El número de ratones utilizados (N) así como el número de fibras totales cuantificadas (F) se refleja en la base de cada columna. Los asteriscos representan un p valor <0,05.

Atendiendo ahora a la regeneración de las fibras con un marcaje positivo para la enzima COX II, se observa que en los tres músculos estudiados las fibras que presentan dicho marcaje son las que tienen a su vez una mayor proporción de NC, siendo esta diferencia significativa en los músculos *soleus* y GAST (Fig. 75 B).

Estos resultados sugieren que las mitocondrias de los ratones McA presentan cierta afectación, lo que unido a la gran acumulación de glucógeno que parecen presentar las fibras tipo IIa, según hemos visto previamente, ayudaría a entender el motivo por el que estas fibras oxidativas se ven tan afectadas por la enfermedad en estos ratones.

4.15 Mayor captación de glucosa en las fibras tipo I y IIb y menor captación en las tipo IIa, de los músculos de los ratones McArdle

En los resultados obtenidos previamente de los análisis bioquímicos realizados en ratones McA, hemos observado niveles significativamente inferiores de la hormona insulina y de la glucosa en sangre en estos ratones que en los ratones WT (**apartado 4.3**), así como diferencias con éstos en cuanto a la afectación de los distintos músculos y de sus fibras musculares. Así mismo, estudios previos de la enfermedad de McArdle han postulado que una de las razones de la menor afectación observada en el músculo QUAD con respecto a otros músculos, se debe a una mayor activación de la enzima AMPK en el mismo, y que a través de ella se esté produciendo una mayor captación de glucosa para suplir el déficit energético causado por la ausencia de la degradación de glucógeno, mediante la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana de las células musculares. ^[334, 340-342] Este transportador es translocado a membrana por parte de la célula muscular en situaciones de necesidad energética, de esta forma se produce un incremento de la captación de glucosa que servirá, en última instancia, para su utilización bien vía glucólisis o mediante oxidación a través de la ruta de las pentosas fosfato. ^[163, 166]

Teniendo en cuenta estos precedentes, nos planteamos si podrían existir diferencias en la captación de glucosa en los distintos tipos de fibras musculares de los ratones McA, de forma que pudieran explicar en parte los distintos grados de afectación muscular observados. Para ello se realizaron tinciones inmunofluorescentes con los anticuerpos específicos para el transportador de glucosa GLUT4 y los tipos de fibra I, IIa y IIb, en muestras de tejido de los músculos *soleus*, GAST y TA de ratones jóvenes (20 semanas de edad), y se cuantificaron las fibras positivas, aquellas cuyo marcaje de GLUT4 era principalmente membranoso para este transportador tal y como se describe en los **apartados 3.8 y 3.8.9**.

En relación a la histología se observa un marcaje de GLUT4 membranoso bien definido y preponderante en los ratones WT con respecto a los McA en los que el marcaje es más difuso en los tres músculos estudiados, siendo más intenso el membranoso en estos últimos y presentando también abundancia de marcaje citoplasmático (**Fig. 76**). Esto sugiere que la activación de este transportador de glucosa es más dinámica en los ratones McA que en los WT.

Los resultados de la cuantificación de fibras positivas para el transportador de glucosa GLUT4 muestran una mayor proporción, estadísticamente significativa, en ratones McA que en los

WT, de las fibras tipo I del músculo GAST (**Fig. 77 B**) y de las tipo IIb del músculo TA (**Fig. 77 C**), así como una tendencia a presentar una mayor proporción de las fibras tipo I del músculo *soleus* (**Fig. 77 A**) y de las tipo IIb del músculo GAST (**Fig. 77 B**).

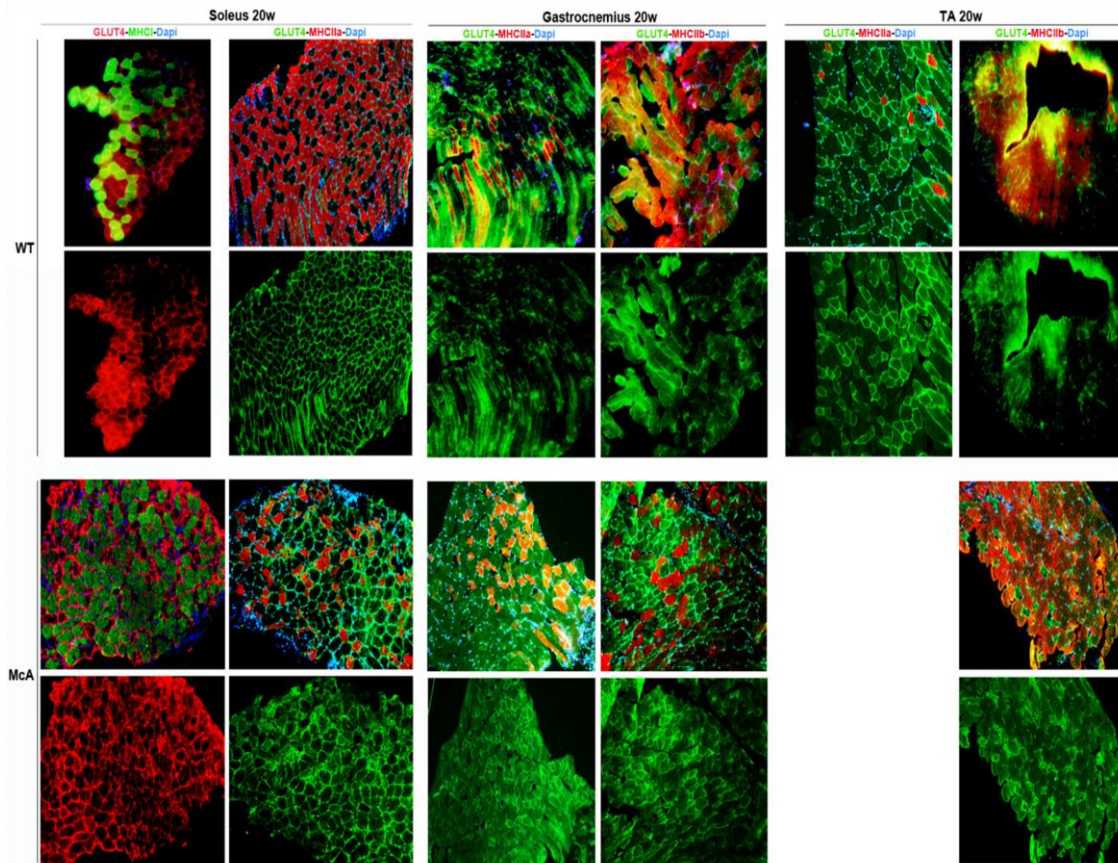


Figura 76. Imágenes de la caracterización histológica muscular de la activación del transportador de glucosa GLUT4. Arriba y de izquierda a derecha imágenes de muestras de los músculos *soleus*, GAST y TA de ratones WT de 20 semanas de edad teñidos con los marcadores inmunofluorescentes específicos para las fibras tipo I (verde) y IIa y IIb (rojo), para el transportador de glucosa GLUT4 (rojo arriba a la izquierda y verde arriba a la derecha) y Dapi (azul). Abajo y de izquierda a derecha imágenes de muestras de los músculos *soleus*, GAST y TA de ratones McA de 20 semanas de edad teñidos con los marcadores inmunofluorescentes específicos para las fibras tipo I (verde) y IIa y IIb (rojo), para el transportador de glucosa GLUT4 (rojo arriba a la izquierda y verde arriba a la derecha) y Dapi (azul). Al término de la realización de esta tesis falta por completar esta figura con imágenes de muestras del músculo TA de ratones McA de 20 semanas de edad teñidas con los marcadores inmunofluorescentes específicos para el tipo de fibra IIa, GLUT4 y Dapi.

Así mismo, se observa una menor proporción, estadísticamente significativa, del marcaje positivo para este transportador en las fibras tipo IIa de los músculos *soleus* (**Fig. 77 A**) y TA (**Fig. 77 C**) de ratones McA, si la comparamos con la correspondiente en ratones WT.

Por tanto, los datos obtenidos en este estudio indican que tanto las fibras tipo I como las tipo IIb de ratones McA presentan en general una mayor captación de glucosa en los tres músculos estudiados que las de los ratones WT, mientras que las fibras tipo IIa pierden capacidad de captación de glucosa como muestran los resultados en *soleus* y TA.

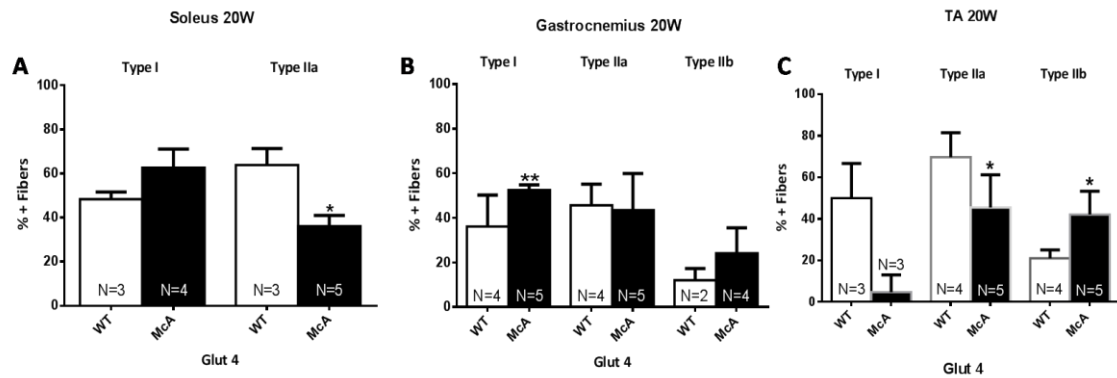


Figura 77. Estudio cuantitativo de la proporción de fibras musculares positivas para el transportador de glucosa GLUT4 en los músculos *soleus*, *GAST* y *TA* de ratones WT y McA de 20 semanas de edad. Cada columna representa el % medio de fibras positivas para el transportador GLUT4 de cada genotipo y tipo de fibra. El número de ratones utilizado para la cuantificación se indica en la parte inferior de cada columna. Para el músculo *soleus* se ha cuantificado el número de fibras siguiente: WT Type I = 463, WT Type IIa = 891, McA Type I = 634 y McA Type IIa = 699. En el músculo *GAST* se ha cuantificado el número de fibras siguiente: WT Type I = 74, WT Type IIa = 591, WT Type IIb = 587, McA Type I = 318, McA Type IIa = 734 y McA Type IIb = 708. Para el músculo *TA* se ha cuantificado el número de fibras siguiente: WT Type I = 13, WT Type IIa = 383, WT Type IIb = 1.029, McA Type I = 11, McA Type IIa = 240 y McA Type IIb = 1.225. Las barras de error corresponden a SD. Se utilizaron los tests no paramétricos *Mann-Whitney* y *Kruskal Wallis ANOVA* de una vía con el test de comparaciones múltiples (*Dunn's test*) para su análisis estadístico. Los asteriscos representan un p valor <0,05. Los asteriscos dobles representan un p valor <0,01.

Así, estos resultados sugieren que las fibras tipo I y IIb de los ratones McA podrían beneficiarse de esta mayor capacidad para captar glucosa presentando una menor afectación que la observada en resultados anteriores en las fibras tipo IIa, cuya capacidad se vería claramente mermada.

4.16 Estudio metabólico del tejido muscular de ratones McArdle

Para el estudio metabólico completo del tejido muscular de ratones McA, nos planteamos estudiar dos aspectos, la regulación de la glucólisis y la oxidación de ácidos grasos.

4.16.1 Los ratones McArdle no presentan alteraciones en la regulación de la vía glucolítica muscular

Teniendo en cuenta que el principal mecanismo de obtención de energía mediante la degradación de glucógeno no es funcional en el músculo esquelético de los enfermos de McArdle, se ha realizado un estudio de la glucólisis como fuente alternativa de obtención de energía, analizando para ello la expresión de las principales enzimas que regulan esta ruta metabólica. En este sentido, la glucólisis actuaría sufriendo la falta de energía del catabolismo del glucógeno que presentan estos pacientes, incrementando la captación y degradación de glucosa para la obtención de energía y por tanto, podría ser una herramienta importante para compensar la incapacidad para degradar glucógeno que presentan. [162, 163, 308-310]

En este estudio se han analizado mediante *western blot* los niveles de proteínas de diferentes enzimas limitantes de la glucólisis, tales como la PFKM y la PKM2, y de la transición hacia el

catabolismo de los ácidos grasos, como la enzima PDHE 1A,^[162, 167-169, 171] que regulan y participan en esta ruta, en muestras procedentes de extractos del músculo GAST de ratones WT y McA de 20 semanas de edad.

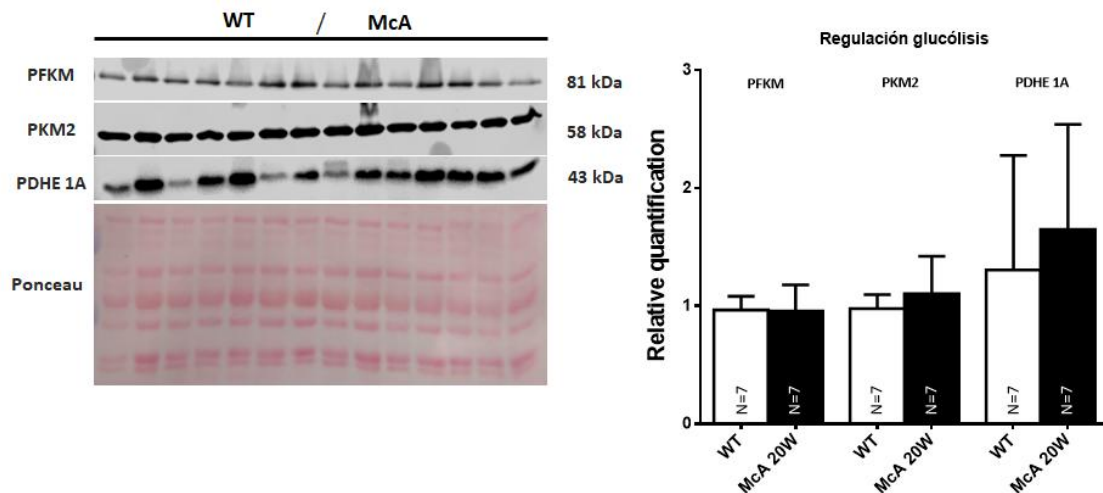


Figura 78. Análisis mediante *western blot* de los niveles de proteína de las enzimas PFKM, PKM2 y PDHE 1A en el músculo GAST de ratones WT y McA de 20 semanas de edad. Las imágenes de los *westerns* se detectaron mediante *Odyssey Fc* y se cuantificaron mediante el programa *Image Studio Software 5.x*. Se muestran imágenes recortadas. Los resultados de las cuantificaciones relativas para las proteínas objeto de estudio provienen del cociente con la cuantificación previa del Ponceau mediante el programa *Image J*. Cada columna representa la cuantificación relativa para cada enzima y genotipo estudiado. El número de ratones utilizado para la cuantificación se indica en la parte inferior de cada columna. Las barras de error corresponden a SD. Para el análisis estadístico se utilizó el test no paramétrico *Mann-Whitney*.

Los datos obtenidos muestran que no existen diferencias entre ambos genotipos, en las enzimas analizadas, PKM2, PFKM y PDHE 1A (Fig. 78).

Así pues, estos resultados sugieren que en principio y a falta de analizar la actividad bioquímica, no existen en los ratones McA alteraciones importantes en la utilización de estas enzimas pertenecientes a la vía glucolítica, no apreciándose así la glucólisis como una ruta alternativa de obtención de energía en ellos.

4.16.2 Mayor captación y utilización de ácidos grasos en el tejido muscular de ratones McArdle

Otra ruta alternativa de obtención de energía por parte del músculo esquelético es la oxidación de ácidos grasos, por eso nos planteamos el estudio de algunas de las enzimas implicadas en ella.

Para este estudio se analizaron los niveles de expresión de aquellas enzimas involucradas directamente en la protección y degradación de la gota lipídica, PLIN5 y ATGL, p-HSL Ser 565 y HSL, respectivamente, así como del receptor/transportador de ácidos grasos al músculo,

CD36.^[208, 221, 222, 231, 241] Dicho análisis se realizó mediante *western blot*, utilizando extractos del músculo GAST de ratones WT y McA de 20 semanas de edad.

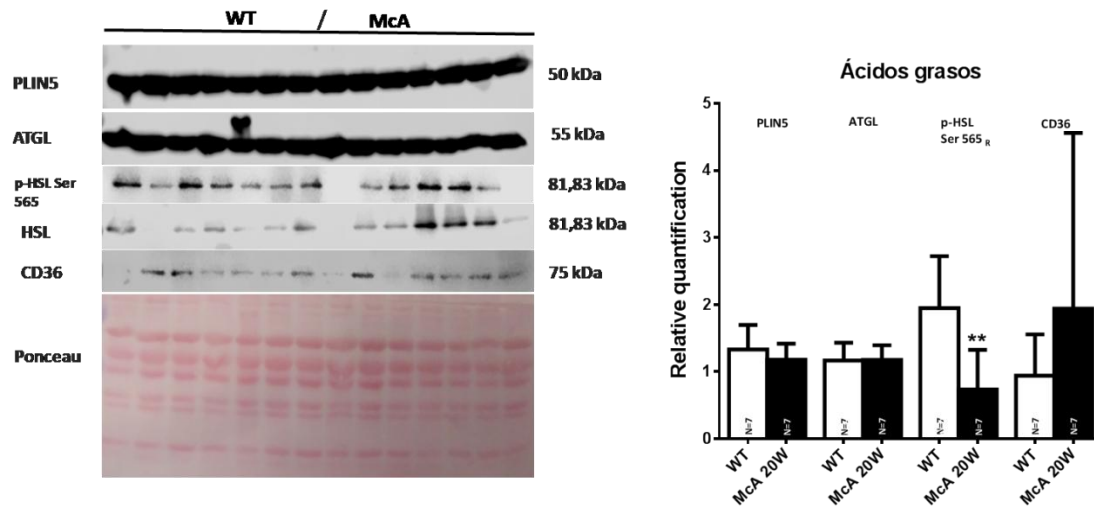


Figura 79. Análisis mediante *western blot* de los niveles de proteínas PLIN5, ATGL, HSL total, p-HSL Ser 565 y CD 36 en el músculo GAST de ratones WT y McA de 20 semanas de edad. Las imágenes de los *westerns* se detectaron mediante *Odyssey Fc* y se cuantificaron mediante el programa *Image Studio Software 5.x*. Se muestran imágenes recortadas. Los resultados de las cuantificaciones relativas para las proteínas objeto de estudio provienen del cociente con la cuantificación previa del Ponceau mediante el programa *Image J*. Cada columna representa la cuantificación relativa para cada enzima y genotipo estudiado. El número de ratones utilizado para la cuantificación se indica en la parte inferior de cada columna. Las barras de error corresponden a SD. Para el análisis estadístico se utilizó el test no paramétrico *Mann-Whitney*. Los asteriscos dobles representan un p valor <0,01.

Los resultados de este estudio, comparando ratones McA con WT, muestran niveles significativamente inferiores de proteína de la forma inactiva de la enzima HSL (p-HSL Ser 565) así como una tendencia a presentar mayores niveles proteicos del receptor de membrana muscular para ácidos grasos CD36, no observándose sin embargo, diferencias de los niveles de las enzimas PLIN5 y ATGL entre ambos genotipos (Fig. 79).

De esta forma, los resultados obtenidos indicarían que los ratones McA respecto a los WT presentan una menor inactivación de la enzima HSL, encargada de la degradación de ácidos grasos, y una tendencia a presentar mayor captación de ácidos grasos libres por parte del músculo GAST.

4.16.3 Déficit mitocondrial en la oxidación de ácidos grasos en el tejido muscular de los ratones McArdle

Una vez que los resultados obtenidos del estudio de la oxidación de ácidos grasos en ratones McA de 20 semanas de edad parecen indicar su uso por parte del músculo GAST, nuestro siguiente objetivo fue analizar si existen alteraciones en algunas de las proteínas que favorecen la transición hacia un metabolismo más oxidativo.

El análisis se centró en el estudio de enzimas implicadas directamente en la β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos (HADH), en la transición hacia un metabolismo más oxidativo (PPAR δ) y en la regulación de genes nucleares necesarios para la respiración (Nrf2),^[47, 247-249, 396] y se realizó mediante *western blot*, en extractos de músculo GAST de ratones WT y McA de 20 semanas de edad.

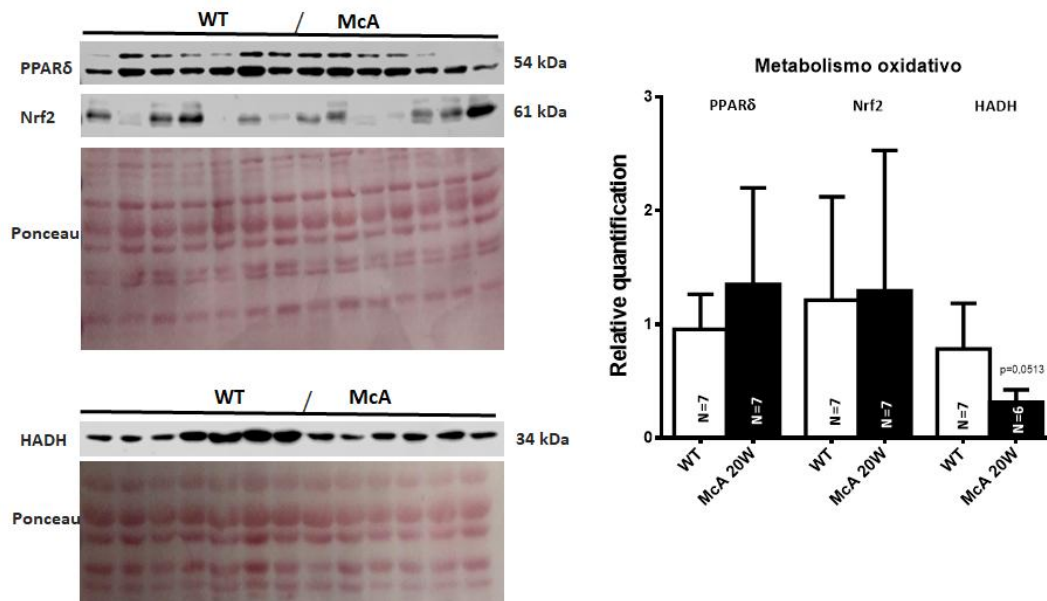


Figura 80. Análisis mediante *western blot* de los niveles de proteínas de las enzimas PPAR δ , Nrf2 y HADH en el músculo GAST de ratones WT y McA de 20 semanas de edad. Las imágenes de los *westerns* se detectaron mediante *Odyssey Fc* y se cuantificaron mediante el programa *Image Studio Software 5.x*. Se muestran imágenes recortadas. Los resultados de las cuantificaciones relativas para las proteínas objeto de estudio provienen del cociente con la cuantificación previa del Ponceau mediante el programa *Image J*. Cada columna representa la cuantificación relativa para cada enzima y genotipo estudiado. El número de ratones utilizado para la cuantificación se indica en la parte inferior de cada columna. Las barras de error corresponden a SD. Para el análisis estadístico se utilizó el test no paramétrico *Mann-Whitney*.

Los datos obtenidos en este estudio, comparando ratones McA con WT, revelan una tendencia a presentar mayores niveles de la enzima PPAR δ y casi significativamente menores de la enzima HADH (Fig. 80).

Así, los resultados del estudio de estas enzimas sugieren para los ratones McA un déficit mitocondrial a la hora de oxidar los lípidos vía mitocondrial.

4.17 Estudio metabólico del hígado de ratones McArdle

Para el estudio metabólico del hígado de ratones McA hemos realizado un análisis de las principales vías de síntesis y degradación del glucógeno, tanto en ratones jóvenes de 20 semanas de edad como a través de un estudio longitudinal en ratones de 8, 35 y 70 semanas de edad, así como de la regulación de ambas rutas metabólicas, de las principales enzimas implicadas en las rutas de la glucólisis y la gluconeogénesis y de la actividad de la enzima GS.

4.17.1 Mayor formación de complejos UDP-glucosa en el hígado de los ratones McArdle jóvenes

Los resultados obtenidos en los estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación con el modelo murino para la enfermedad de McArdle, relativos a su caracterización muscular y a la relación metabólica existente entre el músculo esquelético y el hígado, ya descritos, nos han hecho plantearnos si el hígado podría estar jugando un papel compensatorio, aportando la glucosa necesaria que los ratones McA no pueden obtener de la degradación del glucógeno muscular.^[312]

En este sentido, inicialmente analizamos la vía de síntesis de glucógeno utilizando la técnica de *western blot*, donde las enzimas evaluadas, relacionadas con esta ruta metabólica, proceden de extractos de tejido hepático de ratones WT y McA de entre 8 y 20 semanas de edad.

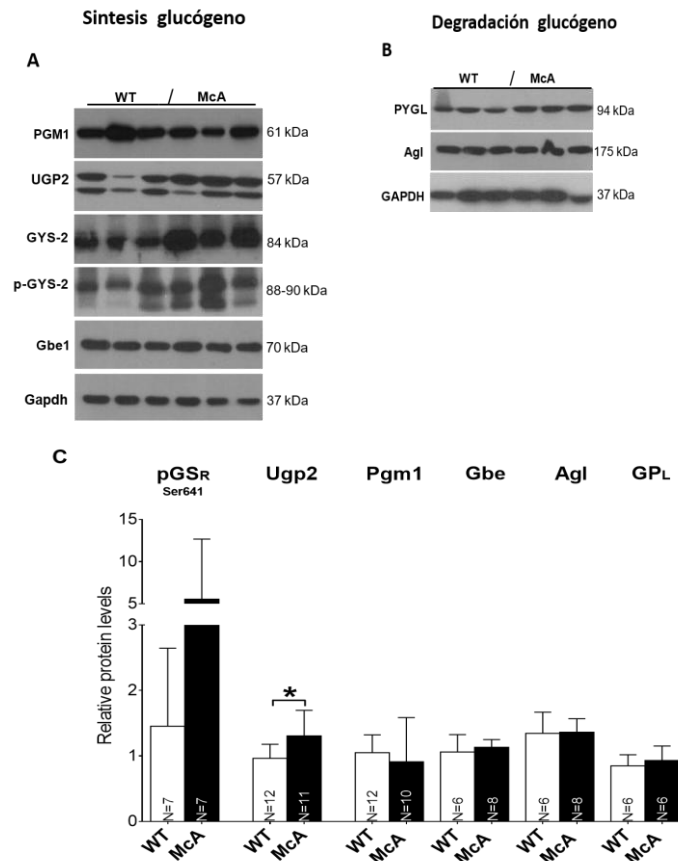


Figura 81. Estudio de la síntesis y degradación de glucógeno en el hígado de ratones WT y McA jóvenes (de entre 8 y 20 semanas de edad). Las muestras proceden de extractos de tejido hepático de ratones de entre 8 y 20 semanas de edad. Los niveles de las enzimas PGM1, UGP-2, GYS-2, pGYS-2, GBE1, GP-L y AGL se analizaron mediante *western blot* con sus anticuerpos específicos respectivos. Se muestran imágenes representativas de los *western blots* realizados (Fig. 81 A y B). Los gráficos muestran la cuantificación de los resultados obtenidos, agrupando los resultados por su valor medio en ratones WT y McA (Fig. 81 C). Cada columna representa el nivel medio de cada enzima y genotipo estudiado. El número de ratones utilizado para la cuantificación se indica en la parte inferior de cada columna. Las barras de error corresponden a SD. Para el análisis estadístico se utilizó el test no paramétrico *Mann-Whitney*. Los asteriscos representan un p valor <0,05.

Los datos obtenidos revelan únicamente niveles proteicos de la enzima UGP-2 significativamente mayores en los ratones McA. En el resto de enzimas analizadas, p-GYS-2 641, PGM-1, GS-L, GBE, GP-L y AGL (**Figs. 81 A, B y C**), no se aprecian diferencias relevantes entre ambos genotipos.

Estos resultados obtenidos indican mayor formación de complejos UDP-glucosa en ratones McA jóvenes que en los WT, al ser significativamente mayores los niveles de la enzima UGP-2.

4.17.2 Mayor formación y liberación de glucosa hepática en los ratones McArdle jóvenes

Continuando con el análisis de una posible alteración de las rutas metabólicas relacionadas con el glucógeno hepático, cobra importancia ahora el análisis de aquellas vías que por un lado propician la formación de glucosa a partir de compuestos no carbohidratados (gluconeogénesis), como se ha mencionado en la introducción, y por otro lado actúan como enzimas limitantes de la glucólisis.^[263, 397, 398] Con este objetivo analizamos las enzimas que participan en la vía metabólica de la gluconeogénesis, G6Pc, PEPCk y PCB, y aquellas que limitan la ruta metabólica de la glucólisis HK-1, PFKL y p-PDHE1 Ser 283.^[263, 397, 398]

De nuevo, las enzimas evaluadas proceden de extractos de tejido hepático tanto de ratones WT como McA de entre 8 y 20 semanas de edad.

Los datos obtenidos en el estudio de ratones McA y WT jóvenes, muestran niveles significativamente menores de la enzima p-PDHE1 Ser 293 y una tendencia a presentar menores niveles de la enzima HK-1, así como unos niveles significativamente mayores de la enzima G6Pc y una tendencia a presentar mayores niveles de la enzima PCK2 (**Fig. 82**). El resto de enzimas analizadas, PFKL y PCB, no presentan diferencias relevantes entre ambos genotipos.

Estos resultados indicarían mayor formación de glucosa y de su liberación a la sangre en el hígado de ratones McA jóvenes que en los WT, al ser mayores en ellos los niveles de las enzimas PCK2 y G6Pc, así como menor degradación de esta molécula también en los ratones McA, al ser menores en ellos tanto los niveles de la enzima HK1 como de la activación de la enzima PDHE1 (p-PDHE1 Ser 293).

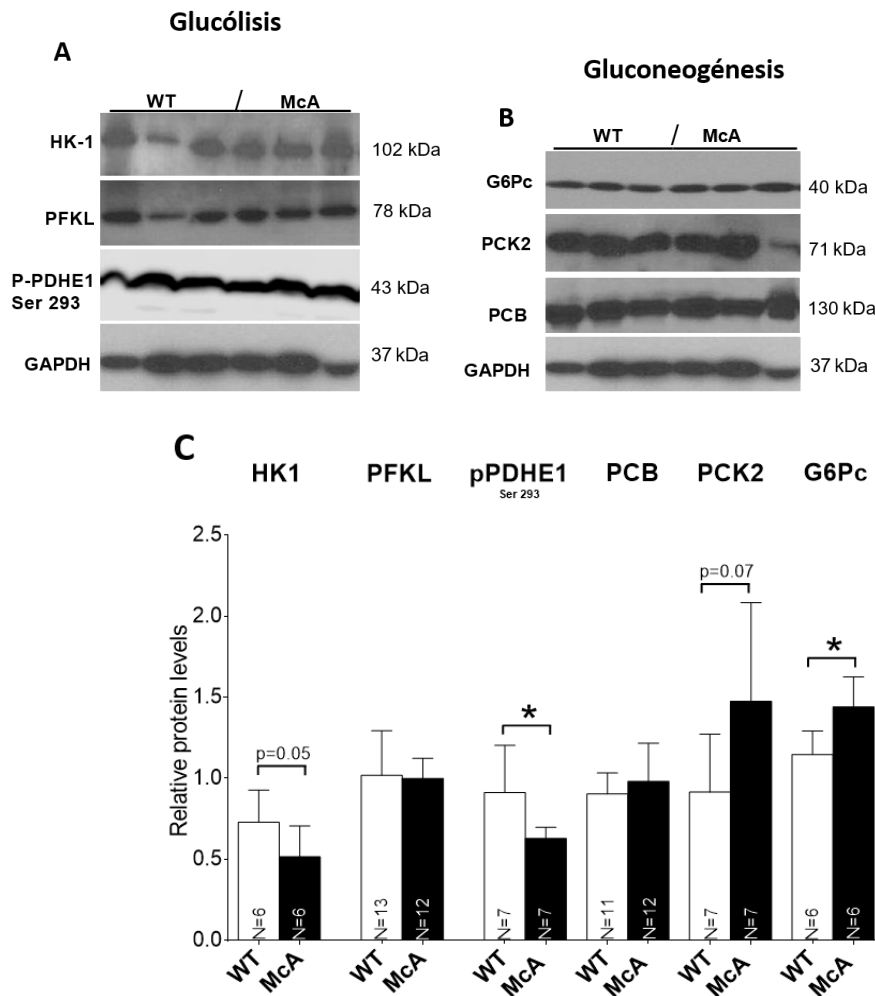


Figura 82. Estudio de la glucólisis y de la gluconeogénesis en el hígado de ratones WT y McA jóvenes (de entre 8 y 20 semanas de edad). Las muestras proceden de extractos de tejido hepático de ratones de entre 8 y 20 semanas de edad. Los niveles de las enzimas G6Pc, PCK2, PCB, HK-1, p-PDHE1 Ser 293 y PFKL se analizaron mediante *western blot* con sus anticuerpos específicos respectivos. Se muestran imágenes representativas de los *western blots* realizados (Figs. 82 A y B). Los gráficos muestran la cuantificación de los resultados obtenidos agrupando los resultados por su valor medio en ratones WT y McA (Fig. 82 C). Cada columna representa el nivel medio de cada enzima y genotipo estudiado. El número de ratones utilizado para la cuantificación se indica en la parte inferior de cada columna. Las barras de error corresponden a SD. Para el análisis estadístico se utilizó el test no paramétrico *Mann-Whitney*. Los asteriscos representan un p valor <0,05.

4.17.3 Menor síntesis de glucógeno hepático en los ratones McArdle jóvenes

A la vista de los resultados obtenidos del estudio de diversas enzimas implicadas en las rutas metabólicas del glucógeno hepático, reflejados en apartados anteriores, y teniendo en cuenta que los niveles de la enzima UGP-2 son significativamente más altos en ratones con la enfermedad de McArdle, parece lógico continuar con el estudio de aquellas enzimas que actúan como reguladoras de la síntesis de glucógeno.^[261-263, 397] Las enzimas analizadas, relacionadas con las vías de regulación de la síntesis de glucógeno, han sido p-AKT, p-GSK3 α y β , Phkb y p-AMPK.^[261-263, 397]

Las muestras utilizadas en este análisis han sido similares a las utilizadas en los análisis anteriores, extractos de tejido hepático de ratones WT y McA de entre 8 y 20 semanas de edad.

Regulación síntesis glucógeno

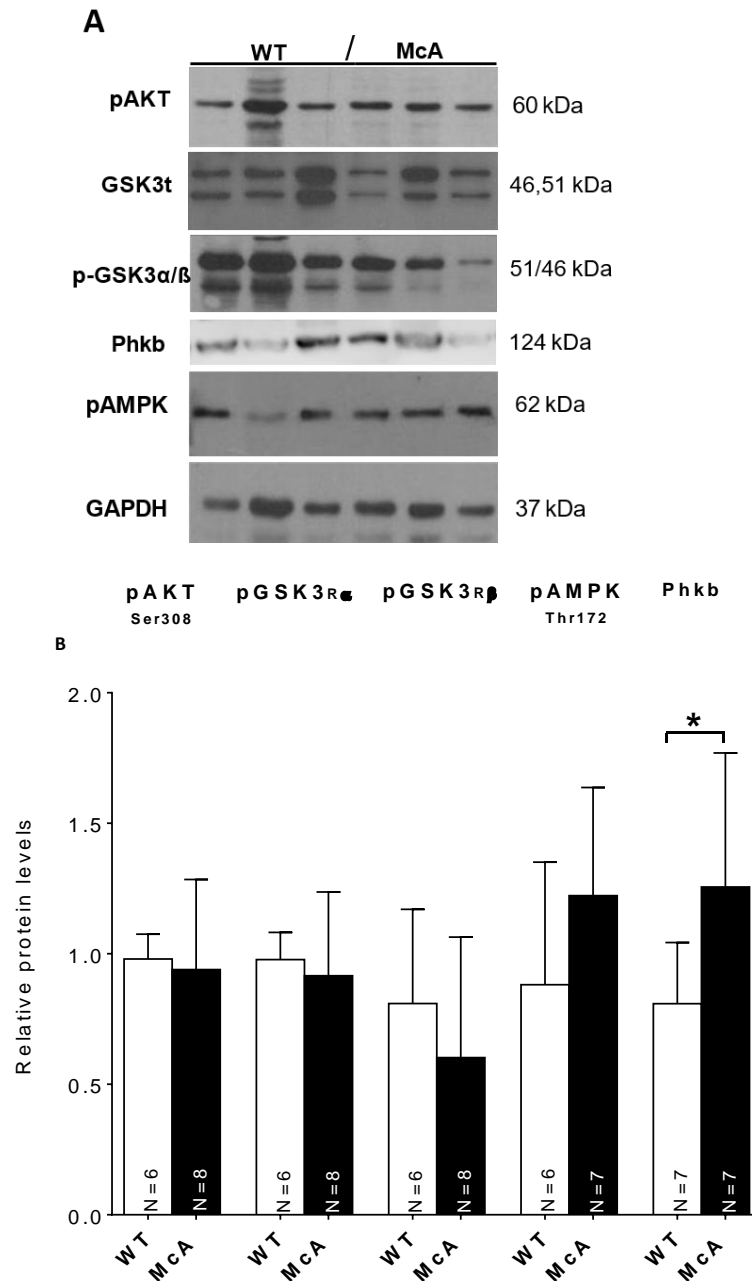


Figura 83. Estudio de las vías de regulación implicadas en la síntesis y degradación del glucógeno en hígado de ratones WT y McA jóvenes (de entre 8 y 20 semanas de edad). Las muestras proceden de extractos de tejido hepático de ratones de entre 8 y 20 semanas de edad. Los niveles de las enzimas p-AKT, p-GSK3 α y β , Phkb y p-AMPK se analizaron mediante *western blot* con sus anticuerpos específicos respectivos. Se muestran imágenes representativas de los *western blots* realizados (Fig. 83 A). Los gráficos muestran la cuantificación de los resultados obtenidos agrupando los resultados por su valor medio en ratones WT y McA (Fig. 83 B). Cada columna representa el nivel medio de cada enzima y genotipo estudiado. El número de ratones utilizado para la cuantificación se indica en la parte inferior de cada columna. Las barras de error corresponden a SD. Para el análisis estadístico se utilizó el test no paramétrico *Mann-Whitney*. Los asteriscos representan un p valor <0,05.

