



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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

TESIS DOCTORAL

PAPEL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS BB EN LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE EN HUMANOS Y ESTUDIO DE NINTEDANIB COMO TRATAMIENTO DE UN MODELO MURINO DE DÉFICIT DE DISTROFINA

Autora: Patricia Piñol Jurado

Directores: Jordi Díaz Manera y Eduard Gallardo Vigo

Tutora: M. Isabel Illa Sendra

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Universidad Autónoma de Barcelona

2019

A los que se fueron
A los que vinieron
A los de siempre
A mis padres
(aunque nunca lo lean)

AGRADECIMIENTOS

Cuando me embarqué en esta aventura casi por casualidad no quería pensar como sería el final, pero el final o el inicio, según se mire, ha llegado. La experiencia ha resultado ser mejor de lo que imaginé y sin duda eso se debe en gran medida a toda la gente que ha formado parte de mi formación académica y personal. Quiero recordar a todos mis compañeros del laboratorio, algunos ya amigos, con los que he coincidido en estos años y a los que recordaré con cariño: Fina, Noemí, Luis, Ana Siles, Xavi, Ana Carrasco, Esther, Cinta, Sonia, Lorena, Elba, Ricard, Janina, Gisela, Aída, Alicia, Elena, Alba, Roser, Miquel, Maialen y Sebas.

A la directora de la Unidad de Enfermedades Neuromusculares del Hospital de Sant Pau, la Dra. Isabel Illa, por apostar por tesis de un perfil más básico y darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio.

A mis directores, Jordi y Eduard, por ayudarme a crecer y confiar en mí. De Edu me quedo con su experiencia en el laboratorio, sus conocimientos en investigación básica y estar siempre dispuesto a ayudar a todos en cualquier momento. A Jordi le admiro por ser un “todoterreno”, su buen humor y generosidad, y le doy las gracias por haberme transmitido su entusiasmo y sus conocimientos en las distrofias musculares, haberme dado libertad de movimiento y por su apoyo en los momentos difíciles.

A Carles, por actuar de “distrofina” entre el neuromuscular y yo.

A Noemí y Esther nuevamente por ayudarme con algunos experimentos cuando “corría prisa”, y especialmente a Xavi, con quien he trabajado mano a mano durante los meses más intensos de la fase final del doctorado. También a los estudiantes de Duchenne Parent Project España, Maria y Ana Molins, que contribuyeron a este estudio. Al Dr. Luis María Escudero, del instituto de Biomedicina de Sevilla, quien colaboró en una parte del proyecto mediante la cuantificación del colágeno y la medición de las fibras musculares en

los estudios histológicos; así como al grupo del Dr. Xavier Navarro de la UAB, quienes realizaron las pruebas funcionales en ratón.

Al Dr. Lutz Wollin por aportarnos su experiencia en el campo de la fibrosis y por involucrarse concienzudamente en este estudio. Por estar dispuesto siempre a ayudar en la resolución de problemas.

A Alexandra Elbakyan por facilitarme mucho la vida.

A mis familiares, que aunque no saben bien bien a lo que me dedico les quiero igual, y en especial a mis padres por apoyarme en todas las decisiones y acompañarme hasta el final de mi formación. A mi abuela que siempre me espera.

A los amigos que se han preocupado por mí en esta etapa final de "reclusión": Guille, Ana S., Gloria, Mariona, Beto, Esteticlub, Ana, Jérica y alguno más.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAV: Virus adenoasociados

ACE: Enzima convertidora de angiotensina

ALT: Alanina transaminasa

AST: Aspartato transaminasa

AONs; Oligonucleótidos antisentido

BMD: Distrofia muscular de Becker

CK: Creatina cinasa

CMAP: Potencial de acción muscular compuesto

CRISPR/Cas9: *RNA-guided clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated enzyme protein 9*

CTGF: Factor de crecimiento de tejido conectivo

Crk: Regulador de cinasa CT10

DGC: Complejo de distrofina-glicoproteína

DMD: Distrofia muscular de Duchenne

ECM: Matriz extracelular

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EMA: Agencia europea del medicamento

ECG: Electrocardiograma

EMG: Electromiograma

EPG: Factor de crecimiento epidérmico

eMHC: Cadena pesada de la miosina embrionaria

FAPs: Progenitores fibroadipogénicos

FBS: Suero fetal bovino

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico

FGFb: Factor de crecimiento fibroblástico básico

GAGs: Glicosaminoglicanos

GFP: Proteína verde fluorescente

Grb2: Proteína 2 unida a receptor de factor de crecimiento

HPG: Factor de crecimiento hepático

HSCs: Células madre hematopoyéticas

HSPG: Proteoglicano heparán sulfato

IEGs: Genes de expresión inmediata temprana

IGF: Factor de crecimiento insulínico

IL-1: Interleucina 1

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

IPF: Fibrosis pulmonar idiopática

iPS: Células madre pluripotentes inducidas

Kb: kilobase

MMPs: Metaloproteasas de la matriz

MPs: Progenitores miogénicos

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

MSCs: Células madre mesenquimales

MUAPs: Potenciales de acción de unidad motora

MyoD: Proteína 1 de diferenciación miogénica

Nck: Adaptador de la región no catalítica de la tirosina cinasa 1

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal

NO: Óxido nítrico

p38 MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógeno p38

Pax7: Paired box 7

PGs: Proteoglicanos

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDGF-AA: Factor de crecimiento derivado de plaquetas AA