Como puede deducirse de la figura anterior, los niveles de las enzimas p-AKT, p-GSK3 α y β y p-AMPK no presentan diferencias significativas entre ambos genotipos, por el contrario, sí que se observan niveles significativamente mayores de la enzima Phkb en los ratones McA con que en los WT (**Fig. 83**).

Estos resultados sugieren un menor síntesis de glucógeno hepático en ratones McA jóvenes que en los WT, dado que los niveles significativamente mayores de la enzima Phkb favorecen a la forma inactiva de la enzima GS-L.

4.17.4 Incremento de la utilización de glucógeno hepático con la edad en los ratones

McArdle

En vista de las alteraciones observadas en el peso relativo del hígado de ratones McA jóvenes, así como en los niveles proteicos tanto de la enzima GS-L y como de la enzima UGP-2, parece interesante analizar el efecto que la mutación *p.R50X* tiene sobre la acumulación de glucógeno y la actividad de la GS-L en el hígado de los ratones que padecen la enfermedad de McArdle según avanza la enfermedad.

El hígado es un importante almacén de glucógeno, el principal en términos de concentración, y el único órgano capaz de exportar glucosa a la sangre en condiciones de carencia energética para que pueda ser utilizada por el resto de órganos y tejidos.^[163] De esta forma, dada la imposibilidad que tienen los ratones McA para degradar el glucógeno muscular y utilizar la glucosa resultante como energía para sus células,^[308-310] el hígado podría estar jugando un papel compensatorio aportando la energía que el músculo requiere, degradando parte del glucógeno almacenado y liberándolo en forma de glucosa a la sangre. Con esta idea como punto de partida y a la vista de los resultados obtenidos anteriormente en relación con el hígado, tanto en el estudio anatómico y bioquímico de la captación de glucosa así como en los correspondientes al transportador GLUT4 en tejido muscular, nos planteamos realizar la cuantificación bioquímica longitudinal de la acumulación de glucógeno en el hígado. Para este estudio se utilizaron muestras de hígado de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad.

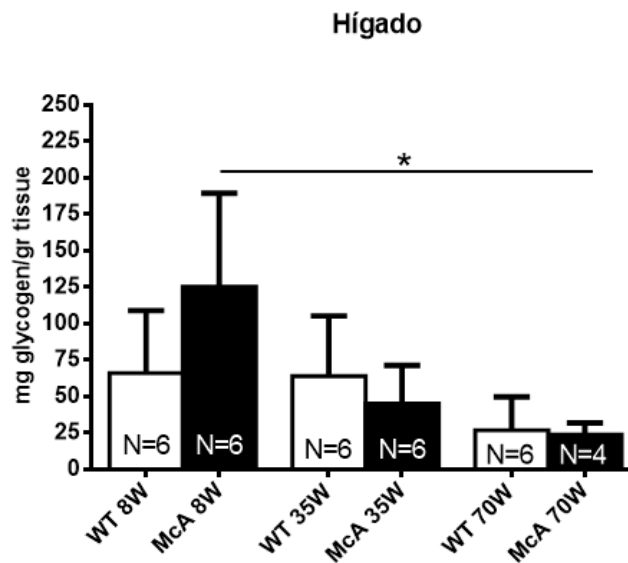


Figura 84. Cuantificación bioquímica de la acumulación de glucógeno en el hígado de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad. Cada columna representa la concentración de glucógeno de cada genotipo y grupo de edad. El número de ratones utilizado para la cuantificación se indica en la parte inferior de cada columna. Las barras de error corresponden a SD. Para el análisis estadístico se utilizaron los tests no paramétricos *Mann-Whitney* y *Kruskal Wallis ANOVA* de una vía con el test de comparaciones múltiples (*Dunn's test*). Los asteriscos representan un p valor <0,05.

Los datos obtenidos en esta cuantificación bioquímica longitudinal muestran una tendencia de los ratones McA de 8 semanas de edad a presentar una cantidad más elevada de glucógeno en el hígado que los WT de esa misma edad. Así mismo, analizando la evolución de la acumulación de glucógeno con la edad, observamos que en ambos genotipos la cantidad de glucógeno acumulada desciende en los ratones WT de 70 semanas de edad respecto de los de 8 semanas, siendo significativo este descenso en los ratones McA, ≈ 122 mg/gr tejido (**Fig. 84**). Estos resultados sugieren que los ratones McA utilizan más cantidad de glucógeno procedente del hígado que los WT, como demuestran tanto la mayor acumulación de glucógeno que presentan a las 8 semanas de edad como el gran descenso que dicha acumulación sufre según avanza la enfermedad, siendo éste más significativo que el que sufren los ratones WT con la edad.

4.17.5 Incremento de la actividad de la forma “activa” de la enzima GS-L en el hígado de ratones McArdle jóvenes

Teniendo en cuenta los resultados previos en los que se observan alteraciones de los niveles proteicos de las enzimas GS-L y UGP-2 en los ratones McA, así como una mayor utilización de glucógeno procedente del hígado, nos planteamos analizar el efecto que la mutación *p.R50X* tiene sobre la actividad de la enzima GS-L en estos ratones. Para este análisis se utilizó el

substrato glucosa-6-fosfato que, como se mencionó en la introducción, es un activador alostérico y un substrato de la enzima GS-L que promueve la síntesis de glucógeno.^[163, 164]

Las muestras utilizadas para la determinación de la actividad de la enzima GS-L proceden de extractos no centrifugados de tejido hepático de ratones tanto WT como McA de 20 semanas de edad.

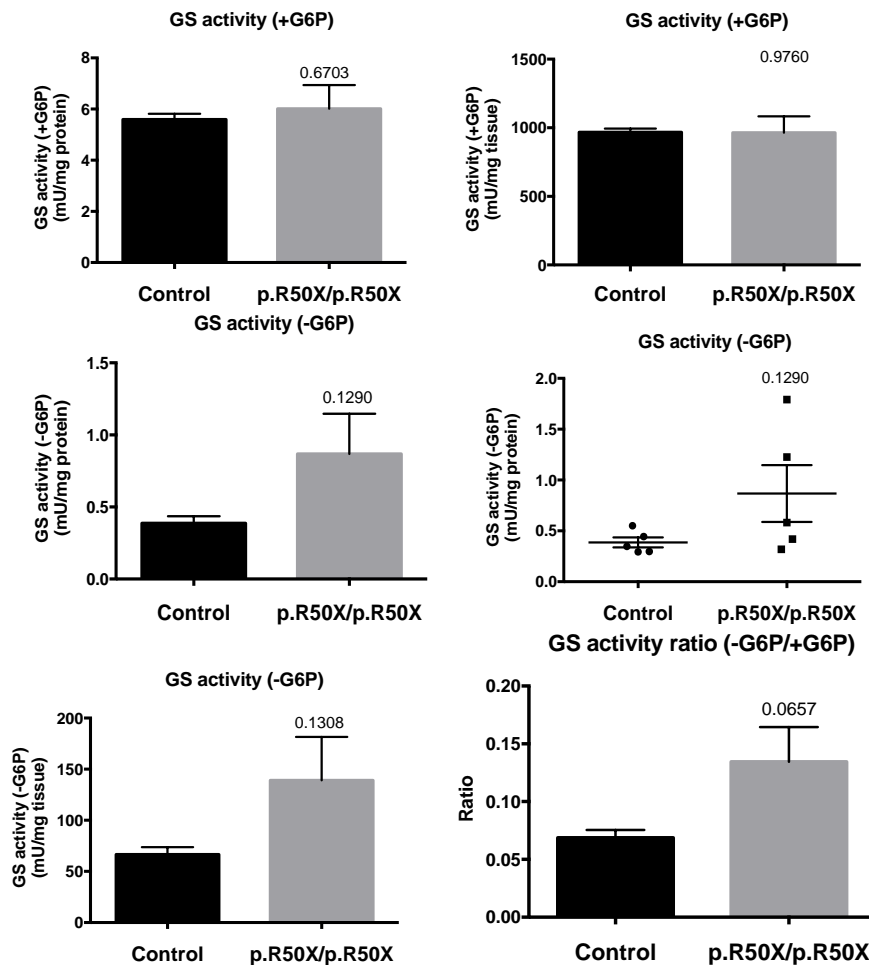


Figura 85. Estudio de la actividad de la glucógeno sintasa hepática en hígado de ratones 20 semanas de edad. Las muestras proceden de extractos no centrifugados de tejido hepático. Los niveles de actividad de la enzima GS-L están representados en miliunidades por miligramo de proteína y en miliunidades por miligramo de tejido. Los gráficos de la actividad de la enzima GS-L sin la aportación del substrato glucosa-6-fosfato muestran la cuantificación de los resultados obtenidos representando la variabilidad de cada individuo agrupándola por ratones control (Control) y ratones con la enfermedad de McArdle (*p.R50X/p.R50X*), posteriormente, agrupando los resultados por su valor medio en ratones controles (Control) y ratones con la enfermedad de McArdle (*p.R50X/p.R50X*). Los gráficos de la actividad de la enzima GS-L con el substrato glucosa-6-fosfato y de la ratio entre ambas medidas agrupan los resultados por su valor medio en ratones controles (Controles) y ratones con la enfermedad de McArdle (*p.R50X/p.R50X*).

Como puede observarse en las gráficas de la **figura 85**, cuando se añade el substrato glucosa-6-fosfato no se aprecia ninguna diferencia significativa en la actividad de la enzima GS-L para los ratones WT y McA. Sin embargo, en ausencia de este substrato, se observa una tendencia de los ratones McA a presentar mayor actividad de la enzima GS-L que los WT (**Fig. 85**).

En este caso, al no estar centrifugadas las muestras, la medida de la actividad de la enzima GS-L en ausencia del substrato glucosa-6-fosfato reflejaría la tendencia a presentar mayor actividad de la “forma” activa de la enzima.^[261-263, 397]

4.17.6 Fluctuación de la síntesis y la degradación de glucógeno hepático con la edad en los ratones McArdle

Como continuación al estudio metabólico realizado en el hígado de ratones McA jóvenes, nos planteamos ver la evolución de las enzimas implicadas en la síntesis y degradación de glucógeno según avanza la enfermedad.

Las muestras analizadas para la evaluación de las enzimas relacionadas con estas rutas metabólicas proceden de extractos de tejido hepático de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad.

El análisis de las enzimas implicadas en la síntesis y la degradación de glucógeno muestra un aumento significativo de los niveles de la ratio p-GS Ser 641/GS entre ratones McA de 8 y 35 semanas de edad así como un descenso significativo de los niveles de esta ratio y de los niveles de la enzima AGL entre los ratones McA de 35 y los de 70 semanas de edad (**Figs. 86 A y B**). Para el resto de enzimas analizadas, UGP2, Pgm1, GBE y GP-L, no se aprecian diferencias destacables entre los ratones McA de los tres grupos de edad objeto de estudio (**Figs. 86 A y B**).

Los resultados obtenidos en este análisis longitudinal sugieren un descenso de la síntesis de glucógeno hepático en los ratones McA entre las 8 y 35 semanas de edad y un aumento posterior en su almacenamiento entre ratones de 35 y 70 semanas de edad, como reflejan los descensos significativos de los niveles de la forma inactiva de la enzima GS-L (p-GS Ser 641) y de la enzima AGL.

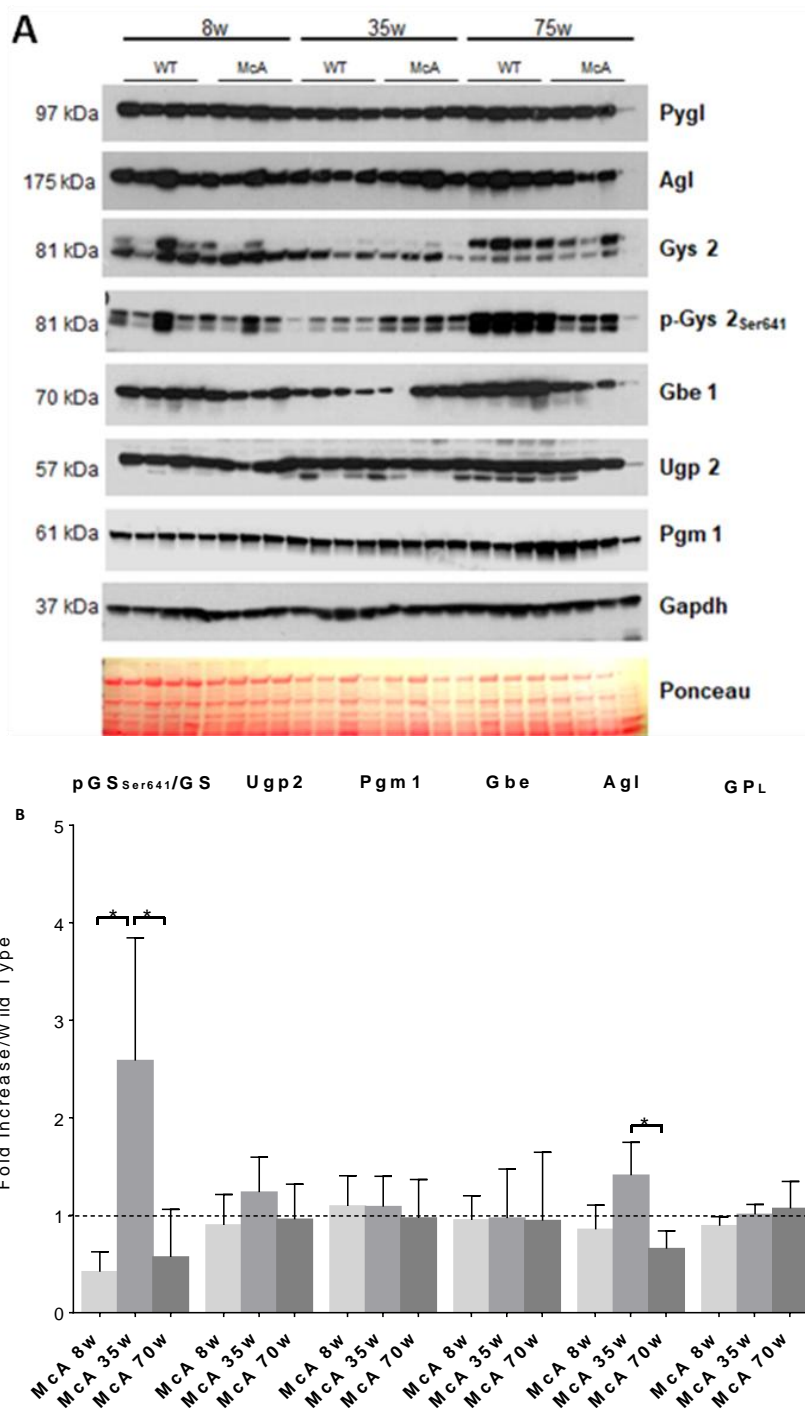


Figura 86. Estudio longitudinal de la síntesis y degradación del glucógeno en hígado de ratones WT y McA de 8, 35 y 70 semanas de edad. Las muestras proceden de extractos de tejido hepático de ratones de 8, 35 y 70 semanas de edad. Los niveles de las enzimas p-GS Ser 641, GS, UGP2, Pgm1, GBE, AGL y GP-L se analizaron mediante *western blot* con sus anticuerpos específicos respectivos. Se muestran imágenes representativas de los *western blots* realizados (Fig. 86 A). Los gráficos muestran la cuantificación de los resultados obtenidos, representando la variabilidad de cada individuo agrupándola por ratones McA respecto de los WT de 8 semanas de edad (Fig. 86 B). Cada columna representa la cuantificación relativa de cada grupo de edad de ratones McA con respecto a los WT de 8 semanas de edad. Las barras de error corresponden a SD. Para el análisis estadístico se utilizó el test no paramétrico *Kruskal Wallis* ANOVA de una vía con el test de comparaciones múltiples (*Dunn's test*). Los asteriscos representan un p valor <0,05.

4.18 Estudio metabólico del tejido adiposo de ratones McArdle

Para el estudio metabólico del tejido adiposo de ratones McA, nos hemos centrado en el estudio de tres rutas de obtención y almacenamiento de energía, el almacenamiento y degradación del glucógeno, la regulación de la ruta de la glucólisis y la oxidación de ácidos grasos.

4.18.1 Menor síntesis de glucógeno en el tejido adiposo de los ratones McArdle jóvenes

La alteración intrínseca que provoca la enfermedad de McArdle en el metabolismo del glucógeno, así como resultados previos de nuestro grupo de investigación que evidencian un comportamiento distinto de los ratones McA y los WT en el metabolismo de esta molécula,^[308-310, 335, 357] nos han llevado al estudio del estado de almacenamiento y utilización del glucógeno en el tejido adiposo de ratones McA de 20 semanas de edad. En este sentido, teniendo en cuenta que el tejido adiposo regula la homeostasis de la glucosa,^[203-205] y que los resultados obtenidos en el estudio anatómico y bioquímico de los ratones McA revelan importantes alteraciones en los mismos (**apartado 4.3**), este estudio cobra especial importancia para determinar el grado de implicación de este tejido en mecanismos compensatorios a través, por ejemplo, de la posible sobreexpresión de isoformas de la enzima GP tales como la GP-B,^[281, 301] en tejido adiposo de ratones McA.

El análisis de las enzimas implicadas en el almacenamiento y utilización del glucógeno se realizó mediante *western blot*, utilizando extractos de tejido adiposo de ratones WT y McA de 20 semanas de edad.

Los datos obtenidos en este estudio, revelan una tendencia casi significativa de los ratones McA a presentar menores niveles de la enzima GYS-1 que los WT. Para el resto de enzimas analizadas, GBE, GPBB y AGL, no existen diferencias importantes en los niveles que presentan ambos genotipos (**Fig. 87**).

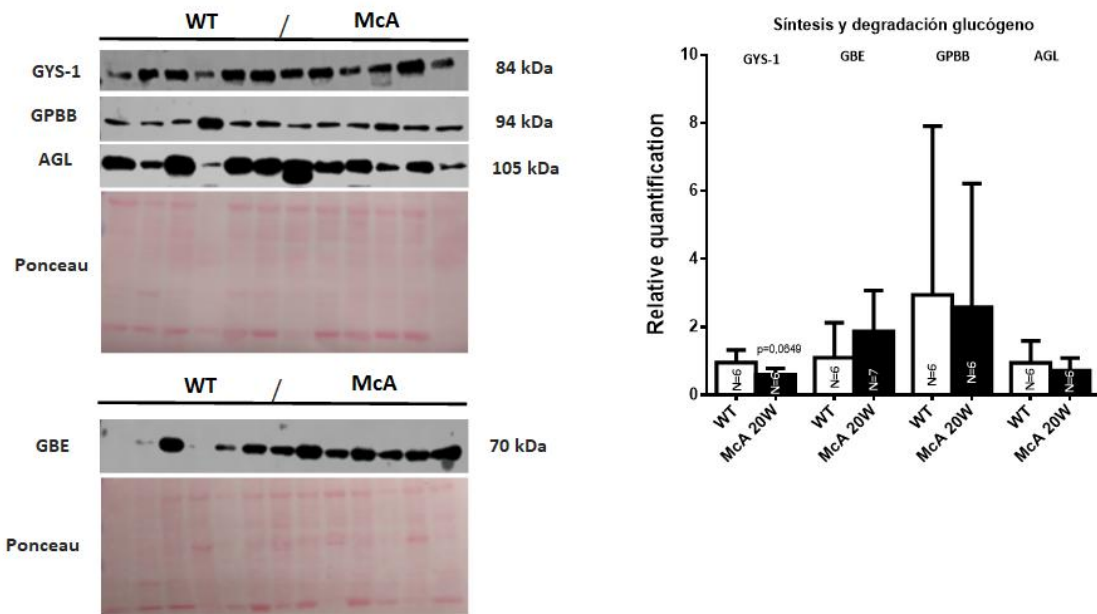


Figura 87. Análisis mediante *western blot* de los niveles de proteína de las enzimas GYS-1, GPBB, AGL y GBE en tejido adiposo de ratones WT y McA de 20 semanas de edad. Las imágenes de los *westerns* se detectaron mediante *Odyssey Fc* y se cuantificaron mediante el programa *Image Studio Software 5.x*. Se muestran imágenes recortadas. Los resultados de las cuantificaciones relativas para las proteínas objeto de estudio provienen del cociente con la cuantificación previa del Ponceau mediante el programa *Image J*. Cada columna representa la cuantificación relativa para cada enzima y genotipo estudiado. El número de ratones utilizado para la cuantificación se indica en la parte inferior de cada columna. Las barras de error corresponden a SD. Para el análisis estadístico se utilizó el test no paramétrico *Mann-Whitney*.

Estos resultados sugieren que el tejido adiposo de los ratones McA de 20 semanas de edad está sintetizando menor cantidad de glucógeno para su almacenamiento, que el de los WT de la misma edad.

4.18.2 No hay mayor captación de glucosa en el tejido adiposo de los ratones McArdle jóvenes

La caracterización previa del modelo murino de la enfermedad de McArdle en distintos músculos^[334, 340-342] así como los resultados obtenidos en el estudio del almacenamiento y utilización del glucógeno en el tejido adiposo de los ratones McA, que revelan alteraciones en la regulación de la ruta de la glucólisis y una menor síntesis de glucógeno respectivamente, nos han llevado al estudio de la regulación de esta vía también en el tejido adiposo, con el fin de identificar posibles diferencias entre los ratones WT y McA.

El análisis de las enzimas implicadas en la regulación de la glucólisis se realizó mediante *western blot*, utilizando extractos de tejido adiposo de ratones WT y McA de 20 semanas de edad.

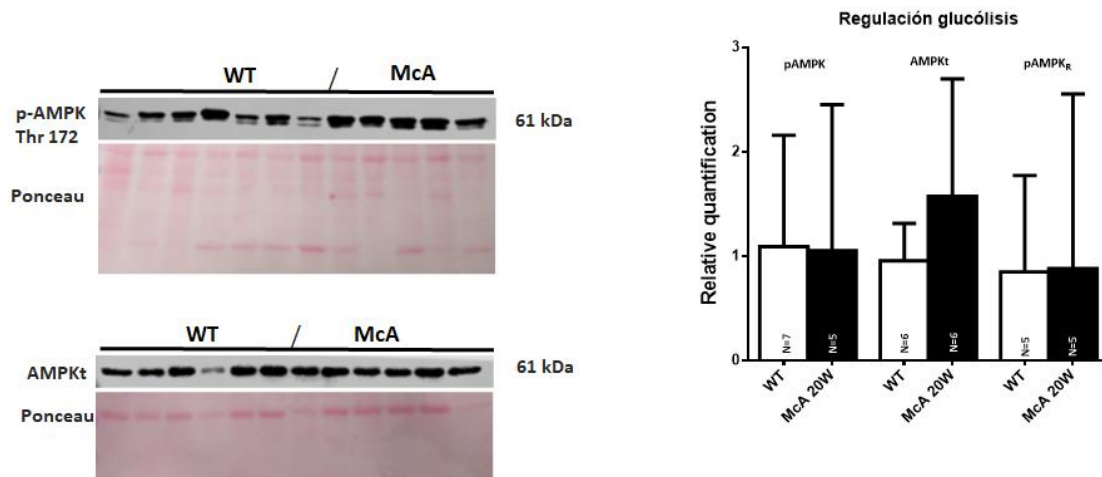


Figura 88. Análisis mediante *western blot* de los niveles de proteína de las enzimas p-AMPK Thr 172 y AMPKt en tejido adiposo de ratones WT y McA de 20 semanas de edad. Las imágenes de los *westerns* se detectaron mediante *Odyssey Fc* y se cuantificaron mediante el programa *Image Studio Software 5.x*. Se muestran imágenes recortadas. Los resultados de las cuantificaciones relativas para las proteínas estudiadas provienen del cociente con la cuantificación previa del Ponceau mediante el programa *Image J*. Cada columna representa la cuantificación relativa para cada enzima y genotipo estudiado. El número de ratones utilizado para la cuantificación se indica en la parte inferior de cada columna. Las barras de error corresponden a SD. Para el análisis estadístico se utilizó el test no paramétrico *Mann-Whitney*.

Los datos obtenidos en el estudio de las enzimas AMPKt y p-AMPK así como de la ratio entre ambas, en el tejido adiposo de ratones WT y McA de 20 semanas de edad, no revelan diferencias destacables entre ambos genotipos (**Fig. 88**).

Así, los resultados obtenidos en el estudio de la regulación de la glucólisis en el tejido adiposo de ratones McA de 20 semanas de edad, sugieren que este tejido no está captando mayor cantidad de glucosa a través de la activación de AMPK, que el de los WT y, por tanto, la glucólisis en los ratones McA no presenta alteraciones a través de estas enzimas.

4.18.3 Mayor utilización de ácidos grasos procedentes del tejido adiposo con la edad en los ratones McArdle

La capacidad que tiene el tejido adiposo para exportar ácidos grasos libres en situaciones de carencia energética, podría ayudar a paliar la imposibilidad de obtener energía con la degradación de glucógeno, presente en la enfermedad de McArdle.^[203-205] Como los resultados obtenidos anteriormente indicarían que el músculo está utilizando una mayor cantidad de ácidos grasos procedentes del torrente sanguíneo, realizamos un estudio de expresión de las principales enzimas implicadas en la oxidación de ácidos grasos en el tejido adiposo.

Para el análisis de dichas enzimas se realizó la técnica de *western blot*, utilizando extractos proteicos de tejido adiposo de ratones WT y McA de 20 y 70 semanas de edad.

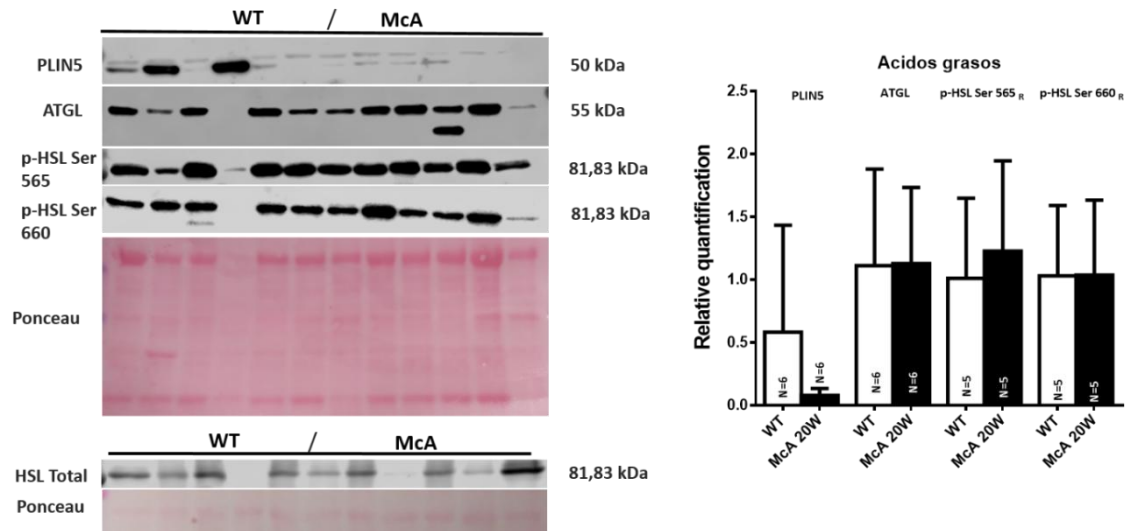


Figura 89. Análisis mediante *western blot* de los niveles de proteína de las enzimas PLIN5, ATGL, HSL total, p-HSL Ser 565 y p-HSL Ser 660 en tejido adiposo de ratones WT y McA de 20 semanas de edad. Las imágenes de los *westerns* se detectaron mediante *Odyssey Fc* y se cuantificaron mediante el programa *Image Studio Software 5.x*. Se muestran imágenes recortadas. Los resultados de las cuantificaciones relativas para las proteínas estudiadas provienen del cociente con la cuantificación previa del Ponceau mediante el programa *Image J*. Cada columna representa la cuantificación relativa para cada enzima y genotipo estudiado. El número de ratones utilizado para la cuantificación se indica en la parte inferior de cada columna. Las barras de error corresponden a SD. Para el análisis estadístico se utilizó el test no paramétrico *Mann-Whitney*.

Los resultados obtenidos en el estudio de enzimas que participan en la degradación de ácidos grasos en el tejido adiposo de ratones de 20 semanas de edad, revelan menores niveles de proteína de la enzima PLIN5 en ratones McA que en WT, sin que sean significativas las diferencias, sin embargo, para el resto de enzimas analizadas, ATGL, p-HSL Ser 565, p-HSL Ser 660 y HSL total, no se aprecian diferencias en los niveles que presentan ambos genotipos (Fig. 89).

En cuanto al análisis de esas enzimas tanto en ratones WT como McA de 70 semanas de edad, podemos destacar los mayores niveles proteicos de la enzima PLIN5 y de la forma activa de la enzima HSL (p-HSL Ser 660), siendo más significativa la diferencia en esta última, así como niveles significativamente menores de la forma inactiva de la enzima HSL (p-HSL Ser 565), en los ratones McA que en los WT, no apreciándose diferencias en los niveles de la enzima ATGL entre los dos genotipos estudiados (Fig. 90).

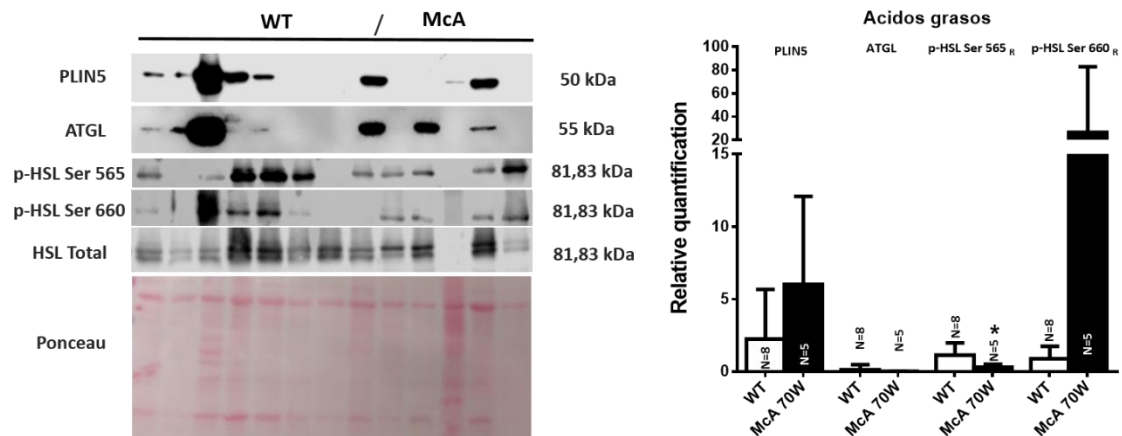


Figura 90. Análisis mediante *western blot* de los niveles de proteína de las enzimas PLIN5, ATGL, HSL total, p-HSL Ser 565 y p-HSL Ser 660 en tejido adiposo de ratones WT y McA de 70 semanas de edad. Las imágenes de los *westerns* se detectaron mediante *Odyssey Fc* y se cuantificaron mediante el programa *Image Studio Software 5.x*. Se muestran imágenes recortadas. Cada columna representa la cuantificación relativa para cada enzima y genotipo estudiado. El número de ratones utilizado para la cuantificación se indica en la parte inferior de cada columna. Las barras de error corresponden a SD. Para el análisis estadístico se utilizó el test no paramétrico *Mann-Whitney*. Los asteriscos representan un p valor <0,05.

Los resultados obtenidos en el estudio metabólico realizado en ratones de 70 semanas de edad, indicarían que los ratones McA estarían utilizando una mayor cantidad de ácidos grasos procedentes del tejido adiposo según avanza la enfermedad, como se deduce tanto de los mayores niveles de la forma activa de la enzima HSL (p-HSL Ser 660) como de los niveles significativamente menores de su forma inactiva (p-HSL Ser 565) que estos ratones presentan.

5. Discusión

La enfermedad de McArdle afecta directamente al metabolismo del glucógeno muscular, provocando en los enfermos una acumulación anormal de este polisacárido en el músculo esquelético y a su vez, al ser incapaces de degradarlo, una falta de energía que les ocasiona importantes dificultades para realizar ejercicio.^[307, 309, 312] Para su estudio, nuestro grupo de investigación desarrolló un modelo de ratón portador de la mutación *p.R50X* en el gen *Pygm*, la más común entre la población Caucásica, que presenta las principales características fenotípicas e histológicas de esta patología y que permite por tanto, un estudio más completo y detallado de las particularidades de la enfermedad, así como la posibilidad de desarrollar en un futuro estrategias terapéuticas de cara a la cura de esta miopatía metabólica.^[310-312]

Los estudios previos publicados por nuestro grupo han profundizado principalmente en la caracterización del modelo murino en ratones de 20 semanas de edad y han revelado que los ratones McA presentan a nivel histológico diferencias tanto en el tamaño de sus fibras musculares, con presencia de vacuolas donde se acumulan grandes cantidades de glucógeno y que en última instancia deriva en la desestructuración de las mismas, como en la presencia de una gran cantidad de núcleos centrales en ellas, que son consecuencia de los sucesivos procesos de degeneración/regeneración provocados por la acumulación de este polisacárido.^[334, 388] Así mismo, a nivel metabólico estos estudios han demostrado que la falta de la enzima GP-M en los músculos de los ratones McA no es contrarrestada por la expresión de las isoformas hepática o cerebral de la misma, GP-L y GP-B respectivamente, y que existen diferencias en el grado de afectación de los distintos músculos estudiados, derivadas de la dependencia de éstos de la enzima GP-M, de su capacidad para obtener energía mediante mecanismos alternativos que compensen su déficit así como de su composición en tipos de fibras.^[334, 335, 388] Finalmente, la caracterización previa de este modelo animal para la enfermedad de McArdle también ha revelado diferencias en el comportamiento de ciertos músculos en relación con su adaptación al ejercicio mediante la captación de glucosa del torrente sanguíneo y su posterior almacenamiento en forma de glucógeno.^[312, 357, 378, 388]

Basándonos en los resultados obtenidos en trabajos previos de nuestro grupo, con el presente estudio hemos querido seguir profundizando en las características fisiopatológicas de esta enfermedad a través del seguimiento de la colonia de ratones McA, de un análisis más detallado de las diferencias observadas y previamente descritas, del grado de afectación de los distintos músculos, de la evaluación de la importancia de posibles mecanismos

compensatorios ante la falta de energía muscular y del estudio del efecto del envejecimiento en la progresión fenotípica de la enfermedad.^[310-312, 334, 335, 357, 378, 388]

Así, a través del estudio de los diferentes cruces de ratones de distintos genotipos y de sus respectivas crías hemos recabado suficientes datos para afirmar que el manejo de la colonia de ratones McA presenta importantes dificultades. Éstas son causadas por la elevada tasa de mortalidad perinatal y tras el destete que presentan estos ratones, periodo que comprende aproximadamente los 100 primeros días de vida de los mismos, que contrasta con lo observado en pacientes con esta enfermedad, para los que sólo existe constancia de dos casos de forma infantil fatal.^[399, 400] Estos casos se produjeron en bebés de 16 días y 13 semanas de edad^[399, 400] y en los que la enfermedad se presentaba asociada a hipotonía,^[399] deficiencias respiratorias^[399, 400] y debilidad generalizada.^[400] Hasta el momento no hemos sido capaces de identificar las causas que provocan la alta tasa de mortalidad de la colonia de ratones McA, ni si éstas están relacionadas con las aquí descritas para los dos casos observados de forma infantil fatal de la enfermedad de McArdle, aunque consideramos probable que esta circunstancia pueda solucionarse si se separan las crías con la enfermedad de McArdle del resto de la camada y se añade una hembra para la lactancia exclusiva de las mismas. De esta forma, se podría reducir el riesgo asociado a las peleas que se producen por la comida entre crías de la misma camada, en las que aquellas que presentan la enfermedad de McArdle se verían en desventaja dada su condición de más débiles. Así mismo, consideramos que un cambio de *background* nuclear, del actual C57Bl6J a otro, podría ayudar también a mitigar esta alta tasa de mortalidad observada.

El estudio anatómico y bioquímico realizado posteriormente, que podría ayudarnos a comprender si las alteraciones que provoca la evolución de la enfermedad de McArdle tienen un reflejo en la estructura y metabolismo de ciertos órganos y tejidos, nos muestra claras diferencias entre los ratones McA y los WT. A nivel anatómico se observa que los ratones McA tanto de 20 como de 70 semanas de edad presentan de forma significativa una menor acumulación de grasa abdominal, peso relativo de ésta, menor peso del corazón, peso del hígado y peso corporal únicamente en los de 70 semanas, y significativamente un mayor peso relativo del hígado en los de 20 semanas, respecto a los ratones WT de los mismos grupos de edad. Este descenso contrasta con el mayor peso corporal, peso de la grasa abdominal, peso relativo de la misma y peso del hígado observado de forma significativa en los ratones WT de 70 semanas con respecto a los de 20 semanas de edad. Estos resultados sugieren que los ratones McA están utilizando tanto ácidos grasos procedentes del tejido adiposo como

probablemente glucógeno del hígado, para compensar el déficit energético provocado por la enfermedad.

Así mismo, si tenemos en cuenta que en general la masa y la longitud de los distintos músculos analizados (*soleus*, GAST, EDL, TA y QUAD) en los ratones de 20 y 70 semanas de edad no presentan diferencias entre ambos genotipos, podemos inferir que los ratones McA están utilizando todos los recursos energéticos disponibles tanto del tejido adiposo como del hígado para intentar conservar al máximo la estructura y anatomía del tejido muscular, que resulta de vital importancia para el organismo. En este sentido, tal y como se ha descrito previamente, el tejido muscular es el responsable del movimiento y sostén de los órganos y, en concreto, el músculo esquelético juega un papel importante en este aspecto ya que representa el 45 % de la masa corporal en un individuo adulto,^[1, 2, 4] tras lo que subyace la idea de un mecanismo compensatorio que ayude a los ratones McA a sobrellevar la enfermedad. Estos resultados contrastan con los obtenidos en estudios anatómicos previos de ratones de entre 16 y 20 semanas de edad, en los que no se habían descrito diferencias significativas entre los ratones McA y los WT y HTZ de la misma edad, en relación con su masa corporal y el tamaño de los distintos músculos estudiados.^[334] La posible explicación para que en estos estudios previos no se llegaran a observar las diferencias que aquí se describen, podría encontrarse en la propia edad de los ratones analizados, ya que como hemos descrito previamente, no es hasta la semana 30 cuando empiezan a observarse diferencias importantes en la masa corporal entre genotipos.

A nivel bioquímico también se observan importantes diferencias entre los ratones McA y los WT. Los niveles significativamente menores de insulina y lactato observados en los ratones McA de 70 semanas, así como los de glucosa en sangre en los ratones McA de ambos grupos de edad, indicarían una mayor captación de glucosa de los ratones McA respecto de los WT, resultados que coinciden con los observados en el estudio de Brull *et al.*^[378] y que contrastan con los obtenidos en estudios previos de pacientes con la enfermedad de McArdle, en los que la mayor captación de glucosa sólo es observable durante la realización de ejercicio.^{[308, 309, [357]}

Así mismo, la tendencia a presentar mayores niveles de amonio en sangre por parte de los ratones McA de 70 semanas que los WT de ese mismo grupo de edad, puede ser consecuencia de los altos niveles de activación de la enzima AMPK, que como se ha descrito previamente presentan los ratones McA.^[334, 340-342] En este sentido, la existencia de estrés energético que produce la elevación de los niveles de esta enzima de forma basal en los ratones McA, estaría relacionado con el aumento de amonio dado que al no poder resintezarse el ATP utilizarían

dos moléculas de ADP que se podrían combinar para intentar contrarrestar esta carencia, en cuya reacción se produciría AMP que mediante deaminación por parte de la AMPD resultaría en la producción de amonio.^[378] Este excedente de amonio podría ser utilizado, en última instancia, para producir piruvato en el hígado de los ratones McA. En esta línea, los grupos amino en el músculo serían transformados en glutamato mediante transaminación, posteriormente la enzima alanina amino transferasa (ALT) transformaría el piruvato en alanina, que podría ser exportada a la sangre y captada por el hígado. Una vez en éste y de nuevo mediante la enzima ALT, se produciría piruvato a partir de la alanina captada, que podría ser transformado en glucosa a través de la gluconeogénesis y así ser exportada desde el hígado para abastecer de nuevo al tejido muscular.^[401] En conjunto, las diferencias que presentan para ambos genotipos y grupos de edad estudiados, los niveles de estos tres parámetros, insulina, glucosa y amonio en sangre, podrían apoyar la idea de la activación de vías alternativas de obtención de energía en los ratones McA, en este caso para la captación de la mayor cantidad posible de glucosa del torrente sanguíneo, su degradación y posterior uso vía glucólisis en el tejido muscular, como así mismo sugieren los resultados descritos previamente de una mayor activación del transportador GLUT4 en ciertos tipos de fibras musculares de los ratones McA. Sin embargo, las únicas diferencias que se han observado a nivel bioquímico en pacientes con la enfermedad de McArdle respecto de las personas sanas, están directamente relacionadas con el ejercicio. Así, en estudios de Nielsen *et al.* se ha observado que los niveles de glucosa en sangre, insulina, ácidos grasos libres, glicerol, adrenalina y noradrenalina en condiciones basales, son similares para personas sanas y pacientes con la enfermedad de McArdle, y sólo se aprecian mayores niveles de adrenalina y noradrenalina en los pacientes de McArdle respecto de los individuos sanos, tras la realización de ejercicio.^[357] En estos mismos estudios y también en contraposición con lo observado en ratones McA, se ha puesto de manifiesto que los niveles de lactato en sangre en condiciones de reposo eran similares en los pacientes con la enfermedad de McArdle y en los individuos sanos.^[357] De esta forma, las diferencias observadas entre ratones McA y pacientes con dicha enfermedad podría deberse a que en los primeros, el fenotipo de la enfermedad es mucho más severo que en humanos,^[335] quizás por presentar un metabolismo más acelerado que éstos.^[335] Así, la idea de un mecanismo compensatorio que pueda actuar para revertir o mitigar la situación metabólica derivada de la enfermedad de McArdle, podría ser mucho más sutil en el caso de los humanos y más evidente en el de los ratones McA.

Una vez analizada la afectación anatómica y bioquímica de los ratones McA, procedimos a estudiar como ésta afectaba a nivel estructural a los distintos tipos de músculos, utilizando para ello músculos oxidativos, como el *soleus*, mixtos como el GAST, y glucolíticos como el EDL, el QUAD y el TA ^[19, 51] y extendiendo este estudio a los grupos de edad de 8, 35 y 70 semanas para tener una visión más amplia de la progresión fenotípica de la enfermedad. Así realizamos un estudio histológico longitudinal y la cuantificación del área fibrótica de los músculos y grupos de edad previamente mencionados, tanto en ratones McA como en WT. Los resultados obtenidos muestran fibras desestructuradas con una gran variabilidad de tamaño y que contienen vacuolas y NC, así como mayor proporción del área de ECM, en los ratones McA comparados con los WT y en todos los grupos de edad, extremos que resultan más evidentes según avanza la enfermedad. Estos resultados se asemejan a los observados en pacientes con la enfermedad de McArdle en cuanto a la afectación estructural que presentan, la presencia de CNF y la variabilidad del tamaño de sus fibras musculares y sin embargo, difieren de los mismos en que estos pacientes carecen de fibras necrosadas o altamente degeneradas así como de procesos de fibrosis.^[335] Por lo que estos resultados sugieren una exacerbación de los síntomas en este modelo animal con respecto a los pacientes McArdle, hecho que ya se ha postulado en estudios anteriores.^[335]

Así mismo, los resultados obtenidos en este estudio muestran que existen diferencias en el grado de afectación que presentan los distintos músculos estudiados. Por una parte, el QUAD (músculo glucolítico) y el *soleus* (músculo oxidativo) parecen ser más capaces de mantener su estructura, con una menor presencia de NC en el caso del primero, y con una degeneración menos evidente en ambos músculos que en el resto de músculos estudiados, según avanza la enfermedad, pero mientras que el primero no se ve excesivamente afectado por procesos de fibrosis con dicho avance, el segundo sí que parece sufrir un incremento de estos procesos con la evolución de la misma, como muestran tanto las imágenes tomadas de las inmunofluorescencias para los marcadores específicos de la ECM como la cuantificación del área fibrótica, que para el *soleus* presenta una proporción significativamente mayor en ratones McA que en los WT, para el grupo de 70 semanas de edad, lo que evidencia la progresión fenotípica de la enfermedad. Por otra parte, el GAST (músculo metabólicamente intermedio), el EDL (músculo glucolítico) y el TA (músculo glucolítico) muestran signos más evidentes de desestructuración morfológica temprana y progresiva, con una mayor presencia de NC y diferencias en el tamaño y degeneración de las fibras musculares, que pueden observarse tanto en las imágenes histológicas como en las inmunofluorescencias para los marcadores

específicos de la ECM, de ratones McA y WT, de 8, 35 y 70 semanas de edad , y que así mismo ha sido sugerida por la cuantificación del área fibrótica realizada tanto en EDL como en TA, en la que las proporciones obtenidas para los ratones McA son mayores respecto a las correspondientes a los WT, en todos los grupos de edad objeto de estudio. En este sentido, resultados de estudios previos de Krag *et al.* en los que se observaba una mayor expresión de *Pygm* en el músculo TA que en el QUAD de ratones WT, así como una mayor presencia de fibras tipo IIb en el QUAD que favorecería una captación de glucosa más dependiente de AMPK que en el músculo TA, podrían ayudar a comprender por qué músculos como este último se ven estructuralmente más afectados que el QUAD, debido a su mayor dependencia de la enzima GP-M, mayores niveles de glucógeno acumulado y una capacidad menor para obtener energía mediante la glucólisis.^[334]

Los resultados obtenidos en el posterior estudio longitudinal de la capacidad regenerativa de los cinco músculos objeto también del estudio anterior, mediante la cuantificación de NC como marcadores de los procesos de degeneración/regeneración en el tejido muscular,^[4, 99-101] evidencian claras diferencias en los ratones McA con respecto a los WT, así como las ya observadas en el grado de afectación de estos músculos. En este caso, los músculos QUAD, EDL y *soleus* de ratones McA de 8 semanas de edad muestran menores porcentajes de CNF que los músculos GAST y TA y, por tanto, menor afectación en este grupo de edad. Si atendemos ahora a la afectación de estos músculos según evoluciona la enfermedad, observando para ello los ratones de 70 semanas de edad, encontramos que el QUAD es el único músculo que mantiene prácticamente su porcentaje de CNF, en tanto que los músculos EDL, *soleus* y GAST sufren un incremento progresivo de sus respectivos porcentajes y el músculo TA un descenso del suyo. Así, estas diferencias en la capacidad regenerativa de los distintos músculos confirmarían que el QUAD es el músculo menos afectado por la enfermedad de McArdle, como ya se ha postulado en estudios previos^[334, 335, 388], así como que el *soleus* es capaz de resistir sucesivos procesos de degeneración/regeneración según avanza la enfermedad, sin verse especialmente afectado en comparación con los músculos EDL, GAST y TA. Esta resistencia observada en el *soleus* podría estar íntimamente relacionada con su composición en tipos de fibras, no en vano es el único músculo de los estudiados que presenta un metabolismo puramente oxidativo^[19, 51] y esta particularidad podría ser clave para entender su capacidad para evitar la gran afectación observada en músculos tales como el EDL, GAST y TA. En esta línea, el estudio longitudinal del tamaño promedio de las fibras musculares, que también aporta información sobre los procesos de degeneración/regeneración,^[61, 62] indica que las fibras musculares tanto del QUAD

como del *soleus* parecen verse menos afectadas por la progresión de la enfermedad de McArdle al presentar un aumento de su tamaño promedio según avanza la misma, mientras que las fibras de los músculos EDL, GAST y TA, cuyo tamaño promedio desciende según avanza la enfermedad, se verían más afectadas por esta evolución. De lo anterior podemos deducir que a nivel estructural, los músculos con una mayor presencia de fibras de metabolismo más extremo, entiéndase más oxidativas o más glucolíticas, como es el caso del músculo *soleus* que presenta una mayor proporción de fibras tipo I puramente oxidativas, y el del QUAD, con una mayor proporción de fibras mixtas tipo IIx/IIb y un metabolismo preferentemente glucolítico [19, 31, 43-45, 47, 51], tienen una mayor capacidad para resistir los efectos fenotípicos de la evolución de la enfermedad de McArdle [388]. Sin embargo, los pacientes con la enfermedad de McArdle, al carecer el ser humano de fibras tipo IIb, podrían no presentar esta capacidad de resistencia a la degeneración según avanza la enfermedad en músculos con un metabolismo glucolítico, limitando así la respuesta que éstos presentarían al daño muscular producido por la misma. [337, 338]

En conjunto, los resultados anteriores confirman el diferente grado de afectación de los distintos músculos en la enfermedad de McArdle, siendo éste independiente del carácter metabólico que presenten, y muestran que con la evolución de la misma, el grado de afectación es menor en el QUAD y en el *soleus* que en el resto de músculos estudiados, como ya indicaban estudios transversales previos. [334, 335] Por una parte, el QUAD no parece verse especialmente afectado con la evolución de la enfermedad ni a nivel estructural ni por procesos de fibrosis, manteniendo un porcentaje similar de CNF y presentando un aumento del tamaño promedio de sus fibras con la edad. Por otra parte, el *soleus* pese a estar progresivamente más afectado por procesos de fibrosis y presentar una mayor proporción de CNF en ratones McA de 70 semanas de edad que cualquiera de los otros músculos estudiados, presenta un aumento importante del tamaño promedio de sus fibras musculares con la evolución de la enfermedad y parece mantener en términos generales su estructura, demostrando así que sus fibras no parecen sucumbir a la degeneración muscular. En cuanto a los músculos EDL, TA y GAST, éstos muestran un daño estructural más evidente con la evolución de la enfermedad, viéndose afectados tanto por procesos de fibrosis, como es el caso de los dos primeros, como por degeneración muscular, como demuestra el descenso del tamaño promedio de sus fibras musculares, siendo más evidente éste en el caso del TA. Así, atendiendo a la cronicidad de la enfermedad, el descenso de la proporción de CNF que se

observa en este músculo con la edad, parece responder a un comportamiento similar al que muestran ciertas patologías crónicas como las distrofias.^[106]

Cuando realizamos un estudio estructural longitudinal de manera más profunda de los músculos *soleus*, EDL y TA, mediante marcadores específicos de sus tipos de fibras, los resultados obtenidos confirman nuevamente los observados en estudios transversales previos, es decir, una menor afectación de las fibras tipo I y mixtas IIx/IIb con la evolución de la enfermedad y, por el contrario, una mayor afectación de las fibras tipo IIa, IIx y mixtas IIa/IIx.^[334, 340-342] Estas diferencias observadas tanto en el grado de afectación como en los procesos de regeneración activos para los distintos tipos de fibras y músculos estudiados, son factores que influirán en la proporción de fibras presentes en cada uno de ellos según avanza la enfermedad de McArdle. Los resultados del estudio proteómico realizado por Murgia *et al.*,^[47] que muestran diferencias en el contenido proteómico de los distintos tipos de fibras, así como estudios previos de nuestro grupo, que han demostrado que en ratones McA las fibras tipo I presentan una menor acumulación de glucógeno que las fibras tipo II y que en músculos oxidativos como el *soleus* existe una menor acumulación de esta molécula que en músculos glucolíticos como el EDL y el GAST,^[312, 378] podrían ayudar a entender la evolución de la proporción de los distintos tipos de fibras según avanza la enfermedad.

En este contexto y según nuestro estudio, las fibras tipo I presentan, según avanza la enfermedad, un aumento de su tamaño promedio en el músculo *soleus*, así como un aumento de su proporción y de la proporción de NC en los tres músculos estudiados, *soleus*, EDL y TA. Estos resultados evidencian que las fibras tipo I presentan un aumento de su proporción tanto en músculos oxidativos como glucolíticos, presentando por tanto resistencia a los procesos de degeneración provocados por la enfermedad de McArdle, con independencia del tipo metabólico del músculo en que se encuentren. Esta afectación diferencial de los distintos tipos de fibras también se ha observado en el envejecimiento, con los efectos de la Sarcopenia^[66-69], y en otras miopatías tales como la distrofia muscular de Duchenne, la distrofia facioescapulohumeral, la distrofia miotónica tipo 2 y la enfermedad de Pompe, siendo en todas ellas las fibras tipo I las menos afectadas.^[52-60] En este sentido, se ha postulado que quizás esta característica de las fibras tipo I sea debida a la presencia de la proteína utrofina, que estructuralmente tendría una función similar a la distrofina, compensando así su déficit en enfermedades tales como la distrofia muscular de Duchenne.^[151-153] Así mismo, en estudios de contracción muscular en modelo de ratón de la enfermedad de McArdle, también se ha demostrado que las fibras tipo I son las menos afectadas en relación con la pérdida de fuerza

de contracción, hecho que sin embargo no reproducen los pacientes con dicha enfermedad.^[334] Las fibras tipo II (Desciende el tamaño tanto en las IIa como en las IIx por eso he puesto de forma genérica en las fibras tipo II, sí que es cierto que entre 8 y 70 semanas solo es significativo el descenso en el tamaño de las fibras tipo IIa, lo pongo así??), por su parte, muestran un descenso de su tamaño promedio en el músculo *soleus* con la evolución de la enfermedad de McArdle, así como un aumento de la proporción de NC en el caso de las IIa, presentando también éstas últimas un descenso de su proporción, en los tres músculos estudiados, *soleus*, EDL y TA, con el avance de la enfermedad, lo que contrasta con la tendencia al aumento observado para la proporción de fibras tipo IIx/IIb en el músculo TA. En este sentido, la distribución de los distintos tipos de fibras en los músculos estudiados podría influir en el distinto grado de afectación que éstos presentan, como se ha descrito previamente.^[334] Así, los músculos TA y QUAD presentan una gran cantidad de fibras tipo IIx, que en el músculo TA aparecen ligadas a las tipo IIa, formando fibras mixtas tipo IIa/IIx, en mayor proporción que en el QUAD, siendo mayor en éste la proporción de fibras IIa puras. Así mismo, la proporción de fibras tipo IIa en TA es menor en ratones McA que en los WT, de forma contraria a lo observado en el músculo QUAD, en el que también las fibras tipo IIb presentan mayor proporción que en el músculo TA de los ratones McA.^[334] Por otra parte, se ha observado que la acumulación de glucógeno en las fibras mixtas tipo IIx/IIb es mayor cuanto mayor sea la proporción de fibras tipo IIx que posean,^[334] evidenciando así que el daño asociado a esta acumulación afecta de forma diferente a músculos tales como el TA y el QUAD. Sin embargo, los músculos humanos tienen menor proporción de fibras de tipo mixto y los pacientes de McArdle no parecen presentar una afectación derivada de la acumulación de glucógeno en un tipo específico de fibras,^[334] lo que explicaría ciertas diferencias observadas entre el modelo murino y estos enfermos.

Las diferencias observadas entre los distintos tipos de fibras mencionadas, tanto en su grado de afectación como en su proporción, tamaño promedio y proporción de NC, son así mismo observables en el estudio de los procesos de regeneración activos en ellas y de la capacidad de regeneración de las mismas. Así, tanto en el *soleus* como en el TA, las fibras tipo IIa, IIx y mixtas IIa/IIx co-localizan con el marcador MHCE, característico de procesos de regeneración activos,^[20] hecho que no sucede en el resto de fibras analizadas; si bien es cierto que la proporción de fibras positivas para este marcador descende en los tres músculos estudiados, *soleus*, TA y QUAD, según avanza la enfermedad. Este descenso podría ser explicado teniendo en cuenta por un lado el descenso de la proporción de fibras tipo IIa y IIa/IIx que se produce

con la edad tanto en el músculo *soleus* como en el TA, que si bien no es significativo en ninguno de los dos casos, podría afectar a la proporción final de fibras que presentan un marcaje positivo para el marcador MHCE, y por otro lado, el agotamiento de la capacidad de regeneración que puedan presentar estos tipos de fibras como consecuencia de los sucesivos procesos de degeneración/regeneración sufridos, al ser tipos de fibras que se ven especialmente afectadas por la enfermedad de McArdle. Este agotamiento de la capacidad regenerativa de las fibras musculares ya ha sido asociado a enfermedades crónicas tales como las distrofias, y como consecuencia de la senescencia de las células satélite,^[111-114] e incluso con la presencia de células inflamatorias de forma masiva como los macrófagos,^[66, 118-122] cuya acumulación hemos observado también en los músculos TA y QUAD de ratones McA. Estos resultados contrastan con lo observado en pacientes con la enfermedad de McArdle, para los que no se han observado fibras musculares positivas para el marcador MHCE, lo que sugiere que en humanos la tasa de regeneración es más baja,^[334] poniéndose de nuevo de manifiesto que en el modelo murino el fenotipo de la enfermedad está más acentuado.

Por lo anteriormente expuesto, el estudio estructural longitudinal de los ratones McA indicaría que las fibras tipo I en músculos oxidativos, como el *soleus*, y mixtas IIx/IIb en músculos glucolíticos, como el QUAD, podrían estar ejerciendo un papel protector frente a la evolución de la enfermedad. Así, ambos tipos de fibras son capaces de preservar su estructura según avanza la enfermedad, manteniendo su proporción las tipo IIx/IIb y aumentando ésta así como su tamaño en las tipo I. Estas evidencias a su vez, sugieren que los músculos que albergan fibras con un metabolismo más “puro” están más protegidos ante la evolución de la enfermedad. En el caso del músculo *soleus*, la presencia de una proporción mayoritaria de fibras tipo I, siempre por encima del 40%, de metabolismo puramente oxidativo, ayudaría a mitigar los efectos de la enfermedad a largo plazo, protegiendo al músculo frente a la desestructuración y la degeneración. En músculos glucolíticos tales como el EDL, el TA y el QUAD, este papel sería desarrollado por las fibras mixtas IIx/IIb, que aunque no son puramente glucolíticas sí que presentan este tipo de metabolismo de forma preferente. Se debe hacer una mención especial al caso del QUAD, ya que su menor afectación por la enfermedad de McArdle con respecto al resto de músculos estudiados, puede deberse precisamente a la gran cantidad de fibras IIb y mixtas IIx/IIb que presenta, como ya se ha sugerido en estudios previos.^[334, 340-342]

En este sentido, la búsqueda de una posible transición metabólica hacia un fenotipo que favoreciera la expresión de este tipo de fibras, como mecanismo de protección frente a la

evolució de la enfermedad, no ha revelado avances en esta direcció. El estudio longitudinal de la proporció de los distintos tipos de fibras agrupadas por su carácter metabólico, no revela cambios sustanciales ni en el músculo EDL ni en el TA, si bien ambos presentan una tendencia al incremento del metabolismo glucolítico en ratones McA, aunque sin significación estadística. El caso del *soleus* es singular, el estudio longitudinal realizado de la proporció de tipos de fibras en los grupos de 8, 35 y 70 semanas de edad de ratones McA, muestra principalmente un descenso de la proporció de fibras tipo IIa con la evolución de la enfermedad, siendo éstas el segundo tipo de fibras más abundantes en este músculo, y de fibras mixtas tipo I/IIa, así como un incremento de la proporció de las tipo IIx, que se comportan de forma diferente a las de los ratones WT donde su proporció desciende. Por tanto, en el *soleus* sí que parece existir esa transición metabólica postulada, aunque paradójicamente lo que se produce es un aumento significativo de la proporció de fibras de metabolismo glucolítico según avanza la enfermedad, que contrasta con la evolución observada en los ratones WT para los que la proporció de fibras oxidativas se ve así mismo aumentada. Esa gran pérdida de fibras oxidativas tipo IIa y mixtas I/IIa observada, que como se ha demostrado en estudios previos están especialmente afectadas por la enfermedad de McArdle, en un músculo oxidativo como el *soleus* que presenta una gran cantidad de las mismas, favorecería que se vieran estas diferencias en las proporciones de fibras al agruparlas por su carácter metabólico y que por tanto se pudiera apreciar esa transición metabólica.

Otra de las características que podría explicar la gran afectación, y en última instancia la degeneración, que sufren las fibras tipo IIa, IIx y IIa/IIx, es la acumulación progresiva de glucógeno en ellas según avanza la enfermedad de McArdle, si bien los resultados obtenidos en este sentido, en los músculos GAST, TA y QUAD de ratones McA de 8 y 70 semanas de edad, no indican que dicha acumulación progresiva se esté produciendo. Así, en el músculo QUAD y especialmente en el TA, no se observa un incremento con la edad de la cantidad de glucógeno acumulado, produciéndose éste única y levemente en el músculo GAST. Esta falta de acumulación progresiva de glucógeno en estos músculos, que no se corresponde con lo que cabría esperar de la evolución de una patología cuya principal característica es la acumulación de glucógeno en el tejido muscular,^[308-310] tampoco parece ser explicada por un aumento de la degradación de esta molécula vía lisosomal, como muestran los datos obtenidos de los niveles proteicos de la enzima GAA en el músculo GAST. Así mismo, no parece que en este músculo la función de la enzima GP-M sea análogamente desarrollada por las otras isoformas de la GP, GP-L o GP-B, ya que los datos obtenidos no revelan diferencias entre sus niveles para los

ratones McA de 8 y 70 semanas de edad. Cuando analizamos la actividad de la enzima GS a nivel longitudinal como otra posible causa de la falta de acumulación progresiva de glucógeno en ratones McA, observamos una mayor inactivación de esta enzima en ellos que en los WT, en todos los grupos de edad estudiados, decreciendo las diferencias entre ellos según avanza la enfermedad, resultados que podrían explicar en parte la falta de acumulación de glucógeno con la edad en los ratones McA, ya que la carencia de actividad de esta enzima evitaría la acumulación del mismo por dos vías, disminuyendo la síntesis de glucógeno y contrarrestando la falta de degradación del mismo que provoca la enfermedad.^[308-310] El conjunto de resultados obtenidos nos hacen pensar que la afectación de ciertos tipos de fibras podría estar detrás de la falta de acumulación de glucógeno en los músculos de los ratones McA, ya que ni la vía lisosomal ni mecanismos enzimáticos parecen explicarlos completamente. En este sentido, las fibras tipo Ila, IIx y Ila/IIx, que se ven muy afectadas por la enfermedad de McArdle en los músculos estudiados, *soleus*, EDL y TA, podrían explicar este fenómeno, ya que no sólo se ven muy afectadas histológicamente sino que además co-localizan con procesos de regeneración activos y mantienen o sufren un descenso de su proporción según avanza la enfermedad. El caso más evidente es el de las fibras tipo Ila, por ser las únicas cuya proporción se ve especialmente mermada en los tres músculos descritos, con la evolución de la enfermedad. En esta línea, el estudio histológico y cuantitativo de la afectación de las fibras oxidativas ha revelado que presumiblemente, y a falta de ahondar con imágenes que así lo demuestren, las fibras tipo Ila, que son aquellas con una mayor actividad mitocondrial,^[47] son las que presentan una mayor acumulación de glucógeno y una mayor desestructuración y degeneración asociadas precisamente a esta acumulación.

Así, los resultados obtenidos en los estudios de la afectación bioquímica y estructural de los ratones McA, que en general revelan una mayor captación de glucosa así como diferencias en el grado de degeneración, tamaño y proporción de los distintos tipos de fibras en los músculos de estos ratones, sugieren, como se ha mencionado previamente, la implementación de un mecanismo alternativo de obtención de energía que favorezca una mayor captación de glucosa por parte del tejido muscular de estos ratones y, en consecuencia, que las fibras que tengan mayor capacidad para realizar esta función podrían verse favorecidas respecto al resto. En este contexto, es de gran relevancia el transportador de glucosa GLUT4 que es el encargado de la captación de esta molécula, tanto en condiciones de reposo por vía insulínica como en condiciones de estrés energético a través de la enzima AMPK, una vez es activado y translocado a membrana.^[163-165] Los niveles elevados que presenta este transportador así

como la enzima AMPK tanto en pacientes como en ratones McArdle, ya han sido previamente descritos y relacionados con el grado diferencial de afectación que presentan los distintos músculos,^[334, 337, 338, 340-342] interpretándose que uno de los motivos por los que el QUAD puede presentar una menor afectación por la enfermedad, es por los elevados niveles de activación de la enzima AMPK que presenta con respecto a los músculos *soleus*, EDL y TA.^[334, 340-342] Así, se ha destacado que los altos niveles de esta enzima en el músculo QUAD pueden deberse a la composición del mismo, en la que predominan las fibras tipo IIb y IIx/IIb, con un metabolismo preferentemente glucolítico. De esta forma, músculos tales como el *soleus*, el EDL y el TA se verían más afectados por la enfermedad de McArdle, ya que su captación de glucosa con el fin de almacenar glucógeno, es más dependiente de la vía insulínica, y ello debido a la composición que presentan en la que predominan las fibras tipo IIa, IIx y IIa/IIx, que se han descrito como las más afectadas por esta patología.^[334, 340-342] Teniendo en cuenta estas consideraciones, el estudio que hemos realizado para determinar los tipos de fibras que presentan la activación de GLUT4 en los músculos *soleus*, GAST y TA de ratones McA, nos ha ayudado a determinar la capacidad diferencial que estas fibras presentan para la captación de glucosa y dilucidar si esto puede llegar a afectar a la mayor o menor resistencia que tienen frente a la enfermedad. En este sentido, los resultados obtenidos muestran que las fibras tipo I de los ratones McA, respecto de las de los WT, presentan mayor marcaje positivo para GLUT4 en los músculos *soleus* y GAST, siendo significativo para este último, lo que contrasta con el menor marcaje positivo observado para este transportador en el músculo TA. En el caso de las fibras tipo IIa, los resultados obtenidos revelan un descenso de la cuantificación de este marcaje en ratones McA con respecto a los WT y en los tres músculos estudiados, *soleus*, TA y GAST, siendo este descenso especialmente evidente y significativo en el primero de ellos. Finalmente, analizando el marcaje positivo para las fibras tipo IIb, que sólo están presentes en los músculos GAST y TA como se ha descrito previamente^[19, 51], se observa mayor proporción del mismo en los ratones McA con respecto a los WT, en ambos músculos. Estos resultados son similares a los observados en estudios previos donde se evidenciaba un aumento del número de fibras positivas para GLUT4 en el músculo TA de ratones McA así como mayor presencia de este marcaje en las fibras tipo I.^[335] Por otra parte, también se han observado mayores niveles de GLUT4 en pacientes con la enfermedad de McArdle que en individuos sanos, sin embargo, parecen estar más relacionados con la activación insulino-dependiente de la enzima Akt, lo que a su vez estaría en consonancia con el hecho de que estos pacientes consumen más glucosa durante el ejercicio que los individuos sanos.^[335, 337, 338]

Estos resultados podrían explicar en parte la diferente afectación que presentan los distintos tipos de fibras. Por un lado, indicarían que las fibras que previamente se habían considerado como las menos dañadas por la enfermedad de McArdle, las tipo I y IIb, son capaces de reclutar más GLUT4 a membrana para la captación de glucosa, por otro, que las fibras tipo IIa, que se presentan bastante dañadas por esta enfermedad, ven reducida su capacidad para reclutar a este transportador. De nuevo parece confirmarse que las fibras con un metabolismo más puro, oxidativo en el caso de las tipo I y glucolítico en el de las tipo IIb,^[47] tienen mayor versatilidad a la hora de adaptarlo a las consecuencias de la enfermedad y, por el contrario, fibras como las tipo IIa, que tienen un metabolismo intermedio entre el oxidativo y el glucolítico,^[47] son incapaces de adaptarse adecuadamente a esta situación. Así, las fibras tipo I utilizarían la captación de glucosa y su posterior oxidación para la obtención de piruvato, que seguidamente entraría en el TCA, y de esta forma podrían obtener energía extra para compensar el déficit que provoca la enfermedad de McArdle,^[162] aprovechando así mismo, los altos niveles proteicos de enzimas implicadas en el transporte de piruvato a las mitocondrias y de alguna de las isoformas de las citrato deshidrogenasas del TCA, que de forma constitutiva presentan este tipo de fibras.^[47] Las fibras tipo IIb por su parte, podrían estar aprovechando los altos niveles tanto de la enzima AMPK, que previamente han sido descritos en ratones McA,^[337, 338] como de la G3PDH, que ya presentan de forma normal,^[47] para potenciar la captación de glucosa a través de GLUT4 y su utilización vía glucólisis para la obtención de energía. Las fibras tipo IIa, que por su constitución son más dependientes de enzimas implicadas en la cadena respiratoria,^[47] podrían verse afectadas por el déficit funcional de las mitocondrias, descrito previamente en pacientes McArdle^[343-351] e inferido aquí con los resultados obtenidos en el estudio de la afectación de las fibras oxidativas, y como tampoco destacan por especializarse en mecanismos metabólicos más glucolíticos,^[47] no serían sin embargo capaces de utilizar esta alternativa para conseguir energía, sufriendo por tanto una mayor afectación que los otros dos tipos de fibras mencionados anteriormente. De esta forma, las fibras tipo I y IIb funcionarían como protectoras frente a los procesos de degeneración/regeneración provocados por la evolución de la enfermedad de McArdle, gracias a su capacidad para utilizar mecanismos de obtención de energía alternativos a aquellos que presentan como constitutivos, y las fibras tipo IIa, al carecer de esta versatilidad, aparecen más afectadas por estos procesos según avanza la enfermedad.

Por tanto, las fibras tipo IIa, IIx y IIa/IIx podrían estar acumulando más glucógeno que las tipo I ó IIb, que presentan mecanismos alternativos de utilización de la glucosa sin almacenarla en

forma de glucógeno, y de esta forma verse muy afectadas por la enfermedad hasta el punto de reducir la captación de glucosa vía GLUT4, que en última instancia hará que el daño que presenten derive en una degeneración de las mismas, como sugiere el descenso observado en su proporción según avanza la enfermedad, y que dicha degeneración se refleje finalmente en un descenso de la cantidad de glucógeno acumulado en músculos tales como el TA. En esta línea, estudios previos han revelado que las fibras tipo IIx/IIb del músculo TA presentan una acumulación de glucógeno mucho mayor que las tipo IIa, IIa/IIx y IIx, en las que el contenido de esta molécula es más variable, siendo a su vez las fibras tipo IIx las de mayor presencia tanto en el músculo TA como en el QUAD, si bien predominan más en el primero,^[334] dando lugar, posiblemente, a las diferencias observadas en el grado de afectación entre estos músculos. Estos hallazgos previos junto con los descritos en este estudio, confirmarían que realmente una mayor proporción de fibras tipo IIb ayudaría a músculos de metabolismo glucolítico a mantener su estructura y a protegerse frente al daño que produce la enfermedad de McArdle. El estudio metabólico de tejido muscular (GAST) realizado posteriormente, en busca de posibles mecanismos compensatorios que ayuden a mitigar la carencia energética de los ratones McA debida a su incapacidad para degradar glucógeno, se ha centrado en las vías de la glucólisis y la oxidación de ácidos grasos.^[162] Los resultados obtenidos para ratones McA y WT de 20 semanas de edad, muestran que no existe una mayor utilización de la vía glucolítica en los primeros, así lo confirman al menos las enzimas analizadas (PFKM, PKM2 y PDHE 1), sin embargo sí que parece existir una mayor movilización de ácidos grasos en este músculo, ya que se observa una tendencia al aumento de la captación de ácidos grasos libres procedentes del torrente sanguíneo, como sugieren los niveles levemente elevados del receptor CD36 así como los significativamente más bajos observados de la enzima p-HSL Ser 565, que indican una menor inactivación de la enzima HSL y por tanto que la conversión de DAG en MAG está produciéndose de forma más activa.^[232-239]

En el estudio realizado posteriormente del metabolismo oxidativo en el músculo GAST, para evaluar si en los ratones McA existe una transición hacia un metabolismo más oxidativo en este tejido, los resultados obtenidos en ratones de ambos genotipos y 20 semanas de edad muestran una tendencia a presentar mayores niveles de la enzima PPAR δ y menores niveles de la enzima HADH en los ratones McA, que indicarían que éstos presentan una leve preferencia por un metabolismo más oxidativo a la vez que un déficit en la beta-oxidación de ácidos grasos en las mitocondrias.

De esta forma, el conjunto de resultados obtenidos en el estudio realizado del tejido muscular, en relación con la posible utilización de mecanismos alternativos de obtención de energía de los ratones McA, indican una mayor utilización de ácidos grasos por parte del músculo esquelético, que podría ayudar a hacer frente al déficit energético causado por la imposibilidad de degradar el glucógeno con este fin. En esta línea, estudios previos han mostrado una mayor captación de glucosa vía activación de la enzima AMPK en el músculo QUAD de ratones McA,^[335] lo que unido al conjunto de resultados descritos en el músculo GAST sugiere que músculos menos dañados como el QUAD podrían paliar la carencia energética debida a la imposibilidad de degradar glucógeno, a través del aumento de la captación de glucosa, mientras que músculos como el GAST, al no tener esta capacidad, tendrían que recurrir a una mayor captación y degradación de ácidos grasos para compensar este déficit. Estas diferencias de adaptación de los distintos músculos ante las dificultades que presentan para la obtención de energía, como consecuencia de la enfermedad de McArdle, es un reflejo de las diferencias de comportamiento que presentan las fibras musculares ante esta situación. Así, músculos con una composición de tipos de fibras más homogénea, tales como el QUAD y el *soleus* cuyas fibras son principalmente tipo I y IIx/IIb,^[19, 51, 334] son capaces de dar mejor respuesta al daño que produce la acumulación de glucógeno, a través de mecanismos metabólicos que permiten la captación de mayor cantidad de glucosa para su utilización vía glucólisis, mientras que músculos con una composición más heterogénea de fibras, tales como el TA, el GAST o el EDL, recurren a una adaptación más dependiente de la captación de ácidos grasos del torrente sanguíneo para intentar paliar esta carencia energética.^[335] Por otra parte, de estos resultados obtenidos en el músculo GAST también se desprende un déficit mitocondrial en los ratones McA a la hora de oxidar estos lípidos, de hecho, en resultados aún no publicados de nuestro grupo de investigación se ha observado mediante microscopía electrónica un porcentaje elevado de mitocondrias dañadas debido a los grandes acúmulos de glucógeno que presentan. Esta última limitación podría tener relación con la gran afectación que encontramos en las fibras tipo IIa, previamente descrita, que presentan niveles elevados de la enzima HADH de forma constitutiva,^[47] por lo que de sus menores niveles proteicos observados podrían estar asociados a la persistente afectación que sufren y que en última instancia deriva en su degeneración. Esta limitación de la función mitocondrial ya ha sido descrita previamente en pacientes de McArdle, estando relacionada principalmente con un menor contenido mitocondrial así como con un déficit de la síntesis de ATP a partir de ADP, tras la realización de ejercicio. El mecanismo compensatorio propuesto para mitigar dicho déficit en estos pacientes

sería la elevación de los niveles de transportadores de metabolitos mitocondriales, tales como el MCT1, que ayudarían a una mayor captación de lactato para su transformación en piruvato, degradándolo más adelante vía TCA y así obtener energía de forma alternativa.^[343-356] De hecho, en los resultados obtenidos en el estudio bioquímico de ratones McA, se observa una significativa menor concentración de lactato en sangre, para los ratones McA con respecto a los WT de 70 semanas de edad, lo que concordaría con el mecanismo alternativo de obtención de energía propuesto en los pacientes con la enfermedad de McArdle. No obstante lo anterior, futuros estudios que puedan realizarse de la evolución de la composición en tipos de fibras que presenta el GAST así como de su proporción de mitocondrias, ayudarían a esclarecer esta posible relación entre el déficit mitocondrial y la gran afectación de las fibras tipo IIa.

El tejido adiposo acumula los ácidos grasos en sus células en forma de gotas lipídicas, quedando protegidos de la acción de las lipasas por proteínas de la familia de las perilipinas, como la PLIN5, y en casos de extrema necesidad energética es capaz de movilizarlos para su liberación al torrente sanguíneo vía beta-oxidación, para ser utilizados a su vez por tejidos como el músculo esquelético.^[221, 222, 241] Teniendo en cuenta estas consideraciones así como los resultados obtenidos hasta ese momento, realizamos un estudio metabólico más detallado en el tejido adiposo de ratones McA y WT, de 20 y 70 semanas de edad. Los resultados del estudio de la síntesis y degradación de glucógeno así como de la regulación de la glucólisis en este tejido, realizados en ratones de 20 semanas, muestran únicamente menores niveles proteicos de la enzima GYS-1 en los ratones McA, y ninguna diferencia entre ambos genotipos para los niveles o actividad de la enzima AMPK. Sin embargo, cuando observamos los datos recabados del estudio de la oxidación de ácidos grasos en este tejido, realizado en ambos grupos de edad, se aprecian un menores niveles de la enzima PLIN5 en ratones McA de 20 semanas de edad, así como niveles significativamente inferiores de la forma inactiva de la HSL (p-HSL Ser 565) y niveles más elevados de los de su forma activa (p-HSL Ser 660) en ratones McA de 70 semanas de edad.

Estos resultados indicarían una menor acumulación de glucógeno en el tejido adiposo de los ratones McA que en el de los WT, quizás para poder hacer frente a la necesidad energética de este tejido a la hora de poner en funcionamiento la maquinaria de oxidación de ácidos grasos, que como también revelan los resultados está claramente activa en ellos y de forma más evidente en los ratones McA de 70 semanas de edad, proporcionando así una mayor cantidad de ácidos grasos libres que podrían estar siendo captados por el tejido muscular, como se ha puesto de manifiesto en los resultados obtenidos en el GAST de ratones McA de 20 semanas

de edad. Así mismo, estos resultados concordarían tanto con el menor peso corporal como con la reducción del peso de su grasa abdominal, total y relativa, observados en ratones McA de 70 semanas de edad con respecto a los WT de ese mismo grupo de edad, transmitiendo de nuevo la idea que subyace a lo largo de este estudio de que estos ratones están utilizando mecanismos alternativos de obtención de energía. En este sentido, en estudios previos de Nielsen *et al.* se ha observado que pacientes con la enfermedad de McArdle e individuos sanos presentan niveles similares de la enzima acetil CoA carboxilasa beta (ACC β) en condiciones de reposo, pero que tras someterles a actividad física, los niveles de la forma activa de esta enzima se encuentran mucho más elevados en los enfermos de McArdle que en los individuos sanos.^[337] Dado que esta enzima participa en la acumulación de ácidos grasos a nivel mitocondrial,^[402] y teniendo en cuenta las posibles diferencias entre el modelo murino y los pacientes con la enfermedad de McArdle, los resultados obtenidos en el músculo GAST y en el tejido adiposo de los ratones McA podrían trasladarse a estos pacientes. Así, la activación de la enzima ACC β podría favorecer la acumulación de ácidos grasos en las mitocondrias para ser utilizados de forma “inmediata” como mecanismo compensatorio ante la carencia energética muscular que sufren los pacientes de McArdle, siendo este mecanismo más evidente en los ratones McA (referencia???) como evidencia la captación, activación de procesos de degradación y de liberación de ácidos grasos tanto en el músculo esquelético como en el tejido adiposo respectivamente, al presentar un metabolismo más acelerado este modelo animal. El hígado es otro de los órganos con capacidad para intervenir en situaciones de carencia energética a través de la exportación de glucosa al torrente sanguíneo y, como el tejido adiposo, también presenta una estrecha relación metabólica con el tejido muscular,^[163, 241, 274-280] por ello, el estudio metabólico de este órgano también puede arrojar luz sobre la idea de los posibles mecanismos compensatorios que podrían tener los ratones McA para hacer frente a su déficit energético.

Con este objetivo se ha realizado un estudio metabólico del hígado tanto a nivel transversal como longitudinal, de la acumulación de glucógeno y de la actividad de la enzima GS. Dentro del estudio transversal realizado en ratones McA y WT jóvenes, de entre 8 y 20 semanas de edad, los datos de la síntesis y degradación del glucógeno hepático muestran niveles significativamente elevados de la enzima UGP-2 y niveles más altos de la forma inactiva de la GS (p-GYS-2) en los primeros. En cuanto a los resultados obtenidos en el estudio de las enzimas que regulan los procesos de glucólisis y gluconeogénesis, se observan en los ratones McA niveles más altos de las enzimas G6Pc y PCK2, teniendo la diferencia con los ratones WT

significación estadística para la primera de ellas, y niveles significativamente más bajos de la enzima p-PDHE1 Ser 283. Finalmente y completando este estudio transversal, los resultados obtenidos en el análisis de las enzimas implicadas en la regulación de la síntesis y degradación de glucógeno en este órgano, muestran niveles significativamente más altos de la enzima Phkb en ratones McA.

En conjunto, los resultados obtenidos en este estudio metabólico transversal realizado en ratones jóvenes, tanto McA como WT, sugerirían para los primeros una mayor formación de UDP-glucosa que sin embargo podría no estar siendo aprovechada para la formación de glucógeno, como indicarían los niveles más altos de la forma inactiva de la GS; una mayor formación de glucosa, por un lado para su exportación al torrente sanguíneo y por otro, vía formación de piruvato, para su utilización en la gluconeogénesis; una menor inactivación de la piruvato deshidrogenasa (PDH), que por tanto ayudaría a que el piruvato generado entrara también en el TCA, aumentando la obtención de energía con la generación de ATP; y finalmente, una activación de la GP-L que favorecería la degradación del glucógeno hepático para la formación de glucosa en última instancia. En este sentido, la cuantificación bioquímica de la acumulación de glucógeno hepático en ratones McA de 8 y 70 semanas de edad, muestra que se produce un descenso significativo de dicha acumulación con la edad. Sin embargo, cuando analizamos la actividad de la GS-L en ratones McA y WT de 20 semanas de edad, observamos que existe una tendencia a presentar niveles más altos de la actividad de la forma activa de la GS-L en los primeros, contrariamente a lo observado en el estudio de sus niveles proteicos. La explicación a esta contradicción podría ser doble, por un lado que los niveles aumentados de la enzima Phkb que se han observado no sean suficientes para la inactivación de la GS-L, ya que existen otras enzimas y moléculas reguladoras de la actividad de esta enzima,^[263] y por otro, que su actividad sea fluctuante.

Este último supuesto podría tener relación con lo observado en el estudio metabólico longitudinal del hígado, en el que han sido estudiadas las principales enzimas implicadas en la síntesis y degradación de glucógeno en el mismo, en ratones McA de 8, 35 y 70 semanas de edad, y en el que se observa cómo aumenta la inactividad de la GS-L en ratones McA de 35 semanas respecto a los de 8, y sin embargo, disminuye ésta en los de 70 semanas respecto a los de 35, comportamiento similar al observado en los niveles proteicos de la enzima AGL.

De esta forma podría ser un mecanismo más variable de lo esperado en condiciones normales como ya mencionábamos.

Así, los resultados sugieren que los ratones McA presentan un mecanismo compensatorio de la carencia energética para hacer frente a la enfermedad, dependiente tanto del tejido adiposo como del hígado, y en el que la fluctuación de la actividad de la enzima GS-L podría deberse a la necesidad que este último tiene en cada momento para hacer frente a la gran demanda de glucógeno que estos ratones presentan y así compensarla, alternando periodos de mayor almacenamiento de esta molécula con otros más necesarios de degradación de la misma, estableciéndose así un equilibrio para que el hígado pueda abastecer con glucosa las necesidades del músculo esquelético sin quedarse sin su propio almacén de energía. En esta línea y como se ha apuntado anteriormente, el hecho de que se observe una mayor formación de glucosa hepática para que pueda ser exportada a la sangre, y así ser captada por el tejido muscular para sobreponerse al déficit energético que provoca la enfermedad de McArdle, y que sin embargo en el músculo GAST no se aprecie un aumento de los niveles de enzimas implicadas en la glucólisis, podría estar relacionado con la adaptación diferencial de los distintos músculos. Esta misma hipótesis ya ha sido planteada previamente en relación con la composición en tipos de fibras de los distintos músculos, tomando como ejemplo el QUAD y el GAST, y en este sentido, los resultados obtenidos en los estudios metabólicos realizados tanto del hígado como del tejido adiposo confirmarían que efectivamente los mecanismos compensatorios están presentes en los ratones McA, pero que son utilizados de forma diferente según el músculo, la composición en tipos de fibra que éste presente y su dependencia de la enzima GP-M. Así, músculos como el GAST, el EDL o el TA utilizarían como recursos metabólicos compensatorios los lípidos que el tejido adiposo vierte al torrente sanguíneo, como demuestran los altos niveles del transportador/translocador de ácidos grasos CD36 presentes en el primero de ellos, siendo su grado de afectación diferente según el tipo de fibras musculares que presentan y su dependencia de la degradación de glucógeno. De esta forma, los músculos EDL y GAST estarían menos dañados con la evolución de la enfermedad al presentar probablemente una proporción algo mayor de fibras oxidativas, especialmente en el caso del GAST, ^[19, 51, 334] así como la capacidad de obtener energía vía captación de ácidos grasos y principalmente por su menor dependencia de la utilización de energía proveniente de la degradación del glucógeno en comparación con el músculo TA.^[334] En el caso del músculo QUAD, con una proporción mayoritaria de fibras tipo IIx/IIb ^[19, 51, 334] que ya constitutivamente le harían capaz de obtener energía vía glucólisis, dicha capacidad unida a la gran activación de la enzima AMPK observada en ratones McA,^[334, 340-342] que le ayudaría a utilizar recursos metabólicos provenientes del hígado para adaptarse tales como la glucosa, así como su menor

dependencia de la glucogenolisis,^[334] lo hacen ser el músculo menos dañado por la enfermedad de McArdle de todos los estudiados.^[334] Finalmente, el caso del músculo *soleus* es algo más controvertido ya que su composición en tipos de fibras, tipo I y IIa principalmente, no le permite tener una adaptación metabólica completamente eficaz. Si bien existe una mayor proporción de fibras tipo I que presentan un marcaje positivo para el transportador de glucosa GLUT4 en ratones McA, éstas de forma constitutiva están más preparadas para la internalización de ácidos grasos libres y piruvato,^[47] por lo que esta vía alternativa de obtención de energía mediante la captación de glucosa podría no ser especialmente eficiente en este músculo, de hecho no se han observado mayores niveles de AMPK en el *soleus* de ratones McA.^[335] No obstante, sí se ha observado una transición de la proporción de tipos de fibras oxidativas de este músculo hacia fibras más glucolíticas según avanza la enfermedad de McArdle, que podría incrementar algo la eficiencia de esta ruta alternativa de obtención de energía. Sin embargo, parece más probable que la resistencia que presenta la estructura muscular del *soleus* a la degeneración que provoca el avance de la enfermedad de McArdle, tenga más relación con sus tipos de fibras, en concreto con la estructura de las fibras tipo I y la presencia de la proteína utrofina,^[151-153] siendo éstas capaces en última instancia de almacenar más cantidad de glucógeno sin degenerarse, viéndose así una progresión de la proporción de núcleos centrales que éstas presentan según avanza la enfermedad.

6. Conclusiones

El presente estudio revela una visión más completa de las dificultades que presenta el modelo murino para la enfermedad de McArdle así como de las características físicas, bioquímicas, estructurales y de adaptación de este modelo respecto a la evolución de esa patología. Los resultados obtenidos nos permiten concluir que este modelo animal sufre una elevada tasa de mortalidad tanto perinatal como post destete con respecto a lo que cabría esperar de la herencia Mendeliana que presenta la enfermedad, y que influye negativamente en la obtención de ratones McA. A nivel estructural, estos ratones presentan una mayor desestructuración muscular, con gran variabilidad del tamaño de sus fibras que también presentan vacuolizaciones, y un incremento tanto del número de NC como del area de ECM, características que se ven potenciadas con el avance de la enfermedad. Así mismo, los músculos QUAD y *soleus* parecen ser más capaces de resistir los sucesivos procesos de degeneración/regeneración, manteniendo su estructura según avanza la enfermedad, al contrario de lo que sucede con los músculos GAST, EDL y TA, que se ven estructuralmente más afectados con la evolución de la misma. Por lo que es evidente que la afectación muscular es independiente de las características metabólicas que estos músculos presentan. En esta línea, las fibras musculares de los músculos *soleus* y QUAD se ven menos afectadas por la atrofia, y más concretamente las fibras tipo I y las mixtas tipo IIx/IIb que son preponderantes en esos respectivos músculos, lo que les confiere protección frente al daño crónico producido por la evolución de la enfermedad de McArdle. Esta propiedad protectora se debe a la capacidad de estos tipos de fibras para hacer frente a los ciclos de degeneración/regeneración evitando la atrofia y a su versatilidad metabólica a la hora de establecer mecanismos alternativos de obtención de energía mediante la captación de glucosa, evidenciando que pese a que presentan un metabolismo más puro, oxidativo y glucolítico respectivamente, su adaptación a la enfermedad es más exitosa que la observada en el resto de fibras estudiadas.

Por otra parte, los datos obtenidos en el estudio metabólico realizado junto con las características bioquímicas y físicas observadas en este modelo animal, nos permiten afirmar que los ratones McA tienen cierta capacidad de adaptación para minimizar los efectos que la carencia energética producida por la enfermedad provoca en el tejido muscular. Tanto el tejido muscular como el tejido adiposo de estos ratones presentan un mecanismo potenciado de movilización de ácidos grasos para revertir la falta de energía muscular, interviniendo así mismo el hígado en este mecanismo compensatorio, exportando una mayor cantidad de

glucosa a la sangre en detrimento de sus almacenes de glucógeno. Todo ello se refleja de una forma física en los ratones McA, que presentan menor peso corporal que los WT debido precisamente al gran esfuerzo que supone este mecanismo compensatorio, focalizado principalmente en el tejido adiposo y en el hígado para que el tejido muscular se vea afectado lo menos posible por la evolución de la enfermedad.

Anexo: Artículo “Low survival rate and muscle fiber-dependent aging effects in the McArdle disease mouse model”

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Low survival rate and muscle fiber-dependent aging effects in the McArdle disease mouse model

Alberto Real-Martinez¹, Astrid Brull², Jordi Huerta¹, Guillermo Tarrasó¹, Alejandro Lucia^{3,4,5}, Miguel Angel Martin^{4,5}, Joaquin Arenas^{4,5}, Antoni L. Andreu^{1,5}, Gisela Nogales-Gadea^{5,6}, John Vissing⁷, Thomas O. Krag⁷, Noemi de Luna^{8,5} & Tomàs Pinós^{1,5}

McArdle disease is an autosomal recessive disorder caused by the absence of the muscle glycogen phosphorylase, which leads to impairment of glycogen breakdown. The McArdle mouse, a model heavily affected by glycogen accumulation and exercise intolerance, was used to characterize disease progression at three different ages. The molecular and histopathological consequences of the disease were analyzed in five different hind-limb muscles (*soleus*, *extensor digitorum longus*, *tibialis anterior*, *gastrocnemius* and *quadriceps*) of young (8-week-old), adult (35-week-old) and old (70-week-old) mice. We found that McArdle mice have a high perinatal and post-weaning mortality. We also observed a progressive muscle degeneration, fibrosis and inflammation process that was not associated with an increase in muscle glycogen content during aging. Additionally, this progressive degeneration varied among muscle and fiber types. Finally, the lack of glycogen content increase was associated with the inactivation of glycogen synthase and not with compensatory expression of the *Pygl* and/or *Pygb* genes in mature muscle.

McArdle disease (glycogen storage disease V; myophosphorylase deficiency; OMIM database number #232600; ORPHA: 368) is an autosomal recessive disorder caused by pathogenic mutations in the gene (*PYGM*) encoding the muscle isoform of glycogen phosphorylase (GP-M, also known as myophosphorylase)^{1,2}. GP-M initiates the breakdown of muscle glycogen, leading to the release of glucose-1-phosphate in muscle fibers. Patients are unable to obtain energy from their muscle glycogen stores³, and present with exercise intolerance, usually in the form of reversible, acute crises of early exertional fatigue and contractures that can also be accompanied by rhabdomyolysis, as reflected by marked increases in serum levels of creatine kinase (CK) or even myoglobinuria ('dark urine')^{4,5}. Naturally occurring or laboratory-generated animal disease models allow performing mechanistic studies that provide insights into the pathophysiology of a disorder. In this context, a knock-in McArdle mouse model with the most common *PYGM* pathogenic mutation (p.R50X) mutation was developed by our group⁶. The McArdle mouse mimics the phenotype found in patients, characterized by hyperCKemia, myoglobinuria, and poor exercise performance⁶. Glycogen levels in muscle of the mouse McArdle model are elevated several fold more than found in people with McArdle disease⁶. Several studies have been performed in the McArdle mouse model, analyzing the disease phenotype in young (8-week-old)⁶⁻⁹ or adult mice (20-week-old)¹⁰⁻¹². In these studies, it was observed that muscle contractions were affected by structural degeneration due to glycogen accumulation and that glycolytic muscles fatigued prematurely¹⁰. Additionally, histological differences among glycolytic

¹Mitochondrial and Neuromuscular Disorders Unit, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ²Sorbonne Université, INSERM UMRS_974, Center of Research in Myology, 75013, Paris, France. ³Faculty of Sport Sciences, Universidad Europea de Madrid, Madrid, Spain. ⁴Mitochondrial and Neuromuscular Diseases Laboratory, 12 de Octubre Hospital Research Institute (i+ 12), Madrid, Spain. ⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain. ⁶Grup de Recerca en Malalties Neuromusculars i Neuropediàtriques, Department of Neurosciences, Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol i Campus Can Ruti, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain. ⁷Copenhagen Neuromuscular Center, Department of Neurology, Rigshospitalet, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark. ⁸Laboratori de Malalties Neuromusculars, Institut de Recerca Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. Alberto Real-Martinez and Astrid Brull contributed equally. Noemi de Luna and Tomàs Pinós jointly supervised. Correspondence and requests for materials should be addressed to T.P. (email: tomas.pinos@vhir.org)

muscles were shown, as *tibialis anterior* (TA) muscles were invariably more damaged than *quadriceps* muscles, likely as a result of higher levels of glycogen metabolism in TA compared to *quadriceps*¹⁰. With respect to metabolic adaptive responses, *quadriceps* from McArdle mice presented significant changes in protein levels involved in glucose metabolism, while distal muscles such as TA, *extensor digitorum longus* (EDL) and *soleus* showed barely any change¹¹. Additionally, differential structural damage was also observed among fiber types; while type I/IIa, IIa, IIa/IIx and IIx fibers from hind limb muscles presented evident signs of degeneration, type I fibers remained largely unaffected¹⁰. As disease phenotype progression and its molecular consequences during the aging process remain largely unknown, in the present study we wanted to perform a longitudinal characterization of the McArdle mouse model to determine if the massive glycogen accumulation in myofibers (i) increased with aging and (ii) caused progressive and differential increase in muscle and fiber type degeneration. Therefore, we analyzed and characterized the molecular and histopathological consequences of aging in five different hind-limb muscles [*soleus* (oxidative), and EDL, TA, *gastrocnemius* and *quadriceps* (glycolytic muscles)] from three cohorts of mice aged 8, 35 and 70 weeks. Furthermore, as we have previously observed an unusually high mortality of McArdle mice¹⁰, we also wanted to analyze the survival rate of these mice throughout their life-span.

Material and Methods

Ethical approval. All experimental procedures were approved by the *Vall d'Hebron* Institutional Review Board (protocol number 13/04 CEEA; 35/04/08) and were conducted in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS 1 2 3) and Spanish laws (32/2007 and R.D. 1201/2005).

Mice. Previously developed *p.R50X/p.R50X* knock-in McArdle mice, back-crossed for 10 generations to C57/6J background, were used in this study^{6,7}. To test for disease progression, three cohorts of mice aged 8, 35 and 70 weeks were used. All cohorts had $N = 12$ both for wild-type (WT) and McArdle (McA) mice, with the exception of 70-week-old McA mice where the number of studied mice were 6. All mice were killed by cervical dislocation immediately before dissection of the hindlimb muscles *soleus*, *gastrocnemius*, EDL, TA and *quadriceps*.

Genotyping. Genotyping was performed for all post-weaning mice of the colony born between 01/01/2013 and 05/08/2018 ($n = 2,088$) and 38 embryos (E 14.5) according to a protocol previously described⁶.

Survival curve. The survival curve was calculated for all the genotyped post-weaning mice of the colony that were born between 01/01/2013 and 05/08/2018 ($n = 2,088$). The Kaplan-Meier survival function, also known as the product-limit estimator was used¹³. For each mouse, the following data were entered (GraphPad Prism version 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, www.graphpad.com): 1) X-values: time (number of days alive until an event or censoring occurred); 2) Y-values: Y value is "1" when the mouse died at the specified time, and "0" when the mouse's data was censored at that time.

Histology and immunohistochemistry. Dissected muscles were flash frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. Twelve μm cryosections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for general histopathological evaluation as previously described⁶. Glycogen content was analyzed with periodic acid-Schiff (PAS) staining by sequentially incubating the sections with: periodic acid (Fisher Scientific; Hampton, NH) (0.5%) for 5 min, water wash, Schiff's solution (Merck-Millipore, Burlington, MA) for 15 min, water for 1 min, alcohol-xylol dehydration and DPX mounting (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)⁶. For immunohistochemistry, sections were fixed in 10% buffered formalin (Sigma-Aldrich) and subsequently blocked in buffer (3% fetal calf serum in PBS) prior to staining. For damage, regeneration, inflammatory, fibrosis, and fiber type overview and analysis, sections were stained with their corresponding antibodies (see Supplementary Table). Finally, sections were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) nucleic acid stain reactive (Invitrogen; Carlsbad, CA), for 5 min and mounted with ProLongTM Gold Antifade reagent (Molecular probes; Eugene, OR). Images were taken using a FSX100 fluorescence microscope and the software FSX-BSW (Olympus; Tokyo, Japan).

Central nuclei quantification. For the assessment of centrally nucleated fibers (CNF), sections were stained for laminin (for antibodies, see Supplementary Table) to distinguish individual muscle fibers and DAPI to visualize the nuclei. Total and CNF were counted manually, and the results were recorded using the cell counter plug-in from the image J software 1.37 version (NIH; Roth Bethesda, MO). Between 491 and 5,079 fibers (median 1682 fibers) from at least three different mice were counted per age and genotype. Results were expressed as the mean percentage of CNF per muscle. For enhanced visualization of nuclei staining surrounding the sarco-plasmic membrane [(peripheral nuclei (PN)], laminin-DAPI staining images were opened in TIFF format with the Adobe Photoshop program (Adobe[®] Photoshop[®] CS5 extended v.12.0, San Jose, CA, USA) and tone- and saturation-adjusted.

Fiber size determination. Fiber size was calculated from laminin-DAPI stains using the minimal Feret's diameter (Image J software ver. 1.37) to attain the fiber size least influenced by sample sectioning angle¹⁴. Between 240 and 1,444 fibers (median 459 fibers) from at least three different mice were counted per age and genotype.

Fiber type staining and quantification. To identify individual and mixed fiber types, immunostains were made as triple stains for myosin heavy chain (MHC)I/MHCIIA/DAPI, MHCIIA/MHCIIX/DAPI, and MHCIIIX/MHCIIB/DAPI (for antibodies, see Supplementary Table). The different fiber types were counted manually. Between 50 and 980 fibers (median 505 fibers) from at least three different mice were counted per age, genotype and fiber type. The results were recorded using the cell counter plug-in as described above and expressed as the

	Breeding (2013–2018)						Statistics	Total
	WT x HTZ		HTZ x HTZ	McA x HTZ		McA x McA		
	WT (M) x HTZ (F)	HTZ (M) x WT (F)	HTZ (M) x HTZ (F)	McA (M) x HTZ (F)	HTZ (M) x McA (F)	McA (M) x McA (F)		
Total number of breedings	9	10	47	58	6	9	N.A	139
Total number of litters	17	41	273	179	43	30	N.A	583
Total number of mice	103	189	1149	617	130	39	N.A	2227
Total number of males	45	102	578	325	64	19	N.A	1133
% of males	43,7	54,0	50,3	52,7	49,2	48,7	N.A	50,9
Total number of females	58	87	571	292	66	20	N.A	1094
% of females	56,3	46,0	49,7	47,3	50,8	51,3	N.A	49,1
Mice/litter	6,06 (±3,75)	4,61 (±3,69)	4,21 (±3,33)	3,45 (±2,75)	3,02 (±2,15)	1,30 (±1,74)	p < 0.0001	3,77 (±1,61)
	5,03 (±3,73)		4,21 (±3,33)	3,36 (±2,64)		1,30 (±1,74)		
N° litters with 100% mortality	3	13	61	48	7	14	N.A	146
% litters with 100% mortality	5,5		22,3	24,8		35,9	N.A	22,1

Table 1. McArdle mice colony breeding results between 2013 and 2018. Abbreviations. (M): Males; (F): Females; N.A: Not applicable. To calculate the statistical significance of the number of mice per litter the One-Way ANOVA with post-hoc Tukey Honestly Significant Difference (HSD) test was applied.

Breeding	Post-weaning genotyping									Embryo genotyping		
	WT x HTZ			HTZ x HTZ			HTZ x McA			HTZ x HTZ		
Offsprings	WT	HTZ	McA	WT	HTZ	McA	WT	HTZ	McA	WT	HTZ	McA
N° mice per genotype	96	137	N.A	368	718	67	N.A	580	122	12	17	9
Genotype %	41.2	58.8	N.A	31.9	62.3	5.8	N.A	82.6	17.4	31.5	44.7	23.6
Expected Genotype %	50	50	N.A	25	50	25	N.A	50	50	25	50	25
Statistics	Fisher's test p = 0.035			Chi-square test p < 0.001			Fisher's test p < 0.001			Chi-square test p = 0.864		

Table 2. McArdle mice colony genotyping results between 2013 and 2018. Abbreviations. N.A: Not applicable. To compare obtained *versus* expected mouse genotypes Fisher's exact test (two-group comparisons, *i.e.*, WT x HTZ and HTZ x McA breedings) and Chi-square test (three-group comparisons, *i.e.*, HTZ x HTZ breedings) were used.

percentage of (i) fiber types per muscle, and (ii) CNF per fiber type. For metabolic analyses, type I, IIa and IIb were grouped as oxidative fibers, while type IIx, IIa/IIx and IIx/IIb as glycolytic fibers¹⁵. The results were expressed as the percentage of each group relative to total number of fibers counted.

mRNA analysis. Total RNA was obtained from *gastrocnemius* muscle as previously described¹⁶ following the manufacturer instructions of TRIzol (Invitrogen). RNA was treated with DNase I, amplification grade (Invitrogen) to eliminate any traces of DNA. Complementary DNA was synthesized from RNA using the high-capacity complementary DNA archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), which uses random primers. We used real-time PCR, with TaqMan fluorogenic probes in a 7900 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) to assess *gastrocnemius* RNA levels of: (i) *Pygm* gene (Mm00478582_m1); (ii) glycogen phosphorylase, brain isoform (*Pygb*) gene (Mm00464080_m1); and (iii) glycogen phosphorylase, liver isoform (*Pygl*) gene (Mm00500078_m1). Results were normalized to peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A, *Ppia*) gene messenger RNA levels (probe Mm02342430_g1).

Western blot analysis. Muscle samples from *gastrocnemius* and TA were homogenized using Pellet pestles Cordless motor (Sigma-Aldrich) in cold homogenization buffer (Tris-Hcl 20 mM, NaCl 150 mM and Triton X100 1%) and centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4 °C. Proteins (30 µg) were resolved on Criterion™ TGX™ 4–15% Precast Midi gels (Biorad; Hercules, CA) at 150 V for 90 min and blotted to a polyvinylidene difluoride membrane (Immun-Blot® PVDF membrane, Biorad) using the Trans-Blot® SD Semi-dry Transfer Cell (Biorad) at 20 V for 50 min. Membranes were incubated in primary antibodies overnight at 4 °C and in secondary antibodies for 3 hours at room temperature (Supplementary Table). Ponceau S staining (Sigma-Aldrich) was used as a loading control for all the membranes. Membranes were developed with Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate (Merck-Millipore) and images obtained with a Fujifilm LAS 3000 imager (R&D Systems; Minneapolis, MN) and quantified with Image J, version 1.37.

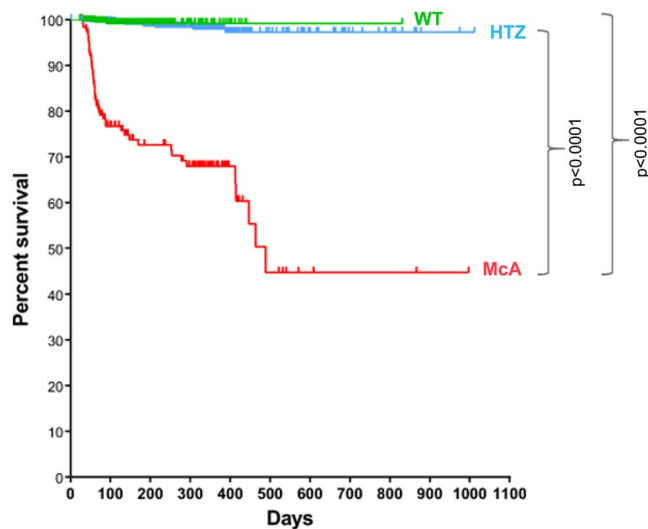


Figure 1. Kaplan and Meier survival plot for the wild-type (WT), heterozygous (HTZ) and McArdle (McA) mice born between 01/01/2013 and 05/08/2018. There was a significant reduction in the survival rate of McA with respect HTZ and WT [$p < 0.0001$; log-rank (Mantel-Cox test)]. From 464 WT, 461 were censored and 3 spontaneous deaths (events) occurred in 831 days; from 1435 HTZ, 1420 were censored and 15 events occurred in 1012 days; finally, from 189 McA, 137 were censored and 52 events occurred in 997 days.

Muscle glycogen. One hundred and fifty mg of tissue were boiled for 30 min with 30% KOH and, subsequently, 1.2 volumes of 95% ethanol were added to precipitate glycogen. After a centrifugation step (25 min at 840 g), the glycogen pellet was resuspended in 0.3 ml of water. Next, 0.1 ml of 5% phenol was added to 0.1 ml of sample and treated with 0.5 ml of H_2SO_4 (to hydrolyze glycogen to glucose). The mixture was allowed to stand for 30 min at room temperature and the glucose released was measured spectrophotometrically at 490 nm. A standard curve made with glycogen purified from rabbit liver (Sigma-Aldrich), ranging from 0.1 to 0.8 $mg\ mL^{-1}$, was processed in parallel. The results were expressed as $mg\ glycogen\ (g\ wet\ tissue)^{-1,17}$.

Statistics. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software. To analyze the aging effects on muscle fiber size determination (mFd), as well as the number of mice per litter in the colony breeding (normally distributed values), One-Way ANOVA with post-hoc Tukey Honestly Significant Difference (HSD) test was applied. To analyze the aging effects when values were not normally distributed (% CNF, % MHCE+, % fiber types, PN per fiber, glycogen content, mRNA and protein relative levels), the non-parametric Kruskal-Wallis One-Way ANOVA with multiple comparisons test (*Dunn's test*) was used. To analyze the genotype effects in normally distributed values, a Student t-test was applied, whereas the non-parametric Mann-Whitney U-test was used when values were not normally distributed. To evaluate the distinct survival rates of each genotype (Kaplan- Meier curve), the log-rank (Mantel-Cox) test was used. To compare obtained versus expected mouse genotypes we used the Fisher's exact test (two-group comparisons, *i.e.*, WT x HTZ and HTZ x McA breedings) or the Chi-square test (three-group comparisons, *i.e.*, HTZ x HTZ breedings).

Results

Perinatal mortality. During the period from January 2013 to May 2018 a total of 139 matings of the McArdle mouse model colony were performed. From these, 19 were wild-type (WT) x heterozygous (HTZ), 47 HTZ x HTZ, 64 McArdle (McA) x HTZ and 9 McA x McA matings, resulting in a total of 583 litters and 2,227 mice [1,133 males (51%) and 1,094 females (49%)] (Table 1). The number of offspring was significantly different among the distinct matings, showing that a higher presence of the mutant p.R50X allele in parents significantly reduced the number of mice per litter in the offspring (Table 1); additionally, the presence of the p.R50X allele in parents was also associated with an increased percentage of litters with a 100% mortality (Table 1). Furthermore, when the offspring mice originating from HTZ x HTZ and McA x HTZ matings were genotyped we observed a clear decrease in the proportion of McA offspring compared to the expected 25% and 50%, respectively, from Mendelian inheritance (Table 2). Genotyping of 38 embryos originating from HTZ x HTZ mating demonstrated a normal Mendelian distribution of McA mouse embryos (Table 2). These results suggest that McA mice have high perinatal mortality.

Post-weaning mortality. A survival curve for all post-weaning genotyped mice ($n = 2,088$; WT = 464; HTZ = 1,435; McA = 189; including males and females) was calculated. There was a significant reduction in the survival rate of McA mice compared with WT and HTZ (Fig. 1); the accumulative survival for WT was 99.3% in a serial time of 831 days, 98.9% for HTZ in a serial time of 1012 days, and only 44.7% in McA mice in a serial time of 997 days (Fig. 1).

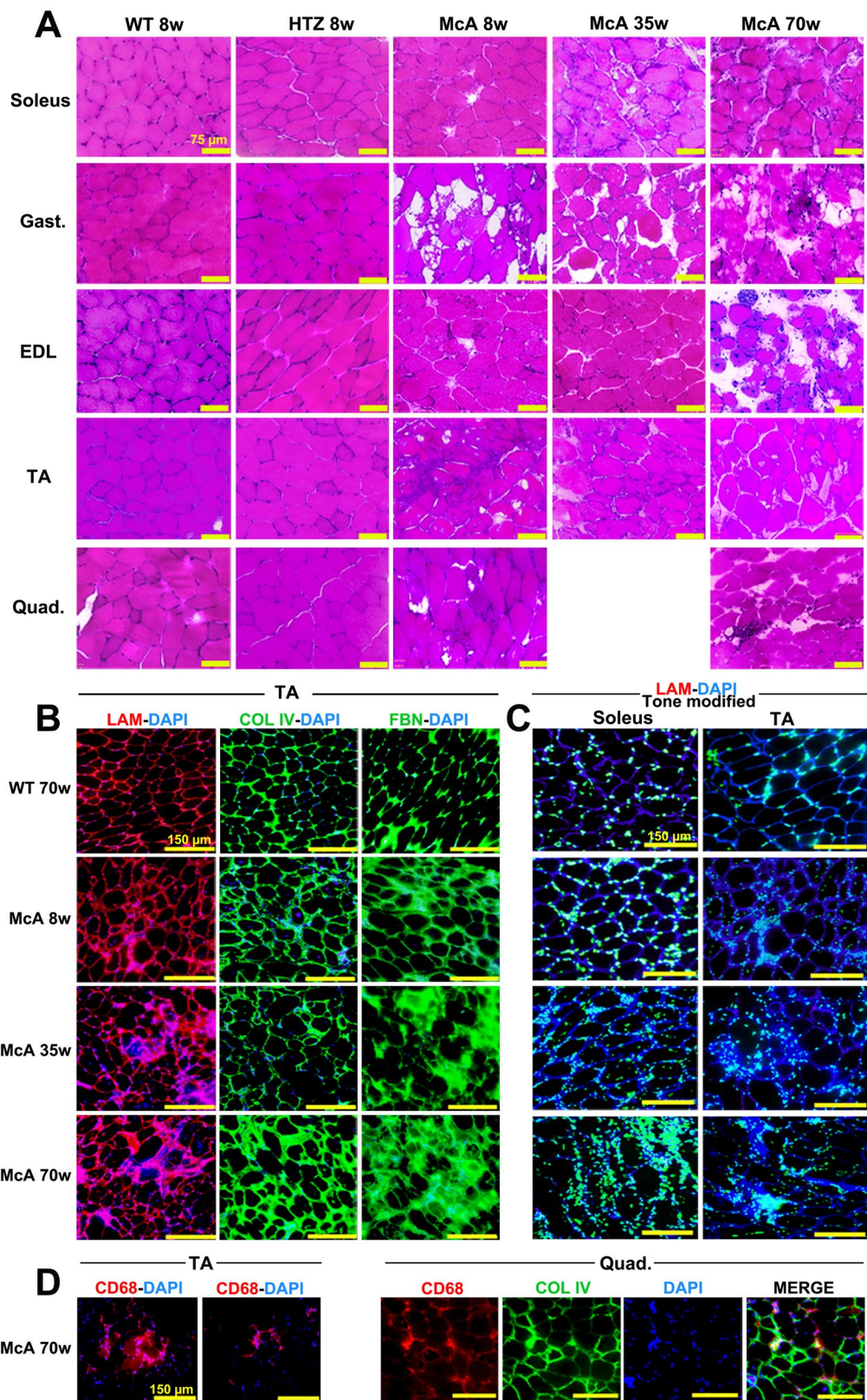


Figure 2. Histological characterization of McArdle mice. (A) H&E staining of the *soleus*, *gastrocnemius*, *extensor digitorum longus* (EDL), *tibialis anterior* (TA) and *quadriceps* muscles from 8-week-old wild-type (WT) and heterozygous (HTZ) and 8, 35 and 70-week-old McArdle (McA) mice. All scale bars correspond to 75 μ m. (B) Laminin-DAPI, Col IV-DAPI and FBN-DAPI stains of TA muscles from 8, 35 and 70-week-old McA and 70-week-old WT. All scale bars correspond to 150 μ m. (C) Tone modified (Adobe® Photoshop® tone and saturation adjustments were set at -105 and $+25$, respectively) laminin-DAPI stain of *soleus* and TA muscles from 70-week-old WT and 8, 35 and 70-week-old McA. Due to the tone modification laminin staining has

become dark blue, whereas DAPI staining has become light blue/green and nuclei are much more highlighted. All scale bars correspond to 150 μm . **(D)** CD68 (pan-macrophage marker)-DAPI staining of TA from 70-week-old McA and CD68, Col IV and DAPI stains of *quadriceps* from 70-week-old McA mice.

Degeneration, fibrosis and inflammation. Histopathological evaluation of *soleus*, EDL, *gastrocnemius*, TA and *quadriceps* from 8, 35 and 70-week-old McA mice using H&E-staining revealed several muscle fibers in disarray, variations in fiber size, with large intra-fiber voids and some CNF and an increase in the extracellular matrix area, that became more apparent in 70-week-old mice (Fig. 2A). Additionally, detailed images from 8, 35 and 70-week-old McA EDL muscle showed the presence of muscle regions with a high proportion of CNF along with an increase in the number of central nuclei per fiber in the EDL of 70-week-old mice (Supplementary Fig. 1). To assess whether this age-related increase in the extracellular matrix area was associated with fibrosis, muscle sections were stained with laminin, collagen IV (Col IV) and fibronectin (FBN) antibodies. TA from 8, 35 and 70-week-old McA mice clearly demonstrated fibrosis compared to age-matched WT mice (Fig. 2B and Supplementary Fig. 2A). Furthermore, in order to determine whether this finding was also present in other muscle types, laminin-fibronectin double stain as well as collagen I (Col I) and Col IV single stains were performed in EDL, *quadriceps* and *soleus* from WT and McA mice; in these muscles, the laminin and fibronectin stains were specially marked in the EDL and *soleus* of 70-week-old McA, while in *quadriceps* the increase was less evident (Supplementary Fig. 2B). Additionally, using laminin-DAPI stain, we observed an increase in the number of nuclei surrounding the sarcoplasmic membrane of TA and *soleus* muscle fibers, which was already apparent in 8-week-old McA mice, with a subtle increase in 35 and 70-week-old McA mice (Fig. 2C and Supplementary Fig. 3). To determine whether this increase was associated with an increment in the presence of inflammatory cells, we stained TA and *quadriceps* muscles with the CD68 macrophage marker¹⁸, and observed that high intensities of CD68 staining co-localized with the presence of multiple nuclei outside the sarcoplasmic membrane (Fig. 2D), reflecting the presence of an inflammatory response. Additionally, CD68, Col IV and DAPI stains co-localized in the quadriceps of 70-week-old McA mice, suggesting that fibrosis and inflammation are associated processes in the skeletal muscle of these mice (Fig. 2D).

Age-dependent increase in fiber degeneration. Muscle fiber types IIa and IIx have previously been found to be the most degenerated muscle fibers in 20-week-old McA mice due to massive intermyofibrillar and subsarcolemmal glycogen accumulation disturbing the ultrastructure¹⁰. In the present study, IIa and IIx fibers degeneration was observed in *soleus* muscle of 8-week-old McA mice, which was further exacerbated in 35- and 70-week-old McA animals (Fig. 3A,C); interestingly, type I fibers presented almost normal morphology in the three age groups (Fig. 3A,C). Similarly, degeneration of IIa, IIx and IIa/IIx fibers was already observed in TA muscle from 8-week-old McA mice, although it was more pronounced in 70-week-old mice (Fig. 3B). Additionally, as previously reported¹⁰, mixed IIx/IIb fibers were less affected than IIx fibers alone (Fig. 3D). Of note, higher accumulations of the extracellular matrix protein fibronectin were observed in TA regions where IIx fibers were predominant, while in areas with IIx/IIb fibers, less fibronectin staining was seen (Fig. 3D); thus, an inverse correlation between fibrosis and presence of IIx/IIb fibers might exist.

Muscle regenerates differentially depending on fiber type composition. In order to assess whether McA mice muscles were progressively affected by the excess of glycogen, we quantified the presence of CNF as a marker for the ongoing degeneration/regeneration cycles known to exist in McA mouse muscles¹⁰. The percentage of CNF was superior in McA vs. WT in the *soleus*, *gastrocnemius*, EDL and TA in the three age groups (Fig. 4A); additionally, there was an age-dependent increase in the mean percentage of CNF in the *soleus* of the McA mice (8-, 35- and 70-week-old: 11, 24 and 28%, respectively) that was not observed in *gastrocnemius*, EDL, TA and *quadriceps* (Fig. 4A). Thus, while TA showed the highest proportion of CNF in 8-week-old McA mice (24%), the *soleus* muscle presented the highest percentage in 70-week-old McA animals (28%) (Fig. 4B).

Increased number of CNF in type I and IIx/IIb fibers during aging. To assess if specific fiber types were more prone to degeneration, the percentage of CNF was quantified within the different fiber types in one oxidative muscle (*soleus*) and two glycolytic muscles (EDL and TA). In *soleus* muscle, CNFs were increased in type I fibers between 8 and 70-week-old McA mice, whereas no increase was observed in IIa fibers (Fig. 5A). In the EDL muscle, there was a significant increase in the percentage of CNF in type IIx/IIb fibers between 70 and 8-week-old McA mice (Fig. 5B). In TA, no change in CNF was found between the different ages (Fig. 5C).

Co-localization of MHCE with IIa, IIa/IIx and IIx fibers. We next analyzed the expression of the embryonic myosin heavy chain (MHCE), a marker of ongoing (acute) regeneration in McA mice through aging and different muscles/fiber types. In this regard, McA mouse muscle sections were double stained for Col IV and MHCE and for type I/IIa/IIx fibers. Both in *soleus* from 8 and 35-week-old McA mice and TA from 70-week-old McA mice, MHCE was only found in types IIa, IIa/IIx and IIx, but not in type I fibers. (Fig. 6A–C). Additionally, we also observed that there was a general trend towards a decrease in the number of MHCE positive fibers during aging in all the three muscles analyzed (Fig. 6D).

Fiber size and fiber type composition. To determine whether muscle degeneration affected muscle fiber size in McA mice, mFd was measured in the different muscles and age groups; while there were ~18% and ~4% mean fiber size increases in *soleus* and *quadriceps*, respectively (Fig. 7A), between 70 and 8-week-old McA mice, ~4, ~6 and ~19% mean fiber size decreases were observed in TA, *gastrocnemius* and EDL, respectively, between the same ages (Fig. 7B). These results suggest that among the analyzed muscles, *soleus* and *quadriceps* fibers

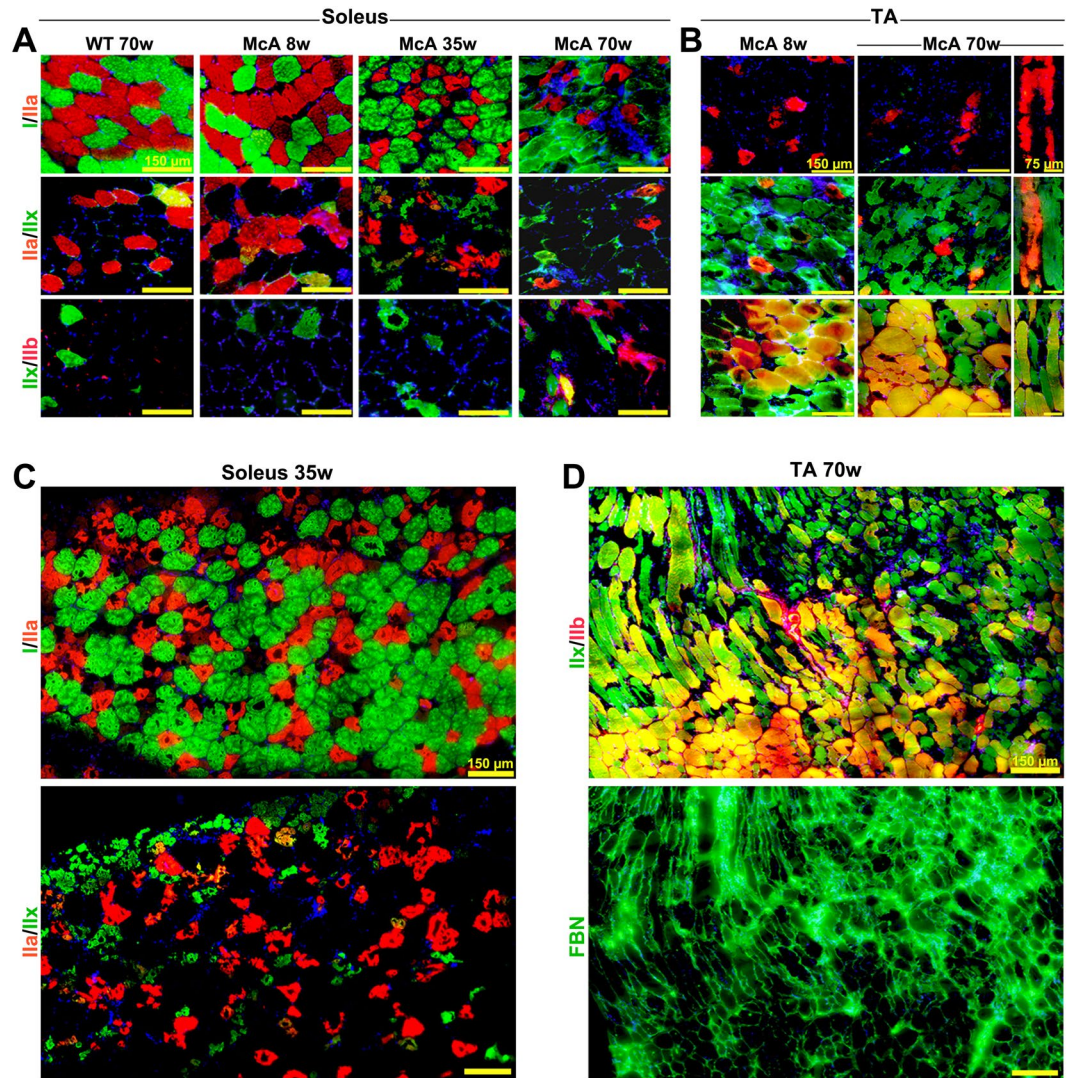


Figure 3. Age-dependent increase of IIa and IIx fibers atrophy. (A) Fiber type stains for myosin heavy chain (MHC) I, IIa, IIx, and IIb as overlapping double stains in *soleus* muscle from McArdle (McA) mice demonstrate that type I fibers are not affected structurally by glycogen accumulation in any of the ages analyzed, whereas type IIa, IIa/IIx mixed, and IIx fibers present an age-dependent increase in atrophy. All scale bars correspond to 150 μm. (B) MHC double stain in *tibialis anterior* (TA) muscle shows atrophy in IIa, IIx and mixed IIa/IIx fibers in 8-week-old McArdle (McA) mice, which is further exacerbated in 70-week-old McA mice. Mixed IIx/IIb fibers seems to be protected from atrophy. Longitudinal sections are also shown. (C) Consecutive *soleus* sections from 35-week-old McA mice stained for I/IIa and II/IIx fibers showing almost intact type I fibers but highly degenerated IIa, IIx and IIa/IIx fibers. Scale bars correspond to 150 μm. All scale bars correspond to 150 μm, while in longitudinal sections the scale bars correspond to 75 μm. (D) Two consecutive sections of TA muscle from 70 wo McA mice stained for IIx/IIb fibers and fibronectin shows the presence of fibrosis in muscle regions enriched in IIx fibers and its absence in IIx/IIb enriched sections. In (A–D) DAPI was used to stain cell nuclei.

are the least affected by McA disease during aging process in terms of fiber size. To further confirm the specific degeneration of IIa and IIx fibers during aging, we measured the mFd for each specific fiber type in the *soleus* of McA mice and observed that type I fibers were significantly larger than IIa and IIx fibers in 8-week-old McA animals (Fig. 7C). Additionally, while there was an ~8% increase in type I fiber size between 8 and 70-week-old McA mice, 7.5 and 11% decreases in type IIa and IIx fiber size, respectively, were observed between the same ages in the *soleus* of McA mice (Fig. 7D). These results suggest that repeated episodes of muscle damage and subsequent regeneration over mice life do not affect type I fiber size, but clearly reduce that of type IIa and IIx fibers. In *soleus*, EDL TA muscle we did not detect any changes in fiber type composition between the different ages and genotypes (Supplementary Fig. 4A–C). Next, we wanted to determine whether the overall muscle metabolism was affected. Fiber types were grouped either as oxidative (I, IIa and I/IIa) or glycolytic (IIx, IIa/IIx and IIx/IIb). While no significant changes were observed in both TA and EDL glycolytic muscles (Supplementary Fig. 5B,C), the *soleus* of McA mice demonstrated a progressive increase in the number of glycolytic fibers and a decrease in oxidative fibers with age, opposite of what was found in *soleus* of WT mice. (Supplementary Fig. 5A).

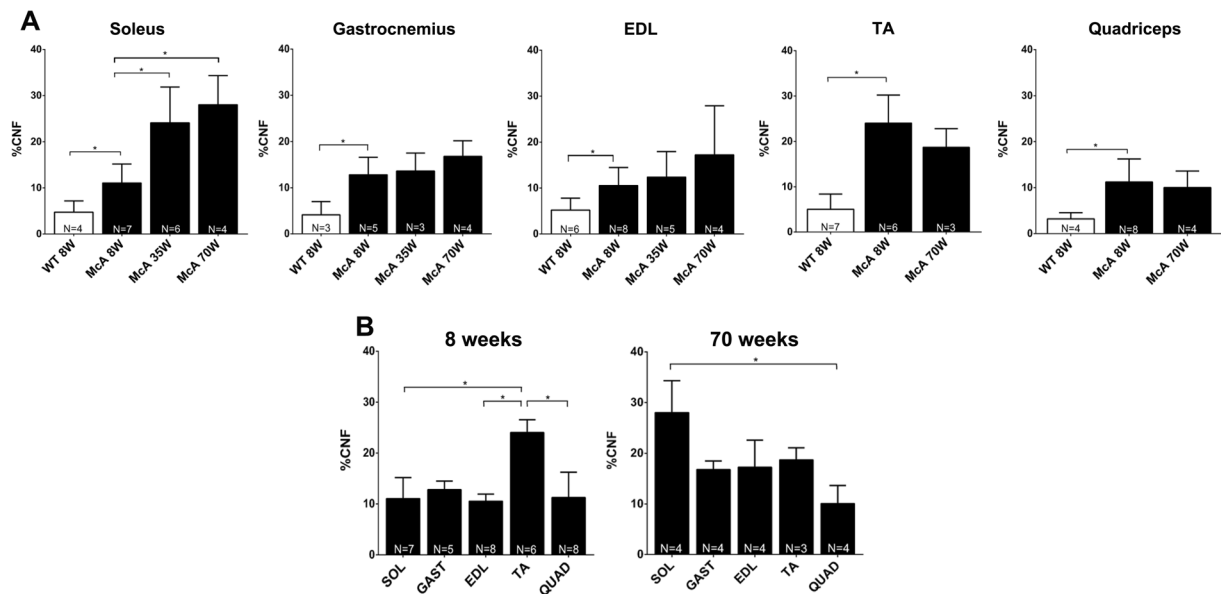


Figure 4. Quantification of centrally nucleated fibers (CNF) among the different muscles and ages. **(A)** Percentage of CNF from the total amount of fibers. White columns correspond to wild-type (WT) mice whereas black columns correspond to McArdle (McA) mice. Only WT values from 8 weeks mice are shown, as values WT values are similar among the three different ages. Each column represents the percentage of CNF resulting from the mean value obtained from 3 to 8 mice. The total number of mice used (N) is indicated at the bottom of each column. In each column between 491 (minimum) and 5,079 (maximum) fibers were counted (median 1682 fibers). Error bars correspond to standard deviation (SD). **(B)** Percentage of CNF in the different muscles of 8 and 70-week-old McA mice. For each age, muscles are represented together. Error bars correspond to SD. The non-parametric Kruskal-Wallis One-Way ANOVA with multiple comparisons test (Dunn's test) was used for statistical analyses. Symbols: * $p < 0.05$.

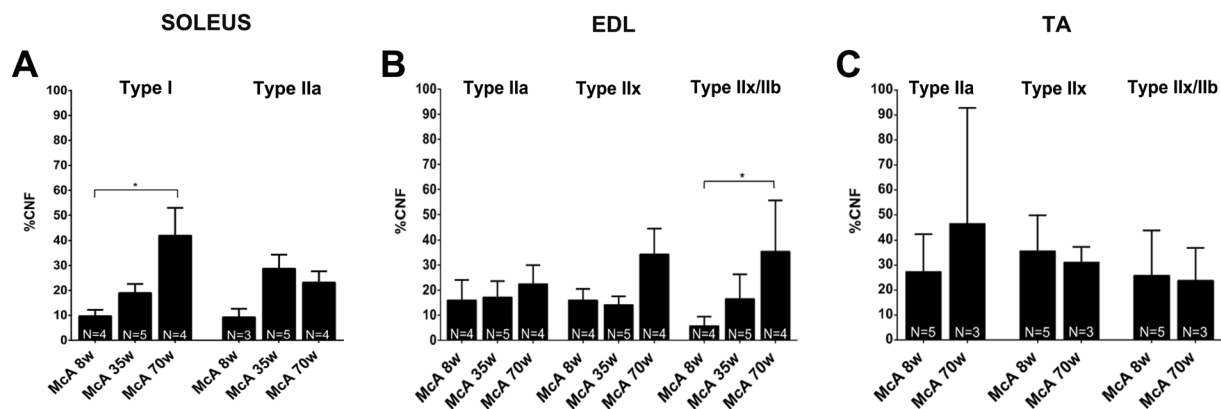


Figure 5. Quantification of central nucleated fibers (CNF) in *soleus*, EDL and TA fiber types. **(A)** Percentage of CNF in *soleus* type I and IIa fibers. In each column between 223 (minimum) and 980 (maximum) fibers were counted (median 612 fibers). **(B)** Percentage of CNF in EDL type IIa, IIx and IIx/IIb fibers. In each column between 177 (minimum) and 651 (maximum) fibers were counted (median 413 fibers). **(C)** Percentage of CNF in TA type IIa, IIx and IIx/IIb fibers. In each column between 50 (minimum) and 930 (maximum) fibers were counted (median 520 fibers). The N at the bottom of each column represents the number of mice used to calculate the mean values. Error bars correspond to SD. The non-parametric Kruskal-Wallis One-Way ANOVA with multiple comparisons test (Dunn's test) was used for statistical analyses. Symbols: * $p < 0.05$.

No progressive accumulation of glycogen in McArdle mice. We observed that glycogen levels were highly increased at all ages and muscles of McA mice compared with WT or HTZ using PAS stain (Fig. 8A). Biochemical quantification of glycogen in TA, *quadriceps* and *gastrocnemius* muscles in 8 and 70-week-old mice demonstrated that muscle glycogen levels were significantly higher in McA mice compared to WT (Fig. 8B). However, no difference in glycogen levels were found between 8 and 70-week-old McA mice in any of the three muscles examined (Fig. 8B). We analyzed the glycogen synthase (GS) expression and activation levels, as well as the expression levels of the of the different glycogen phosphorylase isoforms in *gastrocnemius* and TA muscles to

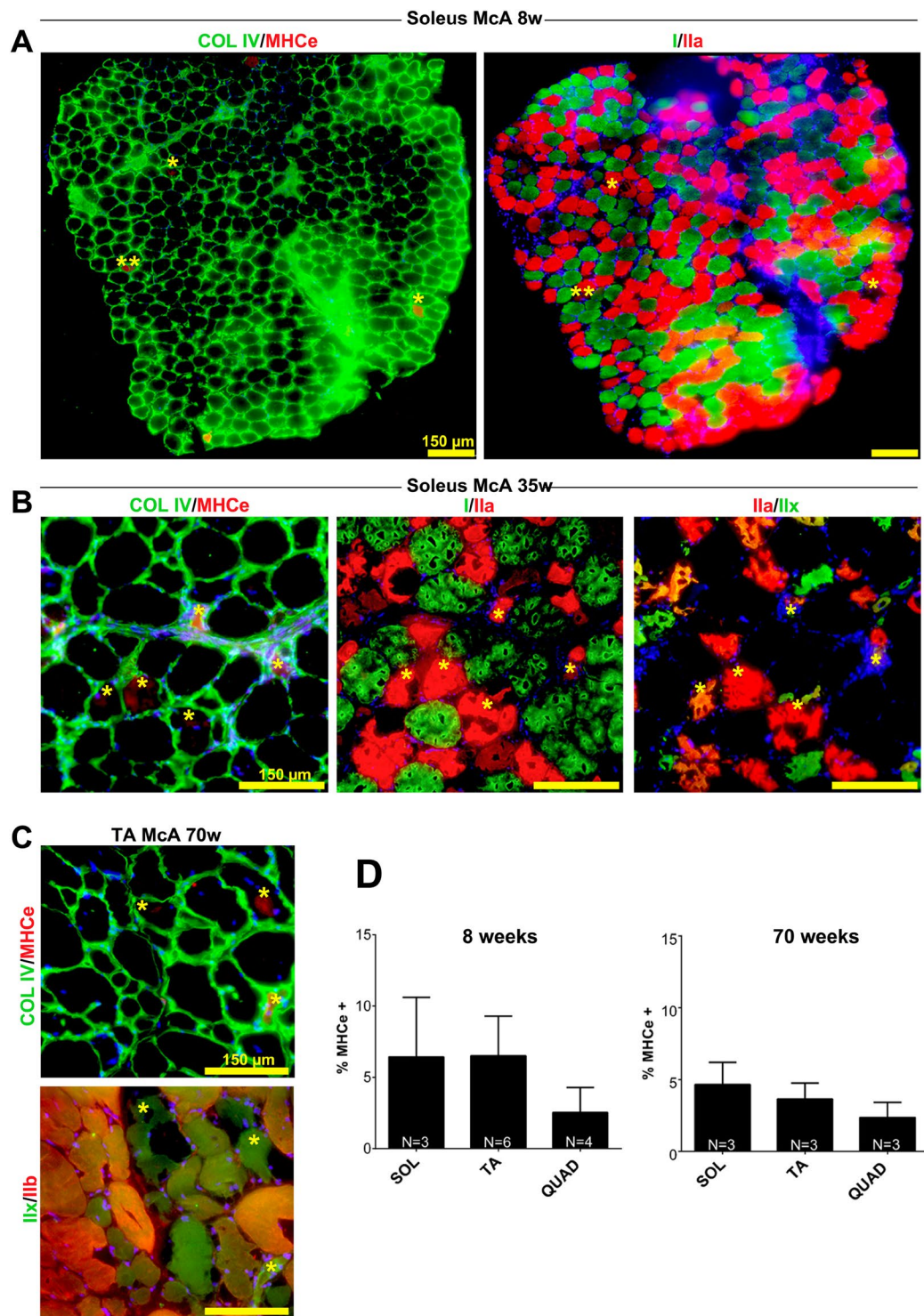


Figure 6. Co-localization of embryonic myosin heavy chain (MHCe) with Ila and Iix fibers. **(A)** Two consecutive *soleus* sections from 8-week-old McArdle (McA) mice were stained for Collagen IV and MHCe in the first section, and MHC I and Ila in the second section. All detected MHCe positive fibers co-localized with MHC Ila staining. **(B)** Three consecutive *soleus* sections from 35-week-old McA mice were double stained for collagen IV/MHCe, MHC I/Ila and MHC Ila/Iix showing a colocalization of the MHCe and Ila stainings. **(C)** Two consecutive TA sections were double stained for Collagen IV and MHCe in the first section and MHC Iix and Iib in the second section, showing co-localization of the MHCe and MHC Iix stainings. In all cases yellow asterisks mark identical fibers among sections and scale bars correspond to 150 μ m. **(D)** Percentage of MHCe positive fibers in *soleus*, *tibialis anterior* (TA) and *quadriceps* of 8 and 70-week-old McA mice. N is the number of mice used to calculate the mean values. In each column between 619 (minimum) and 2250 (maximum) fibers were counted (median 1462 fibers). Error bars correspond to standard deviation (SD). The non-parametric Kruskal-Wallis One-Way ANOVA with multiple comparisons test (Dunn's test) was used for statistical analyses.

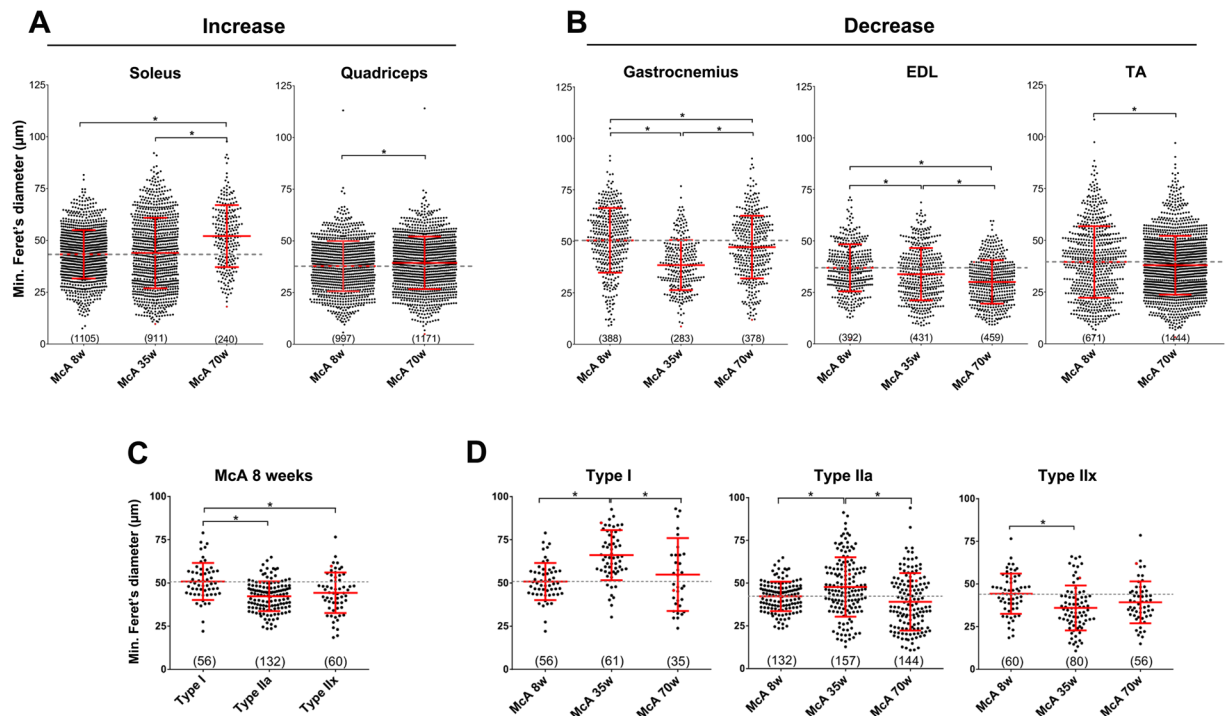


Figure 7. Fiber size determination using the minimum Feret diameter (mFd). **(A)** Fiber size increase in *soleus* and *quadriceps* between 8 and 70-week-old McA mice. **(B)** Fiber size decrease in *gastrocnemius*, EDL and TA between 8 and 70-week-old McA mice. **(C)** Type I, IIa and IIx *soleus* fiber size from 8-week-old McA mice. **(D)** Type I *soleus* fiber size increase and IIa and IIx fiber size decrease between 8 and 70-week-old McA mice. Data is represented as a Scatter Plot. Each dot represents the mFd of a single fiber. A grey dot-line indicates the mean value of McA 8-week-old mice in each muscle. For each plot the mean value and the SD are also indicated in red. Between each plot is indicated the total amount of fibers (between brackets) counted. Between 3 to 5 mice were used in each column. One-Way ANOVA with post-hoc Tukey Honestly Significant Difference (HSD) test was used for statistical analyses. Symbols: * $p < 0.05$.

determine if any changes were responsible for the absence of progressive glycogen accumulation. Using quantitative PCR, no significant change in *Pygm*, *Pygb* and *Pygl* mRNA levels were detected in *gastrocnemius* between 8 and 70-week-old McA mice (Fig. 9A). Additionally, there was a complete absence of GP-M protein in *gastrocnemius* and TA from McA mice in the three ages analyzed (Fig. 9B). A significant increase in the phosphorylation (and thus inactivation) of GS in McA animals compared with WT in both *gastrocnemius* and TA was observed (Fig. 9B). Thus, to further assess whether the absence of progressive glycogen accumulation could be associated with an increase in lysosomal glycogen degradation we compared acid- α glucosidase (GAA) protein levels between 70-week-old WT and McA mice, and no changes in GAA protein levels were found (Fig. 9C).

Discussion

Since the publication in 2012 of the article describing the development and characterization of the McArdle mouse model⁶, several studies analyzing the biological consequences of GP-M deficiency in this model have been reported^{17–12}. None of these studies accounted for the potential effects of aging on disease progression and its molecular consequences. Therefore, in the present study, we have performed a longitudinal characterization of the McArdle mouse model and have analyzed its survival rate. The most important observations that we have obtained are: (i) McA mice present high perinatal and post-weaning mortality; (ii) there is a lack of glycogen content increase in McA mice during aging (iii) there is a progressive muscle degeneration, fibrosis and inflammation; (iv) *soleus* (oxidative) and *quadriceps* (glycolytic) are histologically less affected by disease progression than *gastrocnemius*, EDL and TA (glycolytic muscles); (v) there is a progressive degeneration of IIa, IIa/IIx and IIx fibers, whereas IIx/IIb and specially type I fibers are minimally affected and (vi) no major change in muscle fiber type composition occurs in McA mice during aging.

In this longitudinal study (from 2013 to 2018), we have collected sufficient data (from 139 matings and more than 2,000 offspring mice) to establish that difficulties associated with the management of the McA mouse colony are evident. The difficulties are caused by perinatal and post-weaning mortality of McA mice. Only two cases of fatal infantile form of McArdle disease (16 days and 13 weeks after birth, respectively)^{19,20} associated with hypotonia¹⁹, respiratory deficiency^{19,20} and generalized weakness²⁰ have been reported. In this context, we could not identify the causes for the perinatal death in McA mice and whether these were similar to those involved in the aforementioned fatal infantile forms in patients. However, it is possible that this issue is solvable by splitting litters and adding a lactating female mouse without litters. This may reduce the risk of fighting among littermates for food, which McA mice likely are not well equipped for due to their weaker condition.

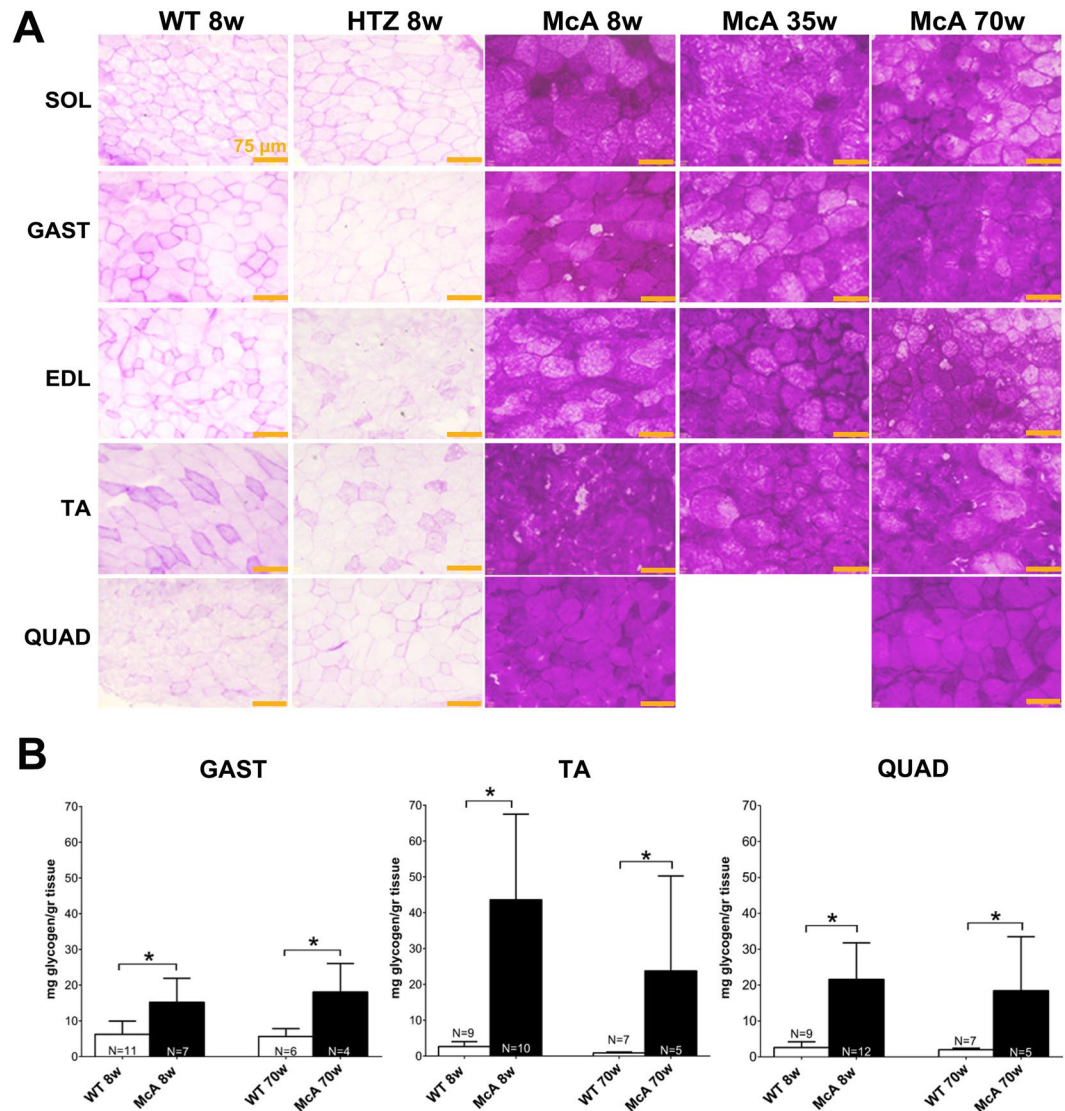


Figure 8. Histological and biochemical determination of glycogen in different muscles and ages of McArdle (McA) mice. **(A)** PAS staining of *soleus*, *gastrocnemius*, *extensor digitorum longus* (EDL), *tibialis anterior* (TA) and *quadriceps* in 8-week-old wild-type (WT) and heterozygous (HTZ) mice as well as in 8, 35 and 70-week-old McA mice. All the scale bars correspond to 150 μ m. PAS staining was markedly increase in all sections from McA mice. **(B)** Biochemical determination of glycogen in TA, *quadriceps* and *gastrocnemius* of 8 and 70 wo WT and McA mice. N indicates the number of muscles used to calculate the mean values. Error bars correspond to SD. The non-parametric Kruskal-Wallis One-Way ANOVA with multiple comparisons test (*Dunn's test*) was used for statistical analyses. Symbols: * $p < 0.05$.

We have observed an aging-associated progressive degeneration of muscle fibers, fibrosis and infiltration of inflammatory cells in all the studied muscles. However, this study has demonstrated a differential affection and progression of muscle with age. *Quadriceps* and *soleus* seemed to be less histologically affected by disease progression than *gastrocnemius*, EDL and TA. In the case of the *soleus* this observation was supported by an increase in fiber size and CNF with aging, suggesting that its muscle fibers might be able to withstand repeated cycles of damage and regeneration (this increase was not observed in *gastrocnemius*, EDL, TA and *quadriceps* muscle fibers indicating that these might not be as resistant to progressive damage, leading to their subsequent degeneration); and also by the presence of type I fiber, predominant in the *soleus*, that were almost structurally unaffected in McA mice at all ages analyzed. With respect to *quadriceps*, low fibrosis accumulation and mild fiber size increase during aging suggested that this muscle was less affected by disease progression than *gastrocnemius*, EDL and TA. Furthermore, we had previously reported a seven-fold lower expression of *Pygm* mRNA and GP-M protein in *quadriceps* in comparison to TA¹⁰. The lower glycogen levels in the *quadriceps* compared to TA muscle of McA mice, points to a moderate use of glycogen metabolism in *quadriceps* in comparison to other glycolytic muscles. The higher content of IIb fibers in *quadriceps* compared to TA and EDL confers an compensatory increase in uptake of glucose for direct glycolysis^{11,21–23}; additionally, in rat fiber types it was observed that insulin-directed

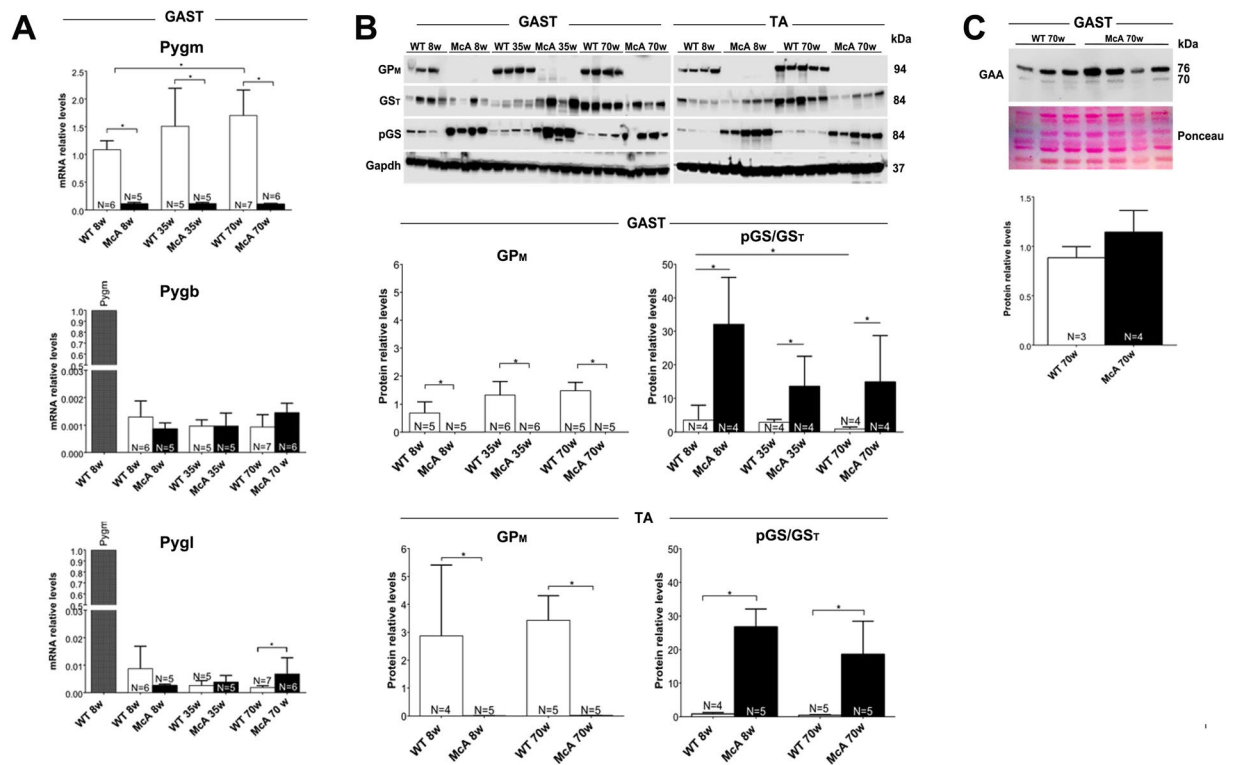


Figure 9. Expression studies of genes involved in glycogen synthesis and degradation. (A) Quantitative PCR analysis of the different glycogen phosphorylase isoforms in the *gastrocnemius* muscle. In the *Pygb* and *Pygl* studies, the relative *Pygm* expression values in one *gastrocnemius* muscle is shown. (B) Western blot analysis of GP_M, total GS (GS_T) and phospho serine 641 GS (pGS_{Ser641}) in *gastrocnemius* and *tibialis anterior* (TA) muscles. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (*Gapdh*) was used as a loading control. The blot images were obtained with Fujifilm LAS 3000 imager. These are cropped images. Uncropped original images can be found in Supplementary Fig. 5. The relative quantification for GP_M protein results from GP_M/*Gapdh* ratio after image J quantification as well as the relative quantification of the phosphorylated fraction of (inactive) GS protein. This quantification results from pGS/GS_T ratio after image J quantification. (C) Alpha acid glucosidase protein levels in 70 w/o WT and McA mice determined by western blot. Ponceau staining was used for loading normalization. Error bars correspond to standard deviation (SD). The non-parametric Kruskal-Wallis One-Way ANOVA with multiple comparisons test (*Dunn's test*) was used for statistical analyses. Symbols: **p* < 0.05.

glucose uptake took place preferentially in IIA fibers (IIa > IIx, IIb), while in IIb fibers glucose uptake was mainly contraction-induced through AMPK mechanisms²⁴. Thus, the contraction-induced glucose uptake for direct metabolism rather than glycogen synthesis might spare the *quadriceps* from devastating glycogen accumulation¹⁰. All these observations clearly indicated that the differential progression of muscle degeneration among glycolytic muscles in McA mice related to their different fiber type composition. In this regard, we previously reported that types I/IIa, IIa, IIa/IIx and IIx muscle fibers presented evident signs of degeneration in McA mice, while type IIx/IIb and specially type I fibers were almost unaffected¹⁰. In the present study, we have further confirmed these results as type I fibers had an almost normal morphology across all ages in McA mice, whereas there was a progressive degeneration of IIa, IIx and IIa/IIx fibers (*i.e.*, from 8 to 70 weeks of age). Additionally, all actively regenerating fibers (*i.e.*, MHCe positive) co-stained with IIa, IIx or IIa/IIx fiber type. The reason why type I/IIa, IIa, IIa/IIx and IIx fibers are more affected than type I and IIx/IIb hybrid fibers in the McArdle mouse model is unknown. Yet, a recent study on the proteomics of healthy murine single fiber types²⁵ showed a distinct proteomic content among fiber types that might help to explain the observed differences in fiber type resistance to degeneration. In this regard, Mitsugurmin-53/Trim 72, a protein that plays a role in membrane repair, was found to be considerably more abundant in type I than in all another fiber types²⁵. Additionally, we previously showed in McA mice that type I fibers presented lower levels of glycogen than type II fibers⁶, and the glycogen content levels in the *soleus* of these mice were lower than in the glycolytic muscles *gastrocnemius* and EDL⁷, suggesting a direct correlation between muscle fiber glycogen content and damage. Selective type II fiber degeneration has been previously reported in other myopathies such as Duchenne muscular dystrophy, facioscapulohumeral muscular dystrophy, myotonic dystrophy type 2²⁶ as well as in the alpha-glucosidase knock-out mouse model that mimics the late-onset form of Pompe disease^{27,28}. Several reports also indicate that age-related decline in muscle mass is fiber type-specific, principally affecting type II fibers, with type I fibers remaining largely unaffected^{25,29-31}. Although no major change in fiber type composition was observed in McA mice during the aging process, we observed a trend towards an increase in glycolytic metabolism in the *soleus* muscle with aging in McA mice,

as indicated by a decrease in the percentage of oxidative fibers paralleled by an increase in the proportion of glycolytic fibers in 70-week-old animals. Although the physiologic significance of this observation still needs to be elucidated, it might imply the necessity of this muscle to diversify its metabolism as a protective mechanism against the cytosolic glycogen degradation blockade. Finally, we have shown that progressive muscle degeneration in McA mice during aging is not accompanied by an increase in their muscle glycogen content. This absence of progressive glycogen accumulation was not associated with a re-expression of the *Pygb* and/or *Pygl* genes in mature muscle. Additionally, a significant increase in GS phosphorylation was observed in McA mouse muscles in the three ages analyzed indicating that GS inactivation plays an important role to explain the absence of glycogen content increase. However, some degree of glycogen phosphorylase-independent glycogen degradation cannot be discarded as it remains to be determined whether autophagy-related pathways are progressively involved through aging in McA disease. Although no significant increase in lysosomal GAA was observed in older mice, the enzyme activity might be sufficient to handle potential deviation of glycogen degradation to the lysosomal pathway. Future studies should elucidate whether lysosomal glycogen degradation is affected in McA mice and might determine the link between cytosolic and lysosomal glycogen metabolism in McA disease, as well as its potential therapeutic implications in patients. On the other hand, our finding of an aging-associated progressive degeneration of muscle fibers, fibrosis and infiltration of inflammatory cells in all the studied McA mouse muscles (although with varying degrees of affection depending on muscle type) is important from a translational point of view. Indeed, we have reported in the Spanish Registry of McA patients [originally $n = 239^4$ and $n = 333$ in the more recent update⁵] that age has a detrimental effect on several phenotypic features of the disease, especially on muscle fixed weakness, which affects mostly proximal/trunk muscles⁴. The mean age (57 ± 19 years) of those patients in the highest severity class 3 (that includes presence of fixed muscle weakness) is indeed higher than in those in the lower severity classes 1 (46 ± 19 years, $p = 0.007$)⁵. Thus, the finding of age-associated muscle fibrosis and infiltration found here might provide mechanistic insight for the reported findings in the older patients and should be kept in mind as an additional hallmark of the disease.

Data Availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Dimauro, S., Andreu, A. L., Bruno, C. & Hadjigeorgiou, G. M. Myophosphorylase deficiency (glycogenosis type V; McArdle disease). *Current molecular medicine* **2**, 189–196 (2002).
2. Lucia, A. *et al.* McArdle disease: what do neurologists need to know? *Nature clinical practice. Neurology* **4**, 568–577, <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0913> (2008).
3. Dimauro, S., Akman, O. & Hays, A. P. Disorders of carbohydrate metabolism. *Handbook of clinical neurology* **86**, 167–182, [https://doi.org/10.1016/S0072-9752\(07\)86007-6](https://doi.org/10.1016/S0072-9752(07)86007-6) (2007).
4. Lucia, A. *et al.* Genotypic and phenotypic features of McArdle disease: insights from the Spanish national registry. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **83**, 322–328, <https://doi.org/10.1136/jnnp-2011-301593> (2012).
5. Santalla, A. *et al.* Genotypic and phenotypic features of all Spanish patients with McArdle disease: a 2016 update. *BMC genomics* **18**, 819, <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4188-2> (2017).
6. Nogales-Gadea, G. *et al.* Knock-in mice for the R50X mutation in the PYGM gene present with McArdle disease. *Brain: a journal of neurology* **135**, 2048–2057, <https://doi.org/10.1093/brain/aws141> (2012).
7. Brull, A. *et al.* Phenotype consequences of myophosphorylase dysfunction: insights from the McArdle mouse model. *The Journal of physiology* **593**, 2693–2706, <https://doi.org/10.1113/JP270085> (2015).
8. Fiuza-Luces, C. *et al.* Muscle Signaling in Exercise Intolerance: Insights from the McArdle Mouse Model. *Medicine and science in sports and exercise* **48**, 1448–1458, <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000931> (2016).
9. Fiuza-Luces, C. *et al.* Muscle molecular adaptations to endurance exercise training are conditioned by glycogen availability: a proteomics-based analysis in the McArdle mouse model. *The Journal of physiology* **596**, 1035–1061, <https://doi.org/10.1113/JP275292> (2018).
10. Krag, T. O. *et al.* Differential Muscle Involvement in Mice and Humans Affected by McArdle Disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **75**, 441–454, <https://doi.org/10.1093/jnen/nlw018> (2016).
11. Krag, T. O. *et al.* Differential glucose metabolism in mice and humans affected by McArdle disease. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **311**, R307–314, <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00489.2015> (2016).
12. Nielsen, T. L., Pinos, T., Brull, A., Vissing, J. & Krag, T. O. Exercising with blocked muscle glycogenolysis: Adaptation in the McArdle mouse. *Molecular genetics and metabolism* **123**, 21–27, <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.11.006> (2018).
13. Kaplan, E. & Meier, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association* **53**, 457–481 (1958).
14. Dubach-Powell, J. Quantitative determination of muscle fiber diameter (minimal Feret's diameter) and percentage of centralized nuclei. *TREAT-NMD Neuromuscular Network DMD_M.1.2.001* (2008).
15. Omairi, S. *et al.* Enhanced exercise and regenerative capacity in a mouse model that violates size constraints of oxidative muscle fibres. *eLife* **5**, <https://doi.org/10.7554/eLife.16940> (2016).
16. Nogales-Gadea, G. *et al.* Expression of the muscle glycogen phosphorylase gene in patients with McArdle disease: the role of nonsense-mediated mRNA decay. *Human mutation* **29**, 277–283, <https://doi.org/10.1002/humu.20649> (2008).
17. Lo, S., Russell, J. C. & Taylor, A. W. Determination of glycogen in small tissue samples. *Journal of applied physiology* **28**, 234–236, <https://doi.org/10.1152/jappl.1970.28.2.234> (1970).
18. Barros, M. H., Hauck, F., Dreyer, J. H., Kempkes, B. & Niedobitek, G. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS one* **8**, e80908, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080908> (2013).
19. Milstein, J. M., Herron, T. M. & Haas, J. E. Fatal infantile muscle phosphorylase deficiency. *Journal of child neurology* **4**, 186–188, <https://doi.org/10.1177/088307388900400305> (1989).
20. DiMauro, S. & Hartlage, P. L. Fatal infantile form of muscle phosphorylase deficiency. *Neurology* **28**, 1124–1129 (1978).
21. Augusto, V., Padovani, C. R. & Rocha-Campos, E. G. Skeletal muscle fiber types in C57Bl6j mice. *Brazilian journal of morphological sciences* **21**, 89–94 (2004).
22. D'Antona, G. *et al.* Structural and functional alterations of muscle fibres in the novel mouse model of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *The Journal of physiology* **584**, 997–1009, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.141481> (2007).

23. Bloemberg, D. & Quadrilatero, J. Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis. *PLoS one* **7**, e35273, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035273> (2012).
24. Mackrell, J. G. & Cartee, G. D. A novel method to measure glucose uptake and myosin heavy chain isoform expression of single fibers from rat skeletal muscle. *Diabetes* **61**, 995–1003, <https://doi.org/10.2337/db11-1299> (2012).
25. Murgia, M. *et al.* Single muscle fiber proteomics reveals unexpected mitochondrial specialization. *EMBO reports* **16**, 387–395, <https://doi.org/10.15252/embr.201439757> (2015).
26. Talbot, J. & Maves, L. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* **5**, 518–534, <https://doi.org/10.1002/wdev.230> (2016).
27. Fukuda, T. *et al.* Autophagy and lysosomes in Pompe disease. *Autophagy* **2**, 318–320 (2006).
28. Raben, N. *et al.* Suppression of autophagy in skeletal muscle uncovers the accumulation of ubiquitinated proteins and their potential role in muscle damage in Pompe disease. *Human molecular genetics* **17**, 3897–3908, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn292> (2008).
29. Brunner, F. *et al.* Effects of aging on Type II muscle fibers: a systematic review of the literature. *Journal of aging and physical activity* **15**, 336–348 (2007).
30. Grimby, G. Muscle performance and structure in the elderly as studied cross-sectionally and longitudinally. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* **50**(Spec No), 17–22 (1995).
31. Miljkovic, N., Lim, J. Y., Miljkovic, I. & Frontera, W. R. Aging of skeletal muscle fibers. *Annals of rehabilitation medicine* **39**, 155–162, <https://doi.org/10.5535/arm.2015.39.2.155> (2015).

Acknowledgements

The present study was funded by grants received from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS, grant PI16/01492 and PI15/00558) and cofunded by Fondos FEDER. Gisela Nogales-Gadea is supported by a Miguel Servet research contract (ISCIII CD14/00032 and FEDER) and Instituto de Salud Carlos III grant PI15/01756 and by a Trampoline Grant #21108 from AMF Telethon.

Author Contributions

A.R.-M., A.B., N.d.L. and T.P. designed and performed all the experiments; J.H., G.T., M.A.M., J.A., A.L.A., G.N.-G., J.V., T.O.K. and T.P. analyzed the data; A.L.A., T.O.K. and T.P. wrote the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41414-8>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

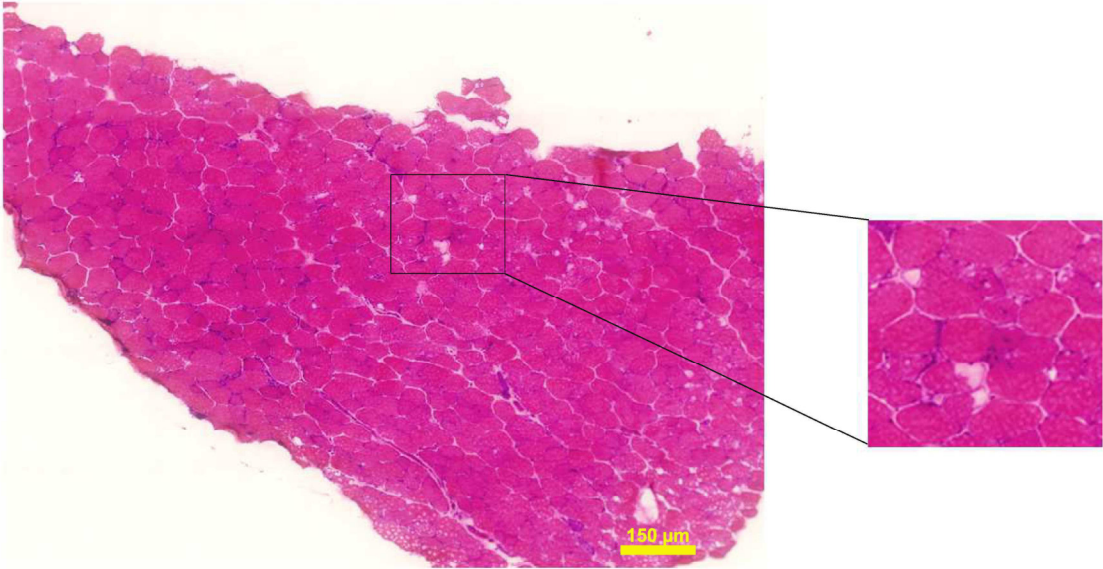
© The Author(s) 2019

**Low survival rate and muscle fiber-dependent aging effects in the
McArdle disease mouse model**

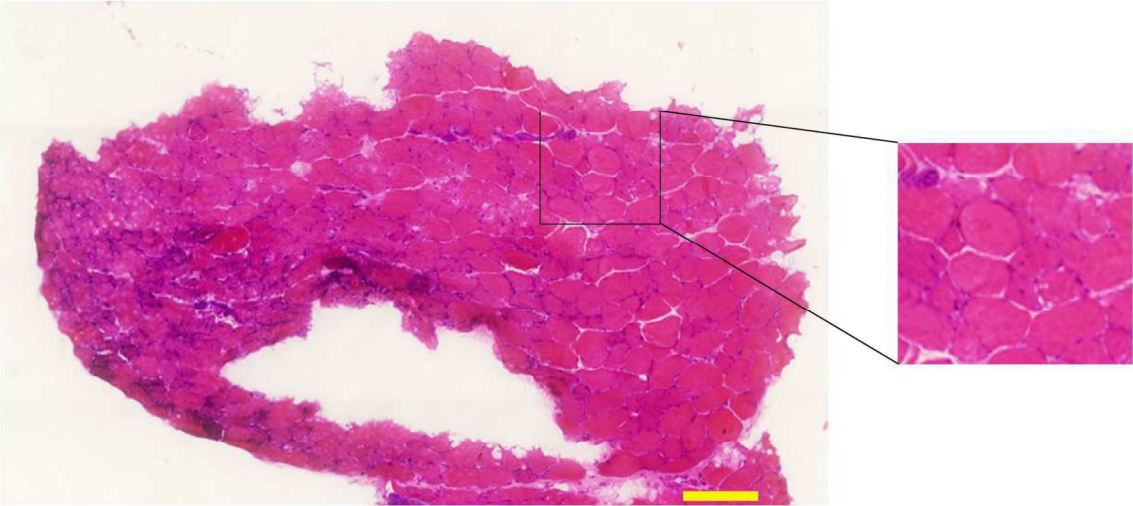
Real-Martinez A^{1#}, Brull A^{2#}, Huerta J¹, Tarrasó G¹, Lucia A^{3,4,5}, Martin MA^{4,5}, Arenas
J^{4,5}, Andreu AL^{1,5}, Nogales-Gadea G^{5,6}, Vissing J⁷, Krag TO⁷, de Luna N^{8,5#} and Pinós
T^{1,5#*}

SUPPLEMENTARY FILES

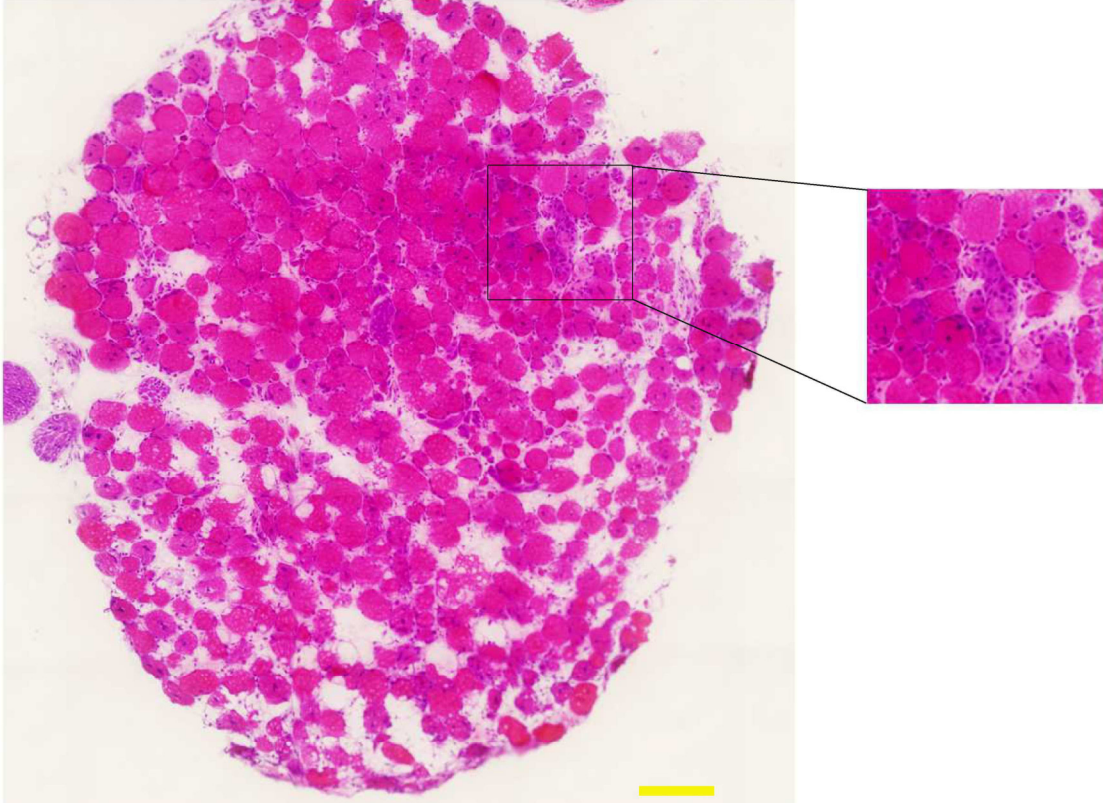
EDL 8 weeks



EDL 35 weeks

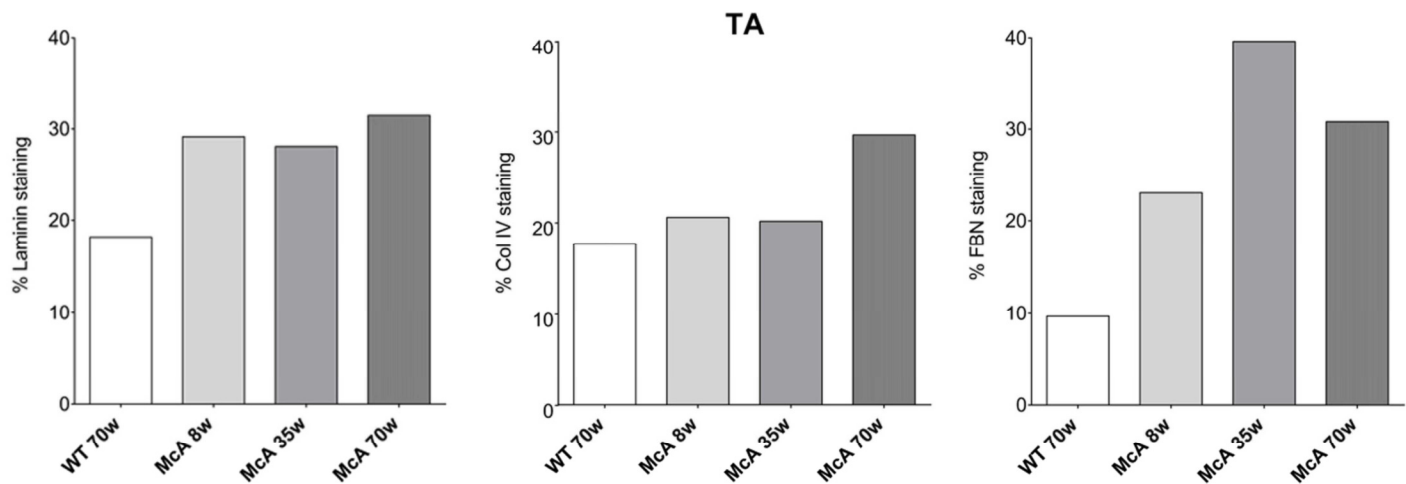


EDL 70 weeks

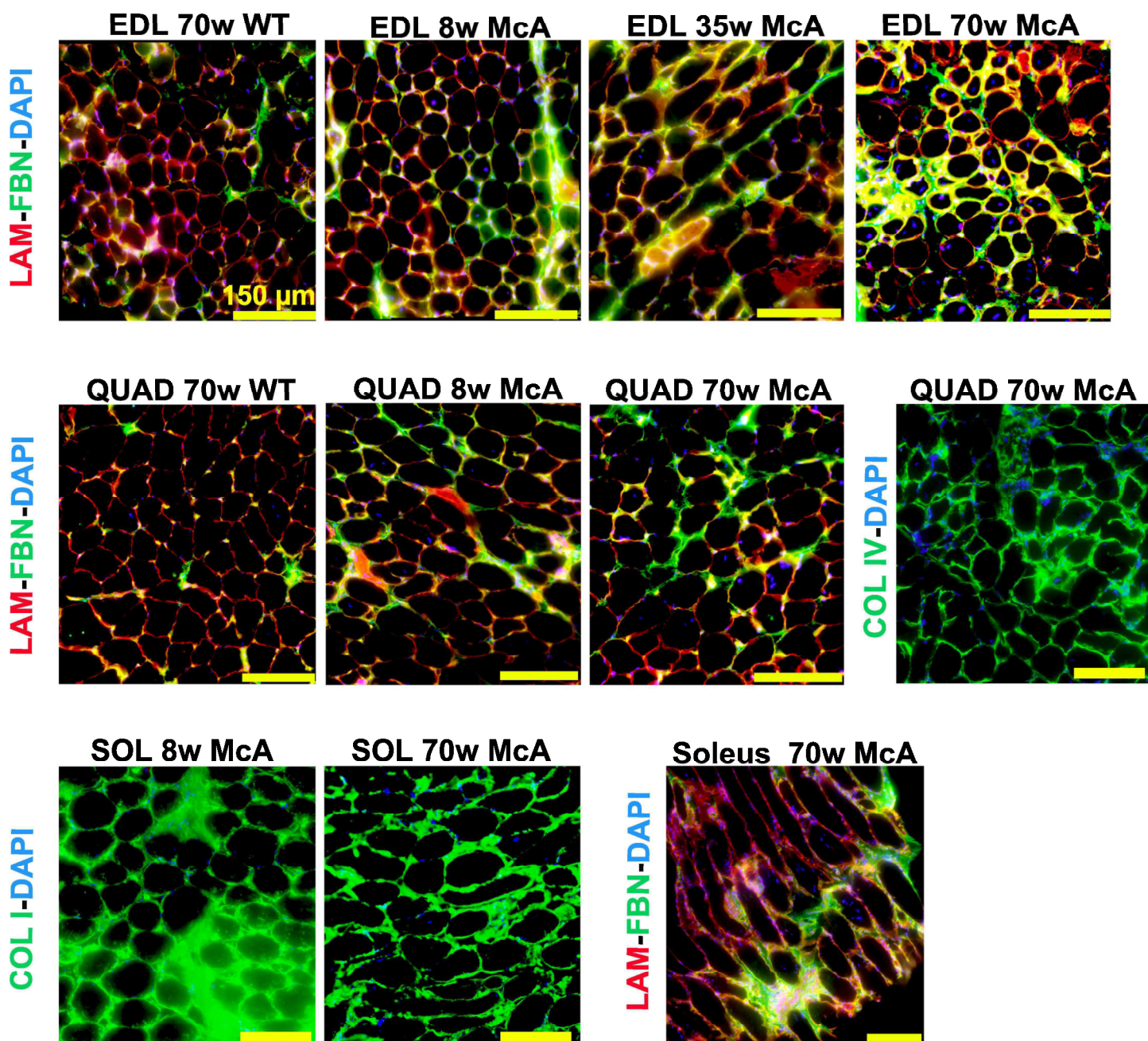


Supp. Fig 2

A

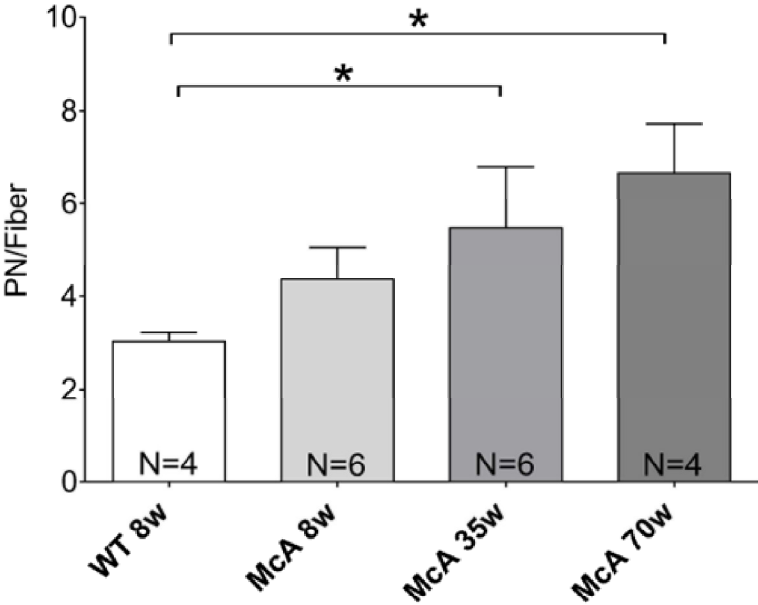


B

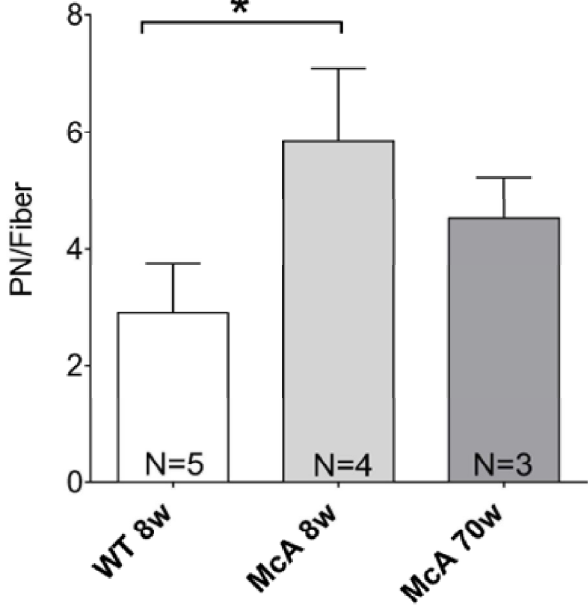


Supp. Fig 3

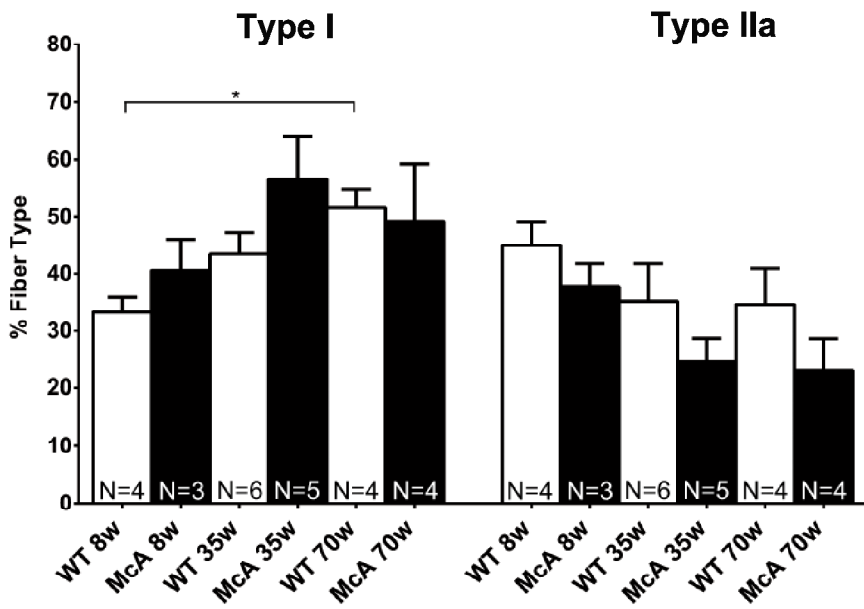
Soleus



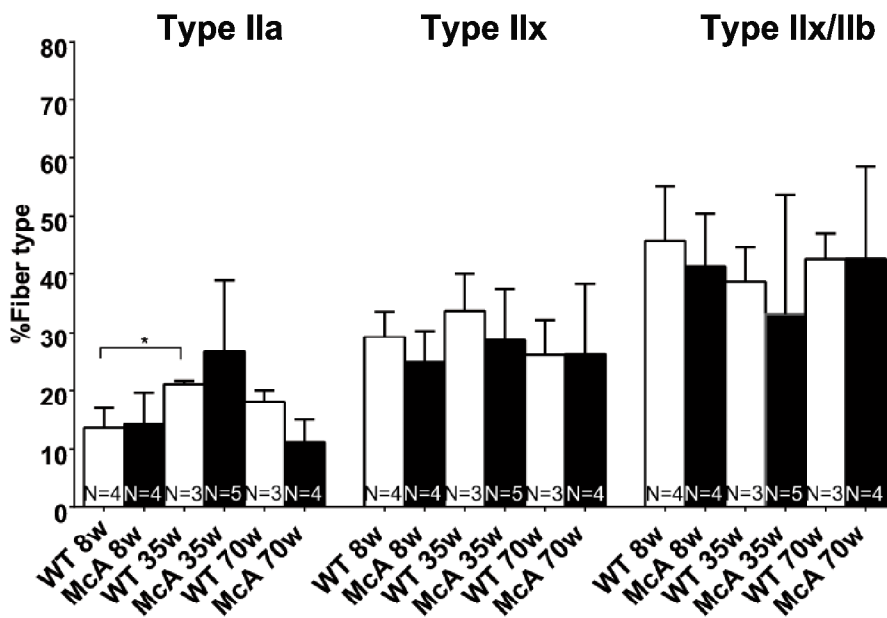
TA



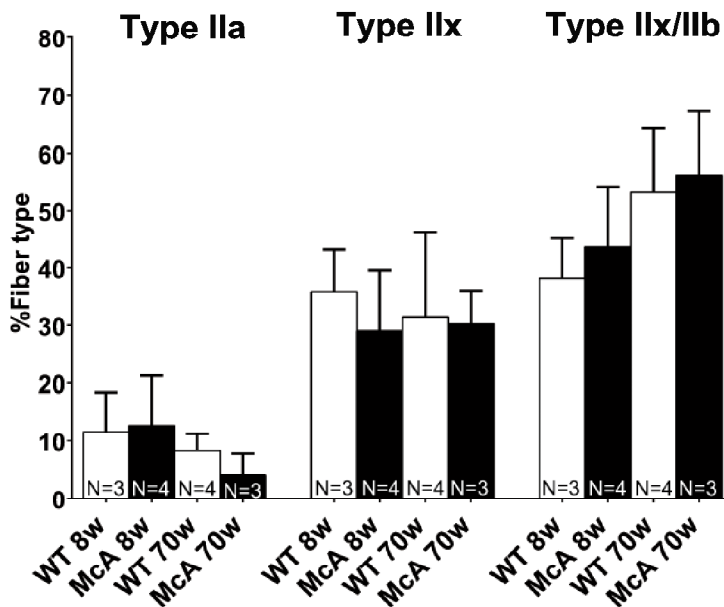
Soleus



EDL



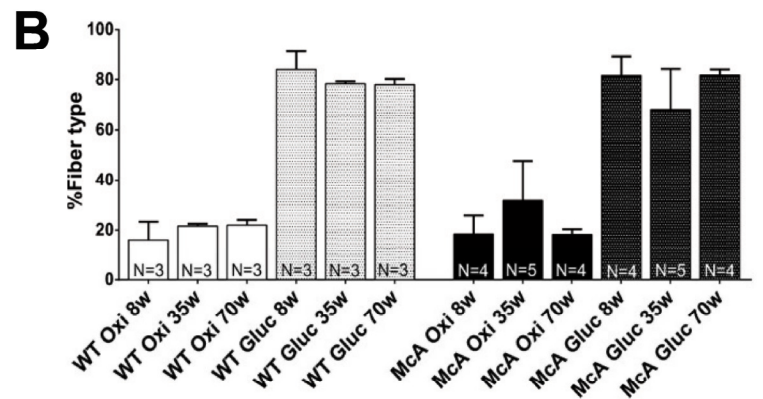
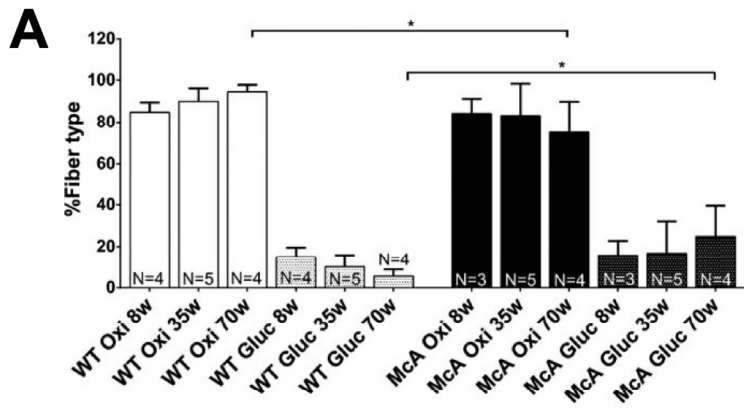
TA



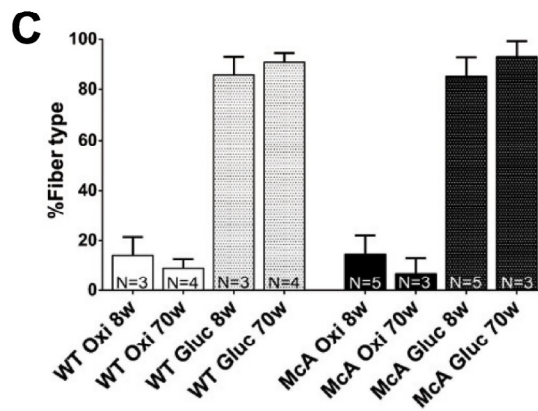
Supp. Fig. 5

Soleus

EDL

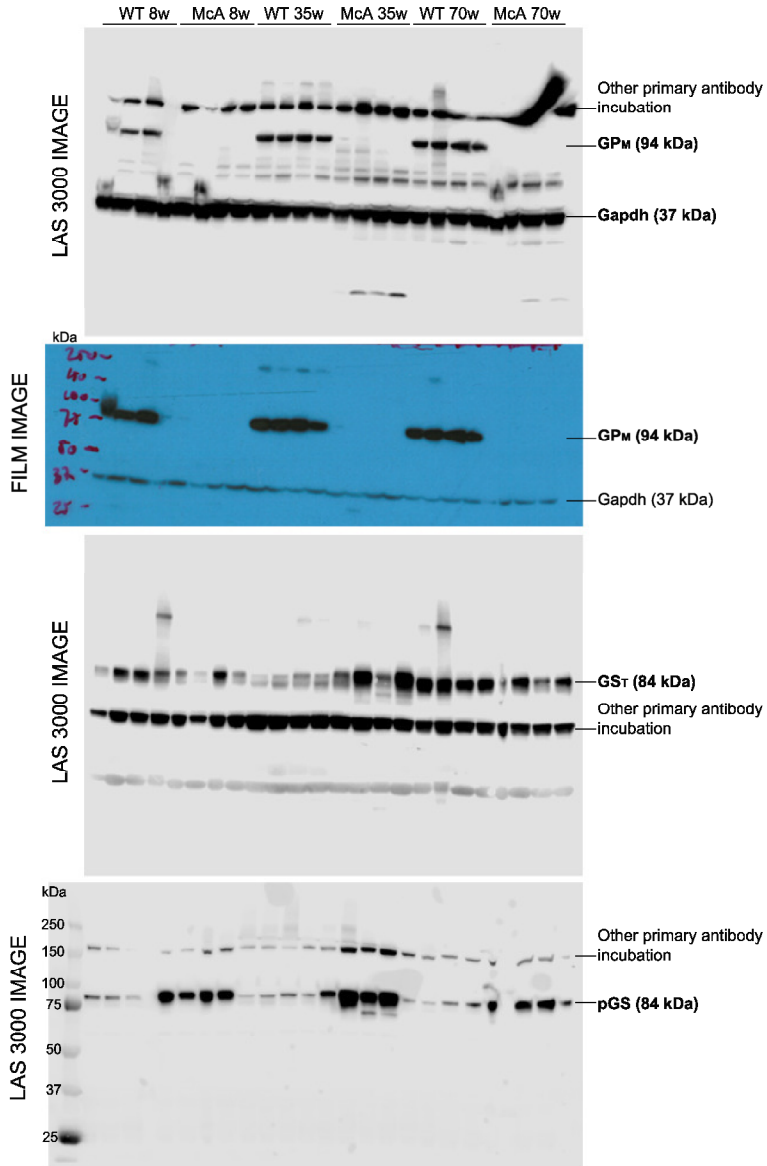


TA

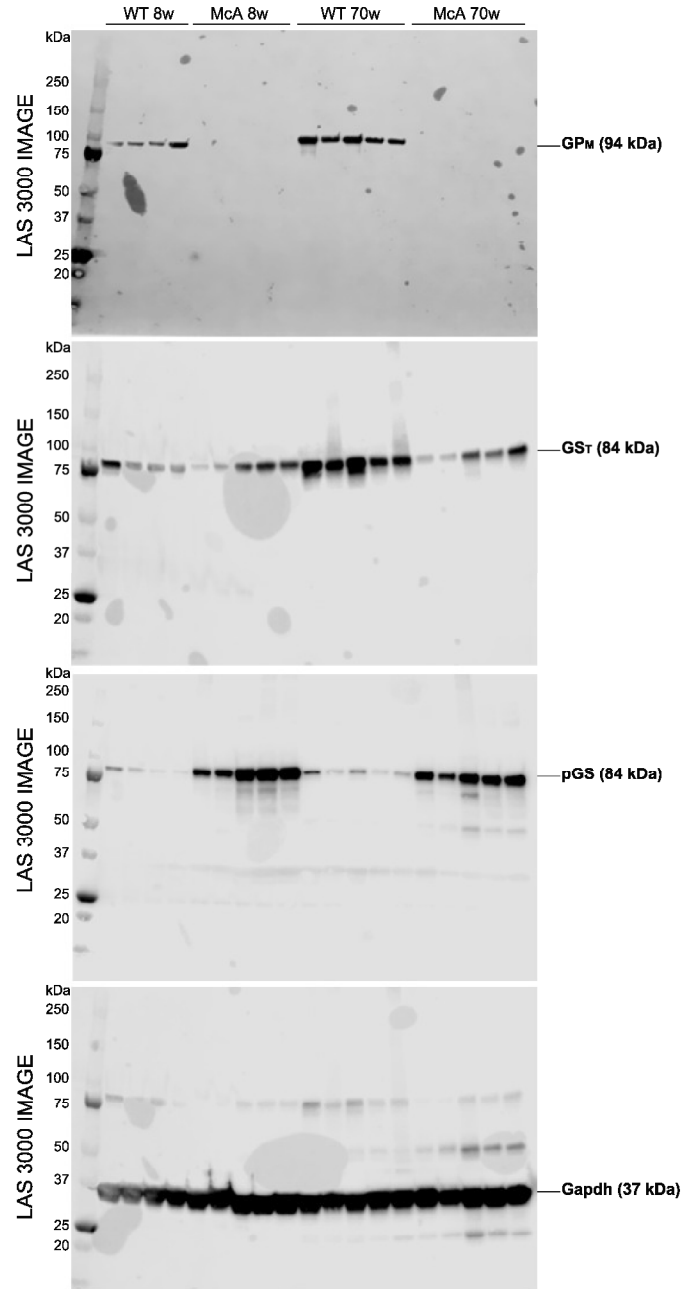


Supp. Fig 6

GASTROCNEMIUS



TA



Supp. Table

Primary antibody				Secondary antibody			Application
ID	Reference	Dilution	Diluent	ID	Dilution	Diluent	
Laminin	(MA1-06100/Thermo-Scientific)	1/300	PBS 1x+3% FCS	Goat to Rat Ig H+L (AF 594 nm)	1/500	PBS 1x+3% FCS	IF
Fibronectin	(ab2413/Abcam)	1/200	PBS 1x+3% FCS	Goat to Rabbit Ig H+L (AF 488 nm)	1/500	PBS 1x+3% FCS	IF
Collagen IV	(ab/Abcam)	1/200	PBS 1x+3% FCS	Goat to Rabbit Ig H+L (AF 488 nm)	1/500	PBS 1x+3% FCS	IF
MHC I	(BA-D5/DSHB)	1/20	PBS 1x+3% FCS	Goat to Mouse Ig γ 2b (AF 488 nm)	1/500	PBS 1x+3% FCS	IF
MHC IIa	(SC-71/DSHB)	1/20	PBS 1x+3% FCS	Goat to Mouse Ig γ 1 (AF 594 nm)	1/500	PBS 1x+3% FCS	IF
MHC IIx	(SAB2104768/Sigma-Aldrich)	1/100	PBS 1x+3% FCS	Goat to Rabbit Ig H+L (AF 488 nm)	1/500	PBS 1x+3% FCS	IF
MHC IIb	(BF-F3/DSHB)	1/30	PBS 1x+3% FCS	Goat to Mouse Ig M (AF 594 nm)	1/500	PBS 1x+3% FCS	IF
MHCe	(F1.652/DSHB)	1/6	PBS 1x+3% FCS	Goat to Mouse Ig γ 1 (AF 594 nm)	1/500	PBS 1x+3% FCS	IF
CD 68	(ab955/Abcam)	1/200	PBS 1x+3% FCS	Goat to Mouse Ig γ 1 (AF 594 nm)	1/500	PBS 1x+3% FCS	IF
PYGM	From Andrea Martinuzzi	1/2000	TTBS 0,1%+5% Skim milk	Donkey to Goat HRP (SCT sc-2020)	1/5000	TTBS 0,1%+5% Skim milk	WB
GYS-1	(07/2015/Cell Signalling Technology)	1/1000	TTBS 0,1%+5% Skim milk	Goat to Rabbit HRP (Dako P0448)	1/5000	TTBS 0,1%+5% Skim milk	WB
p-GYS-1 Ser 641	(07/2015/Cell Signalling Technology)	1/1000	TTBS 0,1%+5% Skim milk	Goat to Rabbit HRP (Dako P0448)	1/5000	TTBS 0,1%+5% Skim milk	WB
GAPDH	(AM 4300/Ambion)	1/10000	TTBS 0,1%+5% Skim milk	Rabbit to Mouse HRP (Dako P0260)	1/7000	TTBS 0,1%+5% Skim milk	WB
GAA	(ab102815/Abcam)	1/1000	TTBS 0,1%+5% Skim milk	Goat to Rabbit HRP (Dako P0448)	1/5000	TTBS 0,1%+5% Skim milk	WB

Legends:

Supplementary Figure 1. H&E staining of *extensor digitorum longus* (EDL) muscle from 8, 35 and 70-week-old McArdle (McA) mice. All scale bars correspond to 150 μm . A clear increase in interstitial space is observed in 70-week-old McA mice.

Supplementary Figure 2. A) Fibrosis quantification in *tibialis anterior* (TA) muscle using laminin, collagen IV (Col IV) and fibronectin (FBN) staining. Fibrosis was quantified as the percentage of laminin, Col IV and FBN staining in a given muscle area. In each column the percentage of staining was calculated for muscle areas ranging from 1354737 (minimum) to 7409553 (maximum) μm^2 . To obtain these areas 2 to 4 different mice were used. B) Laminin-fibronectin double stainings as well as collagen (Col) I and IV single staining in *extensor digitorum longus* (EDL), *quadriceps* and *soleus* of McA mice. All scale bars correspond to 150 μm

Supplementary Figure 3. Number of peripheral nuclei (PN) surrounding the sarcoplasmic membrane per muscle fiber. In each column 490 (minimum) to 1265 (maximum) fibers were counted (median 909 fibers). The non-parametric Kruskal-Wallis *One-Way ANOVA* with multiple comparisons test (*Dunn's test*) was used for statistical analyses. Symbols: * $p < 0.05$.

Supplementary Figure 4. A) Percentage of type I and IIa fibers in the *soleus*. In each column between 223 (minimum) and 980 (maximum) fibers were counted (median 612 fibers). B) Percentage of type IIa, IIx and IIx/IIb fibers in the EDL muscle. In each column between 177 (minimum) and 651 (maximum) fibers were counted (median 413 fibers). C) Percentage of type IIa, IIx and IIx/IIb fibers in TA muscle. In each column between 50 (minimum) and 930 (maximum) fibers were counted (median 520 fibers) of each column indicates the number of mice used to calculate the mean values. The N at the bottom of each column represents the number of mice used to calculate the mean

values. Error bars correspond to SD. The non-parametric Kruskal-Wallis *One-Way ANOVA* with multiple comparisons test (*Dunn's test*) was used for statistical analyses. Symbols: * $p < 0.05$.

Supplementary Figure 5. A), B) and B) Percentage of oxidative (type I+IIa+I/IIa) and glycolytic (IIa/IIx+IIa+IIx+IIx/IIb) fibers in 8, 35 and 70-week-old wild-type (WT) and McArdle (McA) mice in *soleus*, EDL and *tibialis anterior* (TA), respectively. The N at the bottom of each column represents the number of mice used to calculate the mean values. Error bars correspond to SD. The non-parametric Kruskal-Wallis *One-Way ANOVA* with multiple comparisons test (*Dunn's test*) was used for statistical analyses. Symbols: * $p < 0.05$.

Supplementary Figure 6. Uncropped original western blot images for GP_M, GS_T, pGS and Gapdh in *gastrocnemius* and *tibialis anterior* (TA) muscles.

Supplementary Table. List of antibodies. Abbreviations. FCS: Fetal Calf Serum; IF: Immunofluorescence; PBS: Phosphate buffered saline; TTBS: Tween-Tris buffered saline; WB: Western blot.

Bibliografia

1. Learning, L., *Muscular Tissue*, in *Boundless Anatomy and Physiology*.
<https://courses.lumenlearning.com/>.
2. Editors., B.n., *Muscle Tissue*. (2017, December 08): Retrieved from
<https://biologydictionary.net/muscle-tissue/>.
3. Webb, R.C., *Smooth Muscle Contraction and Relaxation*. 2003, © 2003 American
Physiological Society: www.journals.physiology.org. p. 201-206.
4. Dubowitz, V., A. Oldfors, and C.A. Sewry, *Muscle Biopsy: A Practical Approach: Expert
Consult; Online and Print*. 2013: Elsevier Health Sciences.
5. Lepper, C. and C.M. Fan, *Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals
embryonic origin of adult satellite cells*. *genesis*, 2010. **48**(7): p. 424-436.
6. Bintliff, S. and B.E. Walker, *Radioautographic study of skeletal muscle regeneration*.
American Journal of Anatomy, 1960. **106**(3): p. 233-245.
7. Walker, B.E., *A radioautographic study of muscle regeneration in dystrophic mice*. *The
American journal of pathology*, 1962. **41**(1): p. 41.
8. Zhinkin, L. and L.F. Andreeva, *DNA synthesis and nuclear reproduction during
embryonic development and regeneration of muscle tissue*. *Development*, 1963. **11**(2):
p. 353-367.
9. Reznik, M., *Etude autoradiographique du muscle strié en régénération in vivo*.
Development, 1968. **19**(2): p. 283-297.
10. Carlson, B.M., *regeneration of minced muscles*. 1972.
11. Boldrin, L. and J.E. Morgan, *Human satellite cells: identification on human muscle
fibres*. *PLoS currents*, 2012. **3**.

12. Yablonka-Reuveni, Z., *The skeletal muscle satellite cell: still young and fascinating at 50*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2011. **59**(12): p. 1041-1059.
13. Brown, S. and C. Sewry, *Basics of Skeletal Muscle Function and Normal Physiology*, in *Cardioskeletal Myopathies in Children and Young Adults*. 2017, Elsevier. p. 21-38.
14. Ontell, M. and K. Kozeka, *The organogenesis of murine striated muscle: a cytoarchitectural study*. American journal of anatomy, 1984. **171**(2): p. 133-148.
15. Buckingham, M. and P.W. Rigby, *Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis*. Developmental cell, 2014. **28**(3): p. 225-238.
16. Wilson, S., et al., *Early stages of myogenesis in a large mammal: formation of successive generations of myotubes in sheep tibialis cranialis muscle*. Journal of Muscle Research & Cell Motility, 1992. **13**(5): p. 534-550.
17. Darabid, H., A.P. Perez-Gonzalez, and R. Robitaille, *Neuromuscular synaptogenesis: coordinating partners with multiple functions*. Nature Reviews Neuroscience, 2014. **15**(11): p. 703.
18. Duxson, M. and P. Sheard, *Formation of new myotubes occurs exclusively at the multiple innervation zones of an embryonic large muscle*. Developmental dynamics, 1995. **204**(4): p. 391-405.
19. Schiaffino, S. and C. Reggiani, *Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles*. Physiological Reviews, 2011. **91**(4): p. 1447-1531.
20. Kelly, A. and N. Rubinstein, *Why are fetal muscles slow?* Nature, 1980. **288**(5788): p. 266.
21. Hu, J.K.-H., et al., *Autonomous and nonautonomous roles of Hedgehog signaling in regulating limb muscle formation*. Genes & development, 2012. **26**(18): p. 2088-2102.

22. Suzuki, A., R.C. Pelikan, and J. Iwata, *WNT/ β -catenin signaling regulates multiple steps of myogenesis by regulating step-specific targets*. *Molecular and cellular biology*, 2015. **35**(10): p. 1763-1776.
23. Stromer, M., *Invited Review The cytoskeleton in skeletal, cardiac and smooth muscle cells*. *Histol Histopathol*, 1998. **13**: p. 283-291.
24. Ottenheijm, C.A., et al., *Tuning passive mechanics through differential splicing of titin during skeletal muscle development*. *Biophysical journal*, 2009. **97**(8): p. 2277-2286.
25. Krüger, M. and W.A. Linke, *The giant protein titin: a regulatory node that integrates myocyte signaling pathways*. *Journal of Biological Chemistry*, 2011. **286**(12): p. 9905-9912.
26. Pappas, C.T., et al., *The Nebulin family: an actin support group*. *Trends in cell biology*, 2011. **21**(1): p. 29-37.
27. Martínez, J.B. and F.P.V.B.O. CO, *La Lesión Muscular Menor en el deporte. Concepto, clasificación y tratamiento*.
28. Montuschi, B.C., *Tema 7: Tejido Muscular*
29. Larsson, L. and R. Moss, *Maximum velocity of shortening in relation to myosin isoform composition in single fibres from human skeletal muscles*. *The Journal of physiology*, 1993. **472**(1): p. 595-614.
30. Frontera, W.R. and J. Ochala, *Skeletal muscle: a brief review of structure and function*. *Calcified tissue international*, 2015. **96**(3): p. 183-195.
31. Pette, D. and R.S. Staron, *Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers*. (0303-4240 (Print)).
32. Richter, E.A. and N.B. Ruderman, *AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease*. *The Biochemical journal*, 2009. **418**(2): p. 261-275.

33. Boström, P., et al., *A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis*. *Nature*, 2012. **481**: p. 463.
34. Bassel-Duby, R. and E.N. Olson, *Signaling Pathways in Skeletal Muscle Remodeling*. *Annual Review of Biochemistry*, 2006. **75**(1): p. 19-37.
35. Baldwin, K.M., et al., *Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: role of transcriptional/pretranslational mechanisms*. *Frontiers in physiology*, 2013. **4**: p. 284-284.
36. Egan, B. and Juleen R. Zierath, *Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation*. *Cell Metabolism*, 2013. **17**(2): p. 162-184.
37. Padykula Ha Fau - Herman, E. and E. Herman, *Factors affecting the activity of adenosine triphosphatase and other phosphatases as measured by histochemical techniques*. (0022-1554 (Print)).
38. Engel, W.K., *The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease*. 1962. (0028-3878 (Print)).
39. Bárány, M., et al., *Myosin of fast and slow muscles of the rabbit*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1965. **109**(1): p. 185-191.
40. Barany, M., *ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening*. *J Gen Physiol*, 1967. **50**(6): p. Suppl:197-218.
41. Close, R., *Properties of motor units in fast and slow skeletal muscles of the rat*. *The Journal of physiology*, 1967. **193**(1): p. 45-55.
42. Barnard, R., et al., *Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers*. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 1971. **220**(2): p. 410-414.

43. Burke, R.E., et al., *Mammalian Motor Units: Physiological-Histochemical Correlation in Three Types in Cat Gastrocnemius*. *Science*, 1971. **174**(4010): p. 709-712.
44. Edgerton, V.R. and D.R. Simpson, *Dynamic and metabolic relationships in the rat extensor digitorum longus muscle*. *Experimental Neurology*, 1971. **30**(2): p. 374-376.
45. Close, R.I., *Dynamic properties of mammalian skeletal muscles*. *Physiological Reviews*, 1972. **52**(1): p. 129-197.
46. Peter Jb Fau - Barnard, R.J., et al., *Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits*. (0006-2960 (Print)).
47. Murgia, M., et al., *Single muscle fiber proteomics reveals unexpected mitochondrial specialization*. *EMBO Rep*, 2015. **16**(3): p. 387-95.
48. DeNardi, C., et al., *Type 2X-myosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and developmentally regulated gene*. *The Journal of cell biology*, 1993. **123**(4): p. 823-835.
49. Schiaffino, S., V.r. Hanzlíková, and S. Pierobon, *Relations between structure and function in rat skeletal muscle fibers*. *The Journal of cell biology*, 1970. **47**(1): p. 107-119.
50. Mráček, T., Z. Drahota, and J. Houštěk, *The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2013. **1827**(3): p. 401-410.
51. Gruener, R., et al., *Contracture of phosphorylase deficient muscle*. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 1968. **31**(3): p. 268-283.
52. Talbot, J. and L. Maves, *Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 2016. **5**(4): p. 518-534.

53. Webster, C., et al., *Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy*. Cell, 1988. **52**(4): p. 503-513.
54. Marini, J.-F., et al., *Expression of myosin heavy chain isoforms in Duchenne muscular dystrophy patients and carriers*. Neuromuscular Disorders, 1991. **1**(6): p. 397-409.
55. Head, S.I., D.A. Williams, and D.G. Stephenson, *Abnormalities in structure and function of limb skeletal muscle fibres of dystrophic mdx mice*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 1992. **248**(1322): p. 163-169.
56. Moens, P., P. Baatsen, and G. Maréchal, *Increased susceptibility of EDL muscles from mdx mice to damage induced by contractions with stretch*. Journal of Muscle Research & Cell Motility, 1993. **14**(4): p. 446-451.
57. Petrof, B.J., et al., *Adaptations in myosin heavy chain expression and contractile function in dystrophic mouse diaphragm*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 1993. **265**(3): p. C834-C841.
58. Yuasa, K., et al., *Dystrophin deficiency in canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMD J) alters myosin heavy chain expression profiles in the diaphragm more markedly than in the tibialis cranialis muscle*. BMC musculoskeletal disorders, 2008. **9**(1): p. 1.
59. Celegato, B., et al., *Parallel protein and transcript profiles of FSHD patient muscles correlate to the D4Z4 arrangement and reveal a common impairment of slow to fast fibre differentiation and a general deregulation of MyoD-dependent genes*. Proteomics, 2006. **6**(19): p. 5303-5321.
60. Pisani, V., et al., *Preferential central nucleation of type 2 myofibers is an invariable feature of myotonic dystrophy type 2*. Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine, 2008. **38**(5): p. 1405-1411.
61. Vihola, A., et al., *Histopathological differences of myotonic dystrophy type 1 (DM1) and PROMM/DM2*. Neurology, 2003. **60**(11): p. 1854-1857.

62. Clarke, N.F. *Congenital fiber-type disproportion*. in *Seminars in pediatric neurology*. 2011. Elsevier.
63. Feeney, E.J., et al., *The value of muscle biopsies in Pompe disease: identifying lipofuscin inclusions in juvenile- and adult-onset patients*. *Acta neuropathologica communications*, 2014. **2**: p. 2-2.
64. Raben, N., A. Roberts, and P.H. Plotz, *Role of autophagy in the pathogenesis of Pompe disease*. *Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology*, 2007. **26**(1): p. 45-48.
65. Fukuda, T., et al., *Autophagy and lysosomes in Pompe disease*. *Autophagy*, 2006. **2**(4): p. 318-320.
66. Grounds, M.D., *Age-associated Changes in the Response of Skeletal Muscle Cells to Exercise and Regeneration a*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1998. **854**(1): p. 78-91.
67. Holloszy, J.O. and B.M. Carlson, *Factors influencing the repair and adaptation of muscles in aged individuals: satellite cells and innervation*. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 1995. **50**(Special_Issue): p. 96-100.
68. Holloszy, J.O. and G.D. Cartee, *What insights into age-related changes in skeletal muscle are provided by animal models?* *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 1995. **50**(Special_Issue): p. 137-141.
69. Le Grand, F. and M.A. Rudnicki, *Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis*. *Current Opinion in Cell Biology*, 2007. **19**(6): p. 628-633.
70. Evans, W.J. and J. Lexell, *Human aging, muscle mass, and fiber type composition*. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 1995. **50**(Special_Issue): p. 11-16.

71. Nilwik, R., et al., *The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size*. *Experimental gerontology*, 2013. **48**(5): p. 492-498.
72. Grounds, M.D., *Towards Understanding Skeletal Muscle Regeneration*. *Pathology - Research and Practice*, 1991. **187**(1): p. 1-22.
73. Papadimitriou, J., et al., *The process of new plasmalemma formation in focally injured skeletal muscle fibers*. *Journal of structural biology*, 1990. **103**(2): p. 124-134.
74. Carpenter, S. and G. Karpati, *Segmental necrosis and its demarcation in experimental micropuncture injury of skeletal muscle fibers*. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 1989. **48**(2): p. 154-170.
75. Chambers, R.L. and J.C. McDermott, *Molecular basis of skeletal muscle regeneration*. *Canadian journal of applied physiology = Revue canadienne de physiologie appliquee*, 1996. **21**(3): p. 155-184.
76. Kjær, M., *Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading*. *Physiological reviews*, 2004. **84**(2): p. 649-698.
77. Jenniskens, G.J., J.H. Veerkamp, and T.H. van Kuppevelt, *Heparan sulfates in skeletal muscle development and physiology*. *Journal of cellular physiology*, 2006. **206**(2): p. 283-294.
78. Grounds, M.D., *Complexity of extracellular matrix and skeletal muscle regeneration, in Skeletal muscle repair and regeneration*. 2008, Springer. p. 269-302.
79. Bonnemann, C.G. and N.G. Laing, *Myopathies resulting from mutations in sarcomeric proteins*. (1350-7540 (Print)).
80. Khan, Z.A., et al., *Endothelins: regulators of extracellular matrix protein production in diabetes*. (1535-3702 (Print)).

81. Grounds, M.D., J. Sorokin L Fau - White, and J. White, *Strength at the extracellular matrix-muscle interface*. (0905-7188 (Print)).
82. Ingber, D.E., *Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again*. (1530-6860 (Electronic)).
83. Goody, M.F., R.B. Sher, and C.A. Henry, *Hanging on for the ride: Adhesion to the extracellular matrix mediates cellular responses in skeletal muscle morphogenesis and disease*. *Developmental Biology*, 2015. **401**(1): p. 75-91.
84. Kaariainen, M., et al., *Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair*. (0905-7188 (Print)).
85. Tidball, J.G., *Inflammatory processes in muscle injury and repair*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2005. **288**(2): p. R345-R353.
86. Tidball, J.G., *Inflammatory cell response to acute muscle injury*. (0195-9131 (Print)).
87. Musarò, A., *The Basis of Muscle Regeneration*. *Advances in Biology*, 2014. **2014**: p. 1-16.
88. Karalaki, M., et al., *Muscle regeneration: cellular and molecular events*. (0258-851X (Print)).
89. Lescaudron, L., et al., *Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant*. *Neuromuscular Disorders*, 1999. **9**(2): p. 72-80.
90. Wang, S., et al., *Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils*. *The Journal of experimental medicine*, 2006. **203**(6): p. 1519-1532.

91. Schultz E Fau - Jaryszak, D.L., C.R. Jaryszak DI Fau - Valliere, and C.R. Valliere, *Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury*. (0148-639X (Print)).
92. Pavlath, G.K., et al., *Regeneration of transgenic skeletal muscles with altered timing of expression of the basic helix-loop-helix muscle regulatory factor MRF4*. The American journal of pathology, 2003. **162**(5): p. 1685-1691.
93. Kablar, B. and M.A. Rudnicki, *Skeletal muscle development in the mouse embryo*. (0213-3911 (Print)).
94. Yoshida, N., et al., *Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'*. (0021-9533 (Print)).
95. Cornelison, D.D.W., *Context matters: in vivo and in vitro influences on muscle satellite cell activity*. Journal of cellular biochemistry, 2008. **105**(3): p. 663-669.
96. Vidal, B., et al., *Fibrinogen drives dystrophic muscle fibrosis via a TGFbeta/alternative macrophage activation pathway*. Genes & development, 2008. **22**(13): p. 1747-1752.
97. Peterson, J.M. and D.C. Guttridge, *Skeletal Muscle Diseases, Inflammation, and NF- κ B Signaling: Insights and Opportunities for Therapeutic Intervention*. International Reviews of Immunology, 2008. **27**(5): p. 375-387.
98. Serrano, A.L. and P. Muñoz-Cánoves, *Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle*. Experimental Cell Research, 2010. **316**(18): p. 3050-3058.
99. SPIRO, A.J., G.M. SHY, and N.K. GONATAS, *Myotubular Myopathy: Persistence of Fetal Muscle in an Adolescent Boy*. JAMA Neurology, 1966. **14**(1): p. 1-14.
100. Wang, B., J. Li, and X. Xiao, *Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in *mdx* mouse model*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(25): p. 13714-13719.

101. Gueneau, L., et al., *Mutations of the FHL1 gene cause Emery-Dreifuss muscular dystrophy*. American journal of human genetics, 2009. **85**(3): p. 338-353.
102. Folker, E. and M. Baylies, *Nuclear positioning in muscle development and disease*. Frontiers in physiology, 2013. **4**: p. 363.
103. Zimowska, M., et al., *Inflammatory response during slow- and fast-twitch muscle regeneration*. Muscle Nerve, 2017. **55**(3): p. 400-409.
104. Bassaglia, Y. and J. Gautron, *Fast and slow rat muscles degenerate and regenerate differently after whole crush injury*. Vol. 16. 1995. 420-429.
105. Shefer, G., et al., *Satellite-cell pool size does matter: Defining the myogenic potency of aging skeletal muscle*. Developmental Biology, 2006. **294**(1): p. 50-66.
106. Wallace, G.Q. and E.M. McNally, *Mechanisms of Muscle Degeneration, Regeneration, and Repair in the Muscular Dystrophies*. Annual Review of Physiology, 2009. **71**(1): p. 37-57.
107. Mokri B Fau - Engel, A.G. and A.G. Engel, *Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber*. (0028-3878 (Print)).
108. Straub, V., et al., *Contrast agent-enhanced magnetic resonance imaging of skeletal muscle damage in animal models of muscular dystrophy*. (0740-3194 (Print)).
109. Pestronk A Fau - Parhad, I.M., et al., *Membrane myopathy: morphological similarities to Duchenne muscular dystrophy*. (0148-639X (Print)).
110. Davies, K.E. and K.J. Nowak, *Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006. **7**(10): p. 762-773.

111. Luz, M.A.M., M.J. Marques, and H. Santo Neto, *Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2002. **35**: p. 691-695.
112. Heslop, L., J.E. Morgan, and T.A. Partridge, *Evidence for a myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle*. Journal of Cell Science, 2000. **113**(12): p. 2299-2308.
113. Irintchev, A., M. Zweyer, and A. Wernig, *Impaired functional and structural recovery after muscle injury in dystrophic *mdx* mice*. Neuromuscular Disorders, 1997. **7**(2): p. 117-125.
114. Bockhold, K.J., J. David Rosenblatt, and T.A. Partridge, *Aging normal and dystrophic mouse muscle: analysis of myogenicity in cultures of living single fibers*. Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine, 1998. **21**(2): p. 173-183.
115. Decary, S., et al., *Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy*. (1043-0342 (Print)).
116. Decary, S., et al., *Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children*. Neuromuscular Disorders, 2000. **10**(2): p. 113-120.
117. Renault, V., et al., *Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock*. Experimental Gerontology, 2000. **35**(6): p. 711-719.
118. Tatsumi, R., et al., *Release of hepatocyte growth factor from mechanically stretched skeletal muscle satellite cells and role of pH and nitric oxide*. Molecular biology of the cell, 2002. **13**(8): p. 2909-2918.
119. Anderson, J.E., *A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells*. Molecular biology of the cell, 2000. **11**(5): p. 1859-1874.
120. Lee, K.H., et al., *Nitric oxide as a messenger molecule for myoblast fusion*. (0021-9258 (Print)).

121. Melone, M.A., et al., *Increased expression of IGF-binding protein-5 in Duchenne muscular dystrophy (DMD) fibroblasts correlates with the fibroblast-induced downregulation of DMD myoblast growth: an in vitro analysis.* (0021-9541 (Print)).
122. Merly, F., et al., *Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation.* (0148-639X (Print)).
123. Griffin, J.L., *Infantile acid maltase deficiency.* Virchows Archiv B, 1984. **45**(1): p. 37.
124. Schaaf, G.J., et al., *Lack of robust satellite cell activation and muscle regeneration during the progression of Pompe disease.* Acta neuropathologica communications, 2015. **3**: p. 65-65.
125. Thurberg, B.L., et al., *Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for pompe disease.* Laboratory Investigation, 2006. **86**(12): p. 1208-1220.
126. Lagalice, L., et al., *Satellite cells fail to contribute to muscle repair but are functional in Pompe disease (glycogenosis type II).* Acta neuropathologica communications, 2018. **6**(1): p. 116.
127. Marshall, P., P. Williams, and G. Goldspink, *Accumulation of collagen and altered fiber-type ratios as indicators of abnormal muscle gene expression in the mdx dystrophic mouse.* Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine, 1989. **12**(7): p. 528-537.
128. Snow, M.H., *The effects of aging on satellite cells in skeletal muscles of mice and rats.* Cell and tissue research, 1977. **185**(3): p. 399-408.
129. Franzini-Armstrong, C., *Satellite and invasive cells in frog sartorius.* Muscle Regeneration. A. Mauro et al, Eds, 1979: p. 133-138.
130. Sadeh, M., *Effects of aging on skeletal muscle regeneration.* Journal of the neurological sciences, 1988. **87**(1): p. 67-74.

131. Brooks, S.V. and J.A. Faulkner, *The magnitude of the initial injury induced by stretches of maximally activated muscle fibres of mice and rats increases in old age*. The Journal of physiology, 1996. **497**(2): p. 573-580.
132. McGeachie, J.K. and M.D. Grounds, *Retarded myogenic cell replication in regenerating skeletal muscles of old mice: an autoradiographic study in young and old BALBc and SJL/J mice*. Cell and tissue research, 1995. **280**(2): p. 277-282.
133. Mouly, V., et al., *Satellite cell proliferation: starting point and key steps to regeneration and cell-mediated gene therapy*. BAM-PADOVA-, 1997. **7**: p. 167-176.
134. Allen, R.E., P.K. McAllister, and K.C. Masak, *Myogenic potential of satellite cells in skeletal muscle of old rats. A brief note*. Mechanisms of ageing and development, 1980. **13**(2): p. 105-109.
135. Schultz, E. and B.H. Lipton, *Skeletal muscle satellite cells: changes in proliferation potential as a function of age*. Mechanisms of ageing and development, 1982. **20**(4): p. 377-383.
136. Wright, W.E., *Myoblast senescence in muscular dystrophy*. Experimental cell research, 1985. **157**(2): p. 343-354.
137. Dodson, M.V. and R.E. Allen, *Interaction of multiplication stimulating activity/rat insulin-like growth factor II with skeletal muscle satellite cells during aging*. Mechanisms of ageing and development, 1987. **39**(2): p. 121-128.
138. Johnson, S.E. and R.E. Allen, *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is expressed in activated rat skeletal muscle satellite cells*. Journal of cellular physiology, 1993. **154**(1): p. 39-43.
139. Jang, Y., et al. *Skeletal muscle stem cells: effects of aging and metabolism on muscle regenerative function*. in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2011. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

140. Bohr, V.A., *Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells*. Free Radical Biology and Medicine, 2002. **32**(9): p. 804-812.
141. Sharpless, N.E. and R.A. DePinho, *Telomeres, stem cells, senescence, and cancer*. The Journal of clinical investigation, 2004. **113**(2): p. 160-168.
142. Li, M. and J.C.I. Belmonte, *Genetic rejuvenation of old muscle*. Nature, 2014. **506**(7488): p. 304-305.
143. Conboy, I.M., et al., *Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle*. Science, 2003. **302**(5650): p. 1575-1577.
144. Carlson, M.E., M. Hsu, and I.M. Conboy, *Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 528.
145. Brack, A.S., et al., *Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis*. Science, 2007. **317**(5839): p. 807-810.
146. Arthur, S.T. and I.D. Cooley, *The effect of physiological stimuli on sarcopenia; impact of Notch and Wnt signaling on impaired aged skeletal muscle repair*. International journal of biological sciences, 2012. **8**(5): p. 731.
147. Bushby, K., et al., *Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management*. The Lancet Neurology, 2010. **9**(1): p. 77-93.
148. Ljubicic, V., M. Burt, and B.J. Jasmin, *The therapeutic potential of skeletal muscle plasticity in Duchenne muscular dystrophy: phenotypic modifiers as pharmacologic targets*. The FASEB Journal, 2014. **28**(2): p. 548-568.
149. Lin, J., et al., *Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres*. Nature, 2002. **418**(6899): p. 797.

150. Chan, M.C. and Z. Arany, *The many roles of PGC-1 α in muscle—recent developments*. *Metabolism*, 2014. **63**(4): p. 441-451.
151. Handschin, C., et al., *PGC-1 α regulates the neuromuscular junction program and ameliorates Duchenne muscular dystrophy*. *Genes & development*, 2007. **21**(7): p. 770-783.
152. Hirst, R., K. McCullagh, and K. Davies, *Utrophin upregulation in Duchenne muscular dystrophy*. *Acta myologica: myopathies and cardiomyopathies: official journal of the Mediterranean Society of Myology*, 2005. **24**(3): p. 209-216.
153. Miura, P. and B.J. Jasmin, *Utrophin upregulation for treating Duchenne or Becker muscular dystrophy: how close are we?* *Trends in molecular medicine*, 2006. **12**(3): p. 122-129.
154. Al-Rewashdy, H., et al., *Utrophin A is essential in mediating the functional adaptations of mdx mouse muscle following chronic AMPK activation*. *Human molecular genetics*, 2014. **24**(5): p. 1243-1255.
155. Ljubacic, V., et al., *Chronic AMPK activation evokes the slow, oxidative myogenic program and triggers beneficial adaptations in mdx mouse skeletal muscle*. *Human molecular genetics*, 2011. **20**(17): p. 3478-3493.
156. Jahnke, V.E., et al., *Metabolic remodeling agents show beneficial effects in the dystrophin-deficient mdx mouse model*. *Skeletal muscle*, 2012. **2**(1): p. 16.
157. Bodine, S.C., et al., *Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo*. *Nature cell biology*, 2001. **3**(11): p. 1014.
158. Rommel, C., et al., *Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI (3) K/Akt/mTOR and PI (3) K/Akt/GSK3 pathways*. *Nature cell biology*, 2001. **3**(11): p. 1009.

159. Sandri, M., et al., *Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy*. Cell, 2004. **117**(3): p. 399-412.
160. Izumiya, Y., et al., *Fast/Glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice*. Cell metabolism, 2008. **7**(2): p. 159-172.
161. Akasaki, Y., et al., *Glycolytic fast-twitch muscle fiber restoration counters adverse age-related changes in body composition and metabolism*. Aging cell, 2014. **13**(1): p. 80-91.
162. Atalay, M. and O. Hänninen, *Muscle energy metabolism*. Encycl Life Support Syst Physiol Maint, 2010. **4**: p. 26-47.
163. Hardie, D.G., *Organismal carbohydrate and lipid homeostasis*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2012. **4**(5): p. a006031.
164. Jensen, T.E. and E.A. Richter, *Regulation of glucose and glycogen metabolism during and after exercise*. The Journal of physiology, 2012. **590**(5): p. 1069-1076.
165. Brooks, G.A., *Mammalian fuel utilization during sustained exercise*. 1998(1096-4959 (Print)).
166. Jørgensen, S.B., et al., *The α 2-5' AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading*. Diabetes, 2004. **53**(12): p. 3074-3081.
167. Kuo, I.Y. and B.E. Ehrlich, *Signaling in muscle contraction*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2015. **7**(2): p. a006023.
168. Jeukendrup, A.E., *Regulation of fat metabolism in skeletal muscle*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2002. **967**(1): p. 217-235.

169. Odland, L.M., et al., *Effects of increased fat availability on fat-carbohydrate interaction during prolonged exercise in men*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 1998. **274**(4): p. R894-R902.
170. Reed, L.J., *Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by a phosphorylation–dephosphorylation*. Biological Cycles: Current Topics in Cellular Regulation, Vol. 18, 2013. **18**: p. 95.
171. Dyck, D.J., et al., *Regulation of muscle glycogen phosphorylase activity during intense aerobic cycling with elevated FFA*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 1996. **270**(1): p. E116-E125.
172. Coast, J.R., *Handbook of Physiology. Section 12. Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems*. Medicine & Science in Sports & Exercise, 1997. **29**(3): p. 424,425.
173. Carrero, I., Herráez, A., *“El mundo de los lípidos”*.
174. Dyck, D., et al., *Regulation of fat-carbohydrate interaction in skeletal muscle during intense aerobic cycling*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 1993. **265**(6): p. E852-E859.
175. Pedersen, B., *Muscle as a Secretory Organ. Compr. Physiol., vol. 3, Hoboken*. 2013, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
176. Pedersen, B.K., et al., *Role of myokines in exercise and metabolism*. Journal of Applied Physiology, 2007. **103**(3): p. 1093-1098.
177. Peterson, J.M., R. Mart, and C.E. Bond, *Effect of obesity and exercise on the expression of the novel myokines, Myonectin and Fibronectin type III domain containing 5*. PeerJ, 2014. **2**: p. e605.
178. Cardozo, C.P. and Z.A. Graham, *Muscle–bone interactions: movement in the field of mechano–humoral coupling of muscle and bone*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2017. **1402**(1): p. 10-17.

179. Huh, J.Y., *The role of exercise-induced myokines in regulating metabolism*. Archives of pharmacal research, 2018. **41**(1): p. 14-29.
180. Roberts, L.D., et al., *β -Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic β -oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors*. Cell metabolism, 2014. **19**(1): p. 96-108.
181. Seldin, M.M., et al., *Myonectin (CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic lipid homeostasis*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(15): p. 11968-11980.
182. Henningsen, J., et al., *Dynamics of the skeletal muscle secretome during myoblast differentiation*. Molecular & cellular proteomics, 2010. **9**(11): p. 2482-2496.
183. Henningsen, J., B.K. Pedersen, and I. Kratchmarova, *Quantitative analysis of the secretion of the MCP family of chemokines by muscle cells*. Molecular BioSystems, 2011. **7**(2): p. 311-321.
184. McPherron, A.C. and S.-J. Lee, *Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice*. The Journal of clinical investigation, 2002. **109**(5): p. 595-601.
185. Pedersen, B.K. and M.A. Febbraio, *Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6*. Physiological reviews, 2008.
186. Carey, A.L., et al., *Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase*. Diabetes, 2006. **55**(10): p. 2688-2697.
187. Bruce, C.R. and D.J. Dyck, *Cytokine regulation of skeletal muscle fatty acid metabolism: effect of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α* . American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2004. **287**(4): p. E616-E621.

188. Petersen, E., et al., *Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2005. **288**(1): p. E155-E162.
189. Van Hall, G., et al., *Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2003. **88**(7): p. 3005-3010.
190. Kahn, B.B., et al., *AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism*. Cell metabolism, 2005. **1**(1): p. 15-25.
191. Febbraio, M.A., et al., *Interleukin-6 is a novel factor mediating glucose homeostasis during skeletal muscle contraction*. Diabetes, 2004. **53**(7): p. 1643-1648.
192. Peppler, W.T., et al., *Acute administration of IL-6 improves indices of hepatic glucose and insulin homeostasis in lean and obese mice*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2019. **316**(1): p. G166-G178.
193. Das, D.K., Z.A. Graham, and C.P. Cardozo, *Myokines in skeletal muscle physiology and metabolism: recent advances and future perspectives*. Acta Physiologica, 2020. **228**(2): p. e13367.
194. Sutrave, P. and S. Hughes, *The ski oncogene*. Oncogene, 1991. **6**(3): p. 353-356.
195. Costelli, P., et al., *Reduced protein degradation rates and low expression of proteolytic systems support skeletal muscle hypertrophy in transgenic mice overexpressing the c-ski oncogene*. Cancer letters, 2003. **200**(2): p. 153-160.
196. Etgen Jr, G., et al., *Exercise training reverses insulin resistance in muscle by enhanced recruitment of GLUT-4 to the cell surface*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 1997. **272**(5): p. E864-E869.
197. Fiebig, R.G., et al., *Training down-regulates fatty acid synthase and body fat in obese Zucker rats*. Medicine and science in sports and exercise, 2002. **34**(7): p. 1106-1114.

198. Christ, C.Y., et al., *Exercise training improves muscle insulin resistance but not insulin receptor signaling in obese Zucker rats*. Journal of Applied Physiology, 2002. **92**(2): p. 736-744.
199. Knowler, W.C., et al., *Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin*. The New England journal of medicine, 2002. **346**(6): p. 393-403.
200. Argilés, J.M., et al., *Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity?* Medicinal research reviews, 2005. **25**(1): p. 49-65.
201. Unger, R.H., *Lipotoxic diseases*. Annual review of medicine, 2002. **53**(1): p. 319-336.
202. Foster, D.O. and M.L. Frydman, *Nonshivering thermogenesis in the rat. II. Measurements of blood flow with microspheres point to brown adipose tissue as the dominant site of the calorogenesis induced by noradrenaline*. Canadian journal of physiology and pharmacology, 1978. **56**(1): p. 110-122.
203. Trayhurn, P. and J.H. Beattie, *Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ*. Proceedings of the Nutrition Society, 2007. **60**(3): p. 329-339.
204. Moitra, J., et al., *Life without white fat: a transgenic mouse*. Genes & development, 1998. **12**(20): p. 3168-3181.
205. Shimomura, I., et al., *Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy*. Genes & development, 1998. **12**(20): p. 3182-3194.
206. Groop, L.C., et al., *The role of free fatty acid metabolism in the pathogenesis of insulin resistance in obesity and noninsulin-dependent diabetes mellitus*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1991. **72**(1): p. 96-107.

207. Paolisso, G., et al., *A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM*. Diabetologia, 1995. **38**(10): p. 1213-1217.
208. Lafontan, M. and D. Langin, *Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue*. Progress in lipid research, 2009. **48**(5): p. 275-297.
209. Brasaemle, D.L., et al., *Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(45): p. 46835-46842.
210. Mitra, S., V.S. Bansal, and P.K. Bhatnagar, *From a glucocentric to a lipocentric approach towards metabolic syndrome*. Drug discovery today, 2008. **13**(5-6): p. 211-218.
211. Guo, Y., et al., *Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization*. Nature, 2008. **453**(7195): p. 657.
212. Zehmer, J.K., et al., *A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic*. Proteomics, 2009. **9**(4): p. 914-921.
213. Londos, C., Brasaemle DL, Schultz CJ, Adler-Wailes DC, Levin DM, Kimmel AR, and Rondinone CM. *On the control of lipolysis in adipocytes*. Ann NY Acad Sci, 1999. **892**: p. 155-168.
214. Brasaemle, D.L., et al., *Perilipin A and the control of triacylglycerol metabolism*. Molecular and cellular biochemistry, 2009. **326**(1-2): p. 15.
215. Brasaemle, D., *The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis*. Journal of Lipid Research, 2007. **48**(12): p. 2547-2559.
216. Ducharme, N.A. and P.E. Bickel, *Minireview: lipid droplets in lipogenesis and lipolysis*. Endocrinology, 2008. **149**(3): p. 942-949.

217. Greenberg, A.S., et al., *Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993. **90**(24): p. 12035-12039.
218. Yamaguchi, T., et al., *MLDP, a novel PAT family protein localized to lipid droplets and enriched in the heart, is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α* . Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(20): p. 14232-14240.
219. Wolins, N.E., et al., *OXPAT/PAT-1 is a PPAR-induced lipid droplet protein that promotes fatty acid utilization*. Diabetes, 2006. **55**(12): p. 3418-3428.
220. Dalen, K.T., et al., *LSDP5 is a PAT protein specifically expressed in fatty acid oxidizing tissues*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2007. **1771**(2): p. 210-227.
221. Wang, H., et al., *Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria*. Journal of lipid research, 2011. **52**(12): p. 2159-2168.
222. Bell, M., et al., *Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance*. Diabetes, 2008. **57**(8): p. 2037-2045.
223. McManaman, J.L., et al., *Perilipin-2-null mice are protected against diet-induced obesity, adipose inflammation, and fatty liver disease*. Journal of lipid research, 2013. **54**(5): p. 1346-1359.
224. Carr, R.M., et al., *Absence of perilipin 2 prevents hepatic steatosis, glucose intolerance and ceramide accumulation in alcohol-fed mice*. PloS one, 2014. **9**(5): p. e97118.
225. Harper, R.D. and E.D. Saggerson, *Some aspects of fatty acid oxidation in isolated fat-cell mitochondria from rat*. Biochemical Journal, 1975. **152**(3): p. 485-494.

226. Böttcher, H. and P. Fürst, *Decreased white fat cell thermogenesis in obese individuals*. International journal of obesity, 1997. **21**(6): p. 439.
227. Marcelin, G. and S. Chua Jr, *Contributions of adipocyte lipid metabolism to body fat content and implications for the treatment of obesity*. Current opinion in pharmacology, 2010. **10**(5): p. 588-593.
228. Kusminski, C.M. and P.E. Scherer, *Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue*. Trends in endocrinology & metabolism, 2012. **23**(9): p. 435-443.
229. Lee, Y.-H., E.P. Mottillo, and J.G. Granneman, *Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2014. **1842**(3): p. 358-369.
230. Rutkowski, J.M., J.H. Stern, and P.E. Scherer, *The cell biology of fat expansion*. J Cell Biol, 2015. **208**(5): p. 501-512.
231. Valet, P., et al., *Understanding adipose tissue development from transgenic animal models*. Journal of lipid research, 2002. **43**(6): p. 835-860.
232. Zimmermann, R., et al., *Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase*. Science, 2004. **306**(5700): p. 1383-1386.
233. Jenkins, C.M., et al., *Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(47): p. 48968-48975.
234. Villena, J.A., et al., *Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(45): p. 47066-47075.

235. Zechner, R., et al., *Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores*. Journal of lipid research, 2009. **50**(1): p. 3-21.
236. RACLOT, T., et al., *Selective release of human adipocyte fatty acids according to molecular structure*. Biochemical Journal, 1997. **324**(3): p. 911-915.
237. Anthonsen, M.W., et al., *Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(1): p. 215-221.
238. Fredrikson, G., H. Tornqvist, and P. Belfrage, *Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, 1986. **876**(2): p. 288-293.
239. Greenberg, A.S., et al., *Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(48): p. 45456-45461.
240. Arner, P., *Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role*. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism, 2005. **19**(4): p. 471-482.
241. Febbraio, M., D.P. Hajjar, and R.L. Silverstein, *CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism*. The Journal of clinical investigation, 2001. **108**(6): p. 785-791.
242. Bonen, A., et al., *Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(19): p. 14501-14508.
243. Coburn, C.T., et al., *Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(42): p. 32523-32529.

244. Hajri, T., et al., *Defective fatty acid uptake modulates insulin responsiveness and metabolic responses to diet in CD36-null mice*. The Journal of clinical investigation, 2002. **109**(10): p. 1381-1389.
245. Hajri, T., et al., *CD36-facilitated fatty acid uptake inhibits leptin production and signaling in adipose tissue*. Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1872-1880.
246. Ibrahimi, A., et al., *Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(38): p. 26761-26766.
247. Schwenk, R.W., et al., *Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease*. Cardiovascular research, 2008. **79**(2): p. 249-258.
248. Nahlé, Z., et al., *CD36-dependent regulation of muscle FoxO1 and PDK4 in the PPAR δ / β -mediated adaptation to metabolic stress*. Journal of biological chemistry, 2008. **283**(21): p. 14317-14326.
249. Holloway, G., et al., *Contribution of FAT/CD36 to the regulation of skeletal muscle fatty acid oxidation: an overview*. Acta physiologica, 2008. **194**(4): p. 293-309.
250. Frayn, K.N. and E.E. Blaak, *Metabolic fuels and obesity: carbohydrate and lipid metabolism in skeletal muscle and adipose tissue*. Clinical Obesity in Adults and Children, 2005: p. 102-122.
251. Donsmark, M., et al., *Hormone-sensitive lipase as mediator of lipolysis in contracting skeletal muscle*. Exercise and sport sciences reviews, 2005. **33**(3): p. 127-133.
252. Akagi, M., et al., *Mutation analysis of two Japanese patients with Fanconi-Bickel syndrome*. Journal of human genetics, 2000. **45**(1): p. 60-62.
253. Lehto, M., et al., *Human hexokinase II: localization of the polymorphic gene to chromosome 2*. Diabetologia, 1993. **36**(12): p. 1299-1302.

254. Putt, W., et al., *Phosphoglucomutase 1: a gene with two promoters and a duplicated first exon*. *Biochemical Journal*, 1993. **296**(2): p. 417-422.
255. Yu, Q. and X. Zheng, *The crystal structure of human UDP-glucose pyrophosphorylase reveals a latch effect that influences enzymatic activity*. *Biochemical Journal*, 2012. **442**(2): p. 283-291.
256. Gibbons, B.J., P.J. Roach, and T.D. Hurley, *Crystal Structure of the Autocatalytic Initiator of Glycogen Biosynthesis, Glycogenin*. *Journal of Molecular Biology*, 2002. **319**(2): p. 463-477.
257. Nuttall, F.Q., et al., *The Human Liver Glycogen Synthase Isozyme Gene Is Located on the Short Arm of Chromosome 12*. *Genomics*, 1994. **19**(2): p. 404-405.
258. Akman, H.O., et al., *Deep intronic GBE1 mutation in manifesting heterozygous patients with adult polyglucosan body disease*. *JAMA neurology*, 2015. **72**(4): p. 441-445.
259. Medicine, J.J., *Glycogen synthesis and degradation in liver and skeletal muscle*.
260. Ragolia, L. and N. Begum, *Protein phosphatase-1 and insulin action*, in *Insulin Action*. 1998, Springer. p. 49-58.
261. Bultot, L., et al., *AMP-activated protein kinase phosphorylates and inactivates liver glycogen synthase*. *Biochemical Journal*, 2012. **443**(1): p. 193-203.
262. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. *Nature*, 2001. **414**(6865): p. 799.
263. Akman, H.O., et al., *Deep Intronic GBE1 Mutation in Manifesting Heterozygous Patients With Adult Polyglucosan Body Disease*. *JAMA Neurology*, 2015. **72**(4): p. 441-445.
264. King, M.W., *Glycogen Metabolism*. *The Medical Biochemistry Page*, 1996–2019.

265. Pilkis, S. and T. Claus, *Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes*. Annual review of nutrition, 1991. **11**(1): p. 465-515.
266. Al Hasawi, N., M.F. Alkandari, and Y.A. Luqmani, *Phosphofructokinase: a mediator of glycolytic flux in cancer progression*. Critical reviews in oncology/hematology, 2014. **92**(3): p. 312-321.
267. *Gluconeogenesis and Maintenance of Blood Glucose Levels*.
268. Burwinkel, B., et al., *Mutations in the liver glycogen phosphorylase gene (PYGL) underlying glycogenosis type VI (Hers disease)*. The American Journal of Human Genetics, 1998. **62**(4): p. 785-791.
269. Chen, Y.-T., et al., *Glycogen debranching enzyme: purification, antibody characterization, and immunoblot analyses of type III glycogen storage disease*. American journal of human genetics, 1987. **41**(6): p. 1002.
270. Martin, C., et al., *Identification and characterization of a human cDNA and gene encoding a ubiquitously expressed glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein*. Journal of molecular endocrinology, 2002. **29**(2): p. 205-222.
271. Pilkis, S., T. Claus, and M.R. El-Maghrabi, *The role of cyclic AMP in rapid and long-term regulation of gluconeogenesis and glycolysis*. Advances in second messenger and phosphoprotein research, 1988. **22**: p. 175-191.
272. Pilkis, S.J., M.R. El-Maghrabi, and T.H. Claus, *Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis*. Annual review of biochemistry, 1988. **57**(1): p. 755-783.
273. Woerle, H.J., et al., *Pathways for glucose disposal after meal ingestion in humans*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2003. **284**(4): p. E716-E725.

274. Hawley, J.A., et al., *Carbohydrate-loading and exercise performance*. Sports medicine, 1997. **24**(2): p. 73-81.
275. Ivy, J., et al., *Muscle glycogen synthesis after exercise: effect of time of carbohydrate ingestion*. Journal of applied physiology, 1988. **64**(4): p. 1480-1485.
276. Jensen, J., et al., *Effects of adrenaline on whole-body glucose metabolism and insulin-mediated regulation of glycogen synthase and PKB phosphorylation in human skeletal muscle*. Metabolism, 2011. **60**(2): p. 215-226.
277. Taylor, R., Magnusson B, Rothman DL et al. *Direct assessment of liver glycogen storage by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy and regulation of glucose homeostasis after a mixed meal in normal subjects*. J Clin Invest, 1996. **97**: p. 126-132.
278. Katz, J. and J. McGarry, *The glucose paradox. Is glucose a substrate for liver metabolism?* The Journal of clinical investigation, 1984. **74**(6): p. 1901-1909.
279. Jensen, J., et al., *The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise*. Frontiers in physiology, 2011. **2**: p. 112.
280. Wolfe, R.R., *The underappreciated role of muscle in health and disease*. The American journal of clinical nutrition, 2006. **84**(3): p. 475-482.
281. Newgard, C.B., P.K. Hwang, and R.J. Fletterick, *The family of glycogen phosphorylases: structure and function*. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 1989. **24**(1): p. 69-99.
282. Monod, J., J. Wyman, and J.-P. Changeux, *On the nature of allosteric transitions: a plausible model*. J Mol Biol, 1965. **12**(1): p. 88-118.
283. NCBI, *Glycogen Phosphorylase*
284. Acharya, K., *Glycogen phosphorylase b: description of the protein structure*. 1991: World Scientific.

285. Sprang, S., et al., *Analysis of an allosteric binding site: the nucleoside inhibitor site of phosphorylase a*. *Biochemistry*, 1982. **21**(9): p. 2036-2048.
286. Barford, D. and L. Johnson, *The allosteric transition of glycogen phosphorylase*. *Nature*, 1989. **340**(6235): p. 609.
287. Eriksson, S., B. Sjöberg, and G. Hervé, *Allosteric Enzymes*. CRC, Boca Raton, 1989: p. 189.
288. Palm, D., et al., *The role of pyridoxal 5'-phosphate in glycogen phosphorylase catalysis*. *Biochemistry*, 1990. **29**(5): p. 1099-1107.
289. Madsen, N. and S. Withers, *Glycogen phosphorylase and derivatives*. *Coenzymes and Cofactors; Pyridoxal Phosphate and Derivatives* (Dolphin, D., Paulson, R. & Avramovic, O., eds.) pp, 1986: p. 1-29.
290. Johnson, L., et al., *Refined crystal structure of the phosphorylase-heptulose 2-phosphate-oligosaccharide-AMP complex*. *Journal of molecular biology*, 1990. **211**(3): p. 645-661.
291. Klein, H.W., et al., *Does pyridoxal 5'-phosphate function in glycogen phosphorylase as an electrophilic or a general acid catalyst?* *Biochemistry*, 1984. **23**(24): p. 5853-5861.
292. KLEIN, H.W., M.J. IM, and D. PALM, *Mechanism of the phosphorylase reaction: Utilization of d-gluco-hept-1-enitol in the absence of primer*. *European journal of biochemistry*, 1986. **157**(1): p. 107-114.
293. Meyer, F., et al., *Control of Phosphorylase Activity in a Muscle Glycogen Particle I. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE PROTEIN-GLYCOGEN COMPLEX*. *Journal of Biological Chemistry*, 1970. **245**(24): p. 6642-6648.
294. Kasvinsky, P., et al., *X-ray crystallographic and kinetic studies of oligosaccharide binding to phosphorylase*. *Journal of Biological Chemistry*, 1978. **253**(4): p. 1290-1296.

295. Goldsmith, E., S. Sprang, and R. Fletterick, *Alternative binding modes for maltopentaose in the activation site of glycogen phosphorylase a*. Transactions of the American Crystallographic Association, 1989. **25**: p. 87-104.
296. Johnson, L., et al., *Protein-oligosaccharide interactions: lysozyme, phosphorylase, amylases*, in *Carbohydrate-Protein Interaction*. 1988, Springer. p. 81-134.
297. Withers, S., et al., *Structural basis for the activation of glycogen phosphorylase b by adenosine monophosphate*. Science, 1991. **254**(5036): p. 1367-1371.
298. Llaveró, F., et al., *McArdle Disease: New Insights into Its Underlying Molecular Mechanisms*. International journal of molecular sciences, 2019. **20**(23): p. 5919.
299. Kurganov, B.I., et al., *Dissociative mechanism of thermal denaturation of rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase b*. Biochemistry, 2000. **39** **43**: p. 13144-52.
300. Henke, B.R. and S.M. Sparks, *Glycogen phosphorylase inhibitors*. Mini reviews in medicinal chemistry, 2006. **6**(8): p. 845-857.
301. Hudson, J.W., G.B. Golding, and M.M. Crerar, *Evolution of allosteric control in glycogen phosphorylase*. Journal of molecular biology, 1993. **234**(3): p. 700-721.
302. Labrune, P., et al., *Glucogenosis*. EMC - Pediatría, 2010. **45**(3): p. 1-13.
303. Deu, H.S.J.d., *Guía Metabólica*.
304. Gazzero, E., A.L. Andreu, and C. Bruno, *Neuromuscular disorders of glycogen metabolism*. Current neurology and neuroscience reports, 2013. **13**(3): p. 333.
305. Reference., G.H., *PYGM gene, glycogen phosphorylase, muscle associated*. 2016.
306. Orphanet, *Enfermedad de almacenamiento de glucógeno por deficiencia de glucógeno fosforilasa muscular*. 2016.

307. Lucia, A., et al., *Genotypic and phenotypic features of McArdle disease: insights from the Spanish national registry*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 2012. **83**(3): p. 322-328.
308. www.omim.org, *OMIM Entry - # 232600 - GLYCOGEN STORAGE DISEASE V; GSD5*. 2016.
309. Nogales-Gadea, G., et al., *McArdle Disease: Update of Reported Mutations and Polymorphisms in the PYGM Gene*. Human Mutation, 2015. **36**(7): p. 669-678.
310. Nogales-Gadea, G., et al., *The pathogenomics of McArdle disease--genes, enzymes, models, and therapeutic implications*. J Inherit Metab Dis, 2015. **38**(2): p. 221-30.
311. Santalla, A., et al., *McArdle disease: a unique study model in sports medicine*. Sports Med, 2014. **44**(11): p. 1531-44.
312. Nogales-Gadea, G., et al., *Knock-in mice for the R50X mutation in the PYGM gene present with McArdle disease*. Brain, 2012. **135**(Pt 7): p. 2048-57.
313. Santalla, A., et al., *Genotypic and phenotypic features of all Spanish patients with McArdle disease: a 2016 update*. BMC genomics, 2017. **18**(8): p. 819.
314. Haller, R.G. and J. Vissing, *Spontaneous "Second Wind" and Glucose-Induced Second "Second Wind" in McArdle Disease: Oxidative Mechanisms*. JAMA Neurology, 2002. **59**(9): p. 1395-1402.
315. Vissing, J., S.D. Donato, and F. Taroni, *Metabolic myopathies, in Disorders of Voluntary Muscle*, D. Hilton-Jones, et al., Editors. 2010, Cambridge University Press: Cambridge. p. 390-408.
316. Godfrey, R. and R. Quinlivan, *Skeletal muscle disorders of glycogenolysis and glycolysis*. Nat Rev Neurol, 2016. **12**(7): p. 393-402.

317. Pallo, P.A.O., et al., *McArdle s disease: an underestimated or underdiagnosed myopathy in rheumatologic practice? Cases series and literature review*. MedicalExpress, 2018. **5**.
318. Lucia, A., et al., *McArdle disease: what do neurologists need to know?* Nature Clinical Practice Neurology, 2008. **4**: p. 568.
319. Maté-Munoz, J.L., et al., *Favorable responses to acute and chronic exercise in McArdle patients*. Clinical Journal of Sport Medicine, 2007. **17**(4): p. 297-303.
320. Sanjurjo, E., et al., *Prueba de ejercicio con isquemia en el antebrazo. Estandarización y valor diagnóstico en la identificación de la enfermedad de McArdle*. Medicina Clínica, 2004. **122**(20): p. 761-766.
321. McArdle, B., *Myopathy due to a defect in muscle glycogen breakdown*. Clin Sci, 1951. **10**: p. 13-33.
322. DiMauro, S., et al., *Myophosphorylase Deficiency (Glycogenosis Type V McArdle Disease)*. Current molecular medicine, 2002. **2**(2): p. 189-196.
323. Pearson, C.M., D.G. Rimer, and W.F. Mommaerts, *A metabolic myopathy due to absence of muscle phosphorylase*. The American journal of medicine, 1961. **30**(4): p. 502-517.
324. Bergström, J., *Percutaneous needle biopsy of skeletal muscle in physiological and clinical research*. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation, 1975. **35**(7): p. 609-616.
325. Nogales-Gadea, G., J. Arenas, and A. Andreu, *Molecular genetics of McArdle's disease*. Current Neurology and Neuroscience Reports, 2007. **7**(1): p. 84-92.
326. Aquaron, R., et al., *Molecular characterization of myophosphorylase deficiency (McArdle disease) in 34 patients from Southern France: identification of 10 new*

- mutations. Absence of genotype–phenotype correlation.* Neuromuscular Disorders, 2007. **17**(3): p. 235-241.
327. Deschauer, M., et al., *Analysis of spectrum and frequencies of mutations in McArdle disease. Identification of 13 novel mutations.* J Neurol, 2007. **254**(6): p. 797-802.
328. Martín, M.A., et al., *Molecular heterogeneity of myophosphorylase deficiency (McArdle's disease): a genotype-phenotype correlation study.* Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society, 2001. **50**(5): p. 574-581.
329. Rubio, J.C., et al., *A proposed molecular diagnostic flowchart for myophosphorylase deficiency (McArdle disease) in blood samples from Spanish patients.* Human mutation, 2007. **28**(2): p. 203-204.
330. Tsujino, S., et al., *Three new mutations in patients with myophosphorylase deficiency (McArdle disease).* American journal of human genetics, 1994. **54**(1): p. 44.
331. Fernández, R., et al., *A novel missense mutation (W797R) in the myophosphorylase gene in Spanish patients with McArdle disease.* Archives of neurology, 2000. **57**(2): p. 217-219.
332. Bruno, C., et al., *Molecular characterization of McArdle's disease in two large Finnish families.* Journal of the neurological sciences, 1999. **165**(2): p. 121-125.
333. Fernandez-Cadenas, I., et al., *Splicing mosaic of the myophosphorylase gene due to a silent mutation in McArdle disease.* Neurology, 2003. **61**(10): p. 1432-1434.
334. Krag, T.O., et al., *Differential muscle involvement in mice and humans affected by McArdle disease.* Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2016. **75**(5): p. 441-454.

335. Krag, T.O., et al., *Differential glucose metabolism in mice and humans affected by McArdle disease*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2016. **311**(2): p. R307-R314.
336. Robertshaw, H.A., et al., *Increased PFK activity and GLUT4 protein content in McArdle's disease*. Muscle & nerve, 2008. **37**(4): p. 431-437.
337. Nielsen, J.N., et al., *Role of 5' AMP-activated protein kinase in glycogen synthase activity and glucose utilization: insights from patients with McArdle's disease*. The Journal of physiology, 2002. **541**(3): p. 979-989.
338. Vissing, J., et al., *Effect of deficient muscular glycogenolysis on extramuscular fuel production in exercise*. Journal of Applied Physiology, 1992. **72**(5): p. 1773-1779.
339. Vissing, J. and R.G. Haller, *The effect of oral sucrose on exercise tolerance in patients with McArdle's disease*. New England Journal of Medicine, 2003. **349**(26): p. 2503-2509.
340. Bloemberg, D. and J. Quadrilatero, *Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis*. PloS one, 2012. **7**(4): p. e35273.
341. MacKrell, J.G. and G.D. Cartee, *A novel method to measure glucose uptake and myosin heavy chain isoform expression of single fibers from rat skeletal muscle*. Diabetes, 2012. **61**(5): p. 995-1003.
342. Sakamoto, K. and L.J. Goodyear, *Invited review: intracellular signaling in contracting skeletal muscle*. Journal of applied physiology, 2002. **93**(1): p. 369-383.
343. Arnold, D., P. Matthews, and G. Radda, *Metabolic recovery after exercise and the assessment of mitochondrial function in vivo in human skeletal muscle by means of ³¹P NMR*. Magnetic resonance in medicine, 1984. **1**(3): p. 307-315.

344. Argov, Z. and W.J. Bank, *Phosphorus magnetic resonance spectroscopy (31P MRS) in neuromuscular disorders*. Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society, 1991. **30**(1): p. 90-97.
345. Argov, Z., et al., *Bioenergetic heterogeneity of human mitochondrial myopathies: phosphorus magnetic resonance spectroscopy study*. Neurology, 1987. **37**(2): p. 257-257.
346. Argov, Z., et al., *Effects of thyroid hormones on skeletal muscle bioenergetics. In vivo phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy study of humans and rats*. The Journal of clinical investigation, 1988. **81**(6): p. 1695-1701.
347. Arnold, D., D. Taylor, and G. Radda, *Investigation of human mitochondrial myopathies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy*. Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society, 1985. **18**(2): p. 189-196.
348. Kemp, G., D. Taylor, and G. Radda, *Control of phosphocreatine resynthesis during recovery from exercise in human skeletal muscle*. NMR in biomedicine, 1993. **6**(1): p. 66-72.
349. De Stefano, N., et al., *Impairment of muscle mitochondrial oxidative metabolism in McArdle's disease*. Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine, 1996. **19**(6): p. 764-769.
350. Brouns, F., W. Saris, and N. Rehrer, *Abdominal complaints and gastrointestinal function during long-lasting exercise*. International journal of sports medicine, 1987. **8**(03): p. 175-189.
351. Wagenmakers, A.J., J.H. Coakley, and R.H. EDWARDS, *The metabolic consequences of reduced habitual activities in patients with muscle pain and disease*. Ergonomics, 1988. **31**(11): p. 1519-1527.

352. Baker, S.K., K.J. McCullagh, and A. Bonen, *Training intensity-dependent and tissue-specific increases in lactate uptake and MCT-1 in heart and muscle*. Journal of applied physiology, 1998. **84**(3): p. 987-994.
353. Azevedo Jr, J.L., et al., *Lactate, fructose and glucose oxidation profiles in sports drinks and the effect on exercise performance*. PLoS One, 2007. **2**(9): p. e927.
354. Schlattner, U., M. Tokarska-Schlattner, and T. Wallimann, *Mitochondrial creatine kinase in human health and disease*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2006. **1762**(2): p. 164-180.
355. Tarnopolsky, M., et al., *Creatine transporter and mitochondrial creatine kinase protein content in myopathies*. Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine, 2001. **24**(5): p. 682-688.
356. Kitaoka, Y., et al., *Monocarboxylate transporters and mitochondrial creatine kinase protein content in McArdle disease*. Molecular genetics and metabolism, 2013. **108**(4): p. 259-262.
357. Nielsen, T.L., et al., *Exercising with blocked muscle glycogenolysis: Adaptation in the McArdle mouse*. Molecular genetics and metabolism, 2018. **123**(1): p. 21-27.
358. MacLean, D., et al., *Oral branched-chain amino acids do not improve exercise capacity in McArdle disease*. Neurology, 1998. **51**(5): p. 1456-1459.
359. Steele, I.C., V.H. Patterson, and D.P. Nicholls, *A double blind, placebo controlled, crossover trial of D-ribose in McArdle's disease*. Journal of the neurological sciences, 1996. **136**(1-2): p. 174-177.
360. Phoenix, J., et al., *Effect of vitamin B6 supplementation in McArdle's disease: a strategic case study*. Neuromuscular Disorders, 1998. **8**(3-4): p. 210-212.
361. Day, T. and F. Mastaglia, *Depot-glucagon in the treatment of McArdle's disease*. Australian and New Zealand journal of medicine, 1985. **15**(6): p. 748.

362. Poels, P., et al., *Dantrolene sodium does influence the second wind phenomenon in McArdle's disease: Electrophysiological evidence during exercise in a double-blind placebo-controlled, cross-over study in 5 patients*. Journal of the neurological sciences, 1990. **100**(1-2): p. 108-112.
363. Lane, R.J., et al., *A double-blind, placebo-controlled, crossover study of verapamil in exertional muscle pain*. Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine, 1986. **9**(7): p. 635-641.
364. Vorgerd, M., et al., *Creatine therapy in myophosphorylase deficiency (McArdle disease): a placebo-controlled crossover trial*. Archives of Neurology, 2000. **57**(7): p. 956-963.
365. Vorgerd, M., et al., *Effect of high-dose creatine therapy on symptoms of exercise intolerance in McArdle disease: double-blind, placebo-controlled crossover study*. Archives of neurology, 2002. **59**(1): p. 97-101.
366. Howell, J.M., et al., *Adenovirus and adeno-associated virus-mediated delivery of human myophosphorylase cDNA and LacZ cDNA to muscle in the ovine model of McArdle's disease: Expression and re-expression of glycogen phosphorylase*. Neuromuscular Disorders, 2008. **18**(3): p. 248-258.
367. McNamara, E.L., et al., *Systemic AAV8-mediated delivery of a functional copy of muscle glycogen phosphorylase (Pygm) ameliorates disease in a murine model of McArdle disease*. Human molecular genetics, 2019.
368. Welch, E.M., et al., *PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations*. Nature, 2007. **447**: p. 87.
369. Kayali, R., et al., *Read-through compound 13 restores dystrophin expression and improves muscle function in the mdx mouse model for Duchenne muscular dystrophy*. Human molecular genetics, 2012. **21**(18): p. 4007-4020.

370. Barton-Davis, E.R., et al., *Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice*. The Journal of clinical investigation, 1999. **104**(4): p. 375-381.
371. Bedwell, D.M., et al., *Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line*. 1997(1078-8956 (Print)).
372. Schroers, A., et al., *Gentamicin treatment in McArdle disease: failure to correct myophosphorylase deficiency*. Neurology, 2006. **66**(2): p. 285-286.
373. Zange, J., et al., *Breakdown of adenine nucleotide pool in fatiguing skeletal muscle in McArdle's disease: A noninvasive ³¹P-MRS and EMG study*. Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine, 2003. **27**(6): p. 728-736.
374. Lennon, G., C. Auffray, and M. Polymeropoulos, *The IMAGE Consortium: an integrated molecular analysis of genomes and their expression*. Genomics, 1996. **33**(1).
375. Team, M.G.C.P., *Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(26): p. 16899-16903.
376. Birch, K.E., R.M. Quinlivan, and G.E. Morris, *Cell models for McArdle disease and aminoglycoside-induced read-through of a premature termination codon*. Neuromuscular disorders, 2013. **23**(1): p. 43-51.
377. Tarrasó, G., et al., *Absence of p.R50X Pygm read-through in McArdle disease cellular models*. Disease models & mechanisms, 2020. **13**(1): p. dmm043281.
378. Brull, A., et al., *Phenotype consequences of myophosphorylase dysfunction: insights from the McArdle mouse model*. J Physiol, 2015. **593**(12): p. 2693-706.
379. Kaplan, E.L. and P. Meier, *Nonparametric estimation from incomplete observations*. Journal of the American statistical association, 1958. **53**(282): p. 457-481.

380. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. *Nature methods*, 2012. **9**(7): p. 671-675.
381. Abràmoff, M.D., P.J. Magalhães, and S.J. Ram, *Image processing with ImageJ*. *Biophotonics international*, 2004. **11**(7): p. 36-42.
382. Rasband, W.S., *National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA*. <http://imagej.nih.gov/ij/>, 2011.
383. Dubach-Powell, J., *Quantitative determination of muscle fiber diameter (minimal Feret's diameter) and percentage of centralized nuclei*. TREAT-NMD Neuromuscular Network SOP M, 2008. **1**.
384. Omairi, S., et al., *Enhanced exercise and regenerative capacity in a mouse model that violates size constraints of oxidative muscle fibres*. *Elife*, 2016. **5**: p. e16940.
385. Nogales-Gadea, G., et al., *Expression of the muscle glycogen phosphorylase gene in patients with McArdle disease: the role of nonsense-mediated mRNA decay*. *Human mutation*, 2008. **29**(2): p. 277-283.
386. Waterborg, J.H., *The Lowry method for protein quantitation*, in *The protein protocols handbook*. 2009, Springer. p. 7-10.
387. Thomas, J.A., K.K. Schlender, and J. Larner, *A rapid filter paper assay for UDPglucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-14C-glucose*. *Analytical biochemistry*, 1968. **25**: p. 486-499.
388. Real-Martinez, A., et al., *Low survival rate and muscle fiber-dependent aging effects in the McArdle disease mouse model*. *Scientific Reports*, 2019. **9**(1): p. 5116.
389. Barros, M.H.M., et al., *Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages*. *PloS one*, 2013. **8**(11).

390. Oyedotun, K.S. and B.D. Lemire, *The quaternary structure of the Saccharomyces cerevisiae succinate dehydrogenase homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(10): p. 9424-9431.
391. webmaster, *Succinate Dehydrogenase: Identifying Oxidative Potential*.
392. Capaldi, R.A., *STRUCTURE AND FUNCTION OF CYTOCHROME c OXIDASE*. Annual Review of Biochemistry, 1990. **59**(1): p. 569-596.
393. Hill, B.C., *The sequence of electron carriers in the reaction of cytochrome c oxidase with oxygen*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 1993. **25**(2): p. 115-120.
394. Capaldi, R.A., F. Malatesta, and V.M. Darley-USmar, *Structure of cytochrome c oxidase*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics, 1983. **726**(2): p. 135-148.
395. García-Horsman, J.A., et al., *The superfamily of heme-copper respiratory oxidases*. Journal of Bacteriology, 1994. **176**(18): p. 5587-5600.
396. Database, G.G., *Nuclear Respiratory Factor 1*.
397. Adeva-Andany, M.M., et al., *Glycogen metabolism in humans*. BBA clinical, 2016. **5**: p. 85-100.
398. Rui, L., *Energy metabolism in the liver*. Compr Physiol **4**: 177–197. 2014.
399. Milstein, J.M., T.M. Herron, and J.E. Haas, *Fatal infantile muscle phosphorylase deficiency*. Journal of child neurology, 1989. **4**(3): p. 186-188.
400. DiMauro, S. and P.L. Hartlage, *Fatal infantile form of muscle phosphorylase deficiency*. Neurology, 1978. **28**(11): p. 1124-1124.

401. Lehninger, A.L., D.L. Nelson, and M.M. Cox, *Principios de bioquímica*. 2005: Ediciones Omega.

402. Database, G.G., *ACACB Gene (Protein Coding) Acetyl-CoA Carboxylase Beta*.