PDGF-AB: Factor de crecimiento derivado de plaquetas AB

PDGF-BB: Factor de crecimiento derivado de plaquetas BB

PDGF-CC: Factor de crecimiento derivado de plaquetas CC

PDGF-DD: Factor de crecimiento derivado de plaquetas DD

PDGFR: Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDGFR α : PDGFR tipo alfa

PDGFR β : PDGFR tipo beta

PGs: Proteoglicanos

PI3K: Fosfatidilinositol-3-cinasa

PLC- γ : Fosfolipasa C- γ

PPMO: Peptidos de penetración celular conjugados a un oligómero de morfolino fosforodiamidato

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RTKs: Receptores tirosina cinasa

SCs: Células satélite

SDF1: Factor derivado de célula estromal 1

SDS: Dodecilsulfato sódico

Smad: Mothers Against Decantaplegic Homolog

SMCs: Células musculares lisas

Src: Stored Response Chain

T β RII: Receptor TGF β tipo II

TGF β : Factor de crecimiento transformante beta 1

Th2: Linfocito T colaborador

TIMPs: inhibidores de las metaloproteasas de la matriz

TNF: Factor de necrosis tumoral

tTG: Transglutaminasa tisular

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

VEGF-A: Factor de crecimiento vascular endotelial A

VEGF-B: Factor de crecimiento vascular endotelial B

VEGFR: Receptor VEGF

VSMCs: Células de músculo liso vascular

WB: Western blot

WT: Tipo salvaje

ÍNDICE

ABSTRACT.....	15
RESUMEN.....	17
1. INTRODUCCIÓN.....	23
1.1. EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	23
1.1.1. Estructura: la fibra muscular y la matriz extracelular.....	23
1.1.1.1. La fibra muscular.....	23
1.1.1.2. La matriz extracelular.....	25
1.1.2. La regeneración muscular.....	27
1.2. LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE.....	31
1.2.1. Definición y características patológicas.....	31
1.2.2. La distrofina y fisiopatología de la enfermedad.....	33
1.2.2.1. Degeneración. Inflamación y fibrosis.....	35
1.2.3. Síntomas clínicos.....	39
1.2.4. Diagnóstico.....	40
1.2.5. Tratamiento.....	41
1.3. FACTORES DE CRECIMIENTO DERIVADOS DE PLAQUETAS Y SUS.....	42
RECEPTORES	
1.3.1. Estructura de PDGF.....	43
1.3.2. Los receptores PDGF y su unión al ligando.....	46
1.3.3. Expresión de PDGFs/PDGFRs.....	48
1.3.4. Vías de señalización y respuesta celular.....	50
1.3.5. Modulación de la señalización.....	52
1.3.6. Funciones biológicas de PDGF.....	53
1.3.7. PDGF y enfermedad.....	54
1.3.7.1. PDGF en fibrosis.....	55

1.3.8. PDGF en el músculo esquelético.....	56
1.3.8.1. PDGF-B.....	58
1.3.8.2. PDGF-A.....	59
1.4. EL RATÓN <i>mdx</i>	60
1.4.1. Características del ratón <i>mdx</i>	61
1.4.2. Similitudes y diferencias con el paciente DMD.....	62
1.5. TERAPIAS EN ESTUDIO.....	63
1.5.1. Terapia génica para el gen de la distrofina.....	64
1.5.1.1. Transferencia génica.....	64
1.5.1.2. Edición del genoma.....	67
1.5.1.3. Modificadores del producto génico.....	67
1.5.1.3.1. Salto de exón.....	67
1.5.1.3.2. Supresión del codón de terminación.....	69
1.5.2. Terapia celular.....	69
1.5.3. Terapia basada en la sobreexpresión de la utrofina.....	72
1.5.4. Terapia farmacológica.....	73
1.5.4.1. Agentes anti-inflamatorios/antioxidantes.....	73
1.5.4.2. Agentes anti-fibróticos.....	74
1.5.4.3. Tratamiento de la isquemia muscular.....	76
1.5.4.4. Reguladores del crecimiento y la regeneración muscular.....	77
1.6. NINTEDANIB.....	79
2. HIPÓTESIS.....	85
3. OBJETIVOS.....	89
3.1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	89
3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	89
4. ARTÍCULOS.....	93
4.1. ARTÍCULO I.....	93

4.1.1. Material suplementario.....	107
4.2. ARTÍCULO II.....	110
4.2.2. Material suplementario.....	125
5. SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS.....	135
5.1. ARTÍCULO I.....	135
5.2. ARTÍCULO 2.....	137
6. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN.....	143
7. CONCLUSIONES.....	153
8. LÍNEAS DE FUTURO.....	157
9. BIBLIOGRAFÍA.....	161

ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is genetic disorder characterized by a continuous muscle degeneration produced by the deficiency of dystrophin, which is a sarcolemmal protein. The disease is characterized by a rapidly progressive muscle weakness that appears at 5-7 years old involving the proximal muscles of the lower limbs. All patients lose the ambulation by the age of 12-15 and are completely dependent of their relatives after the 20 years of age. Cardiac and respiratory involvement is a constant, and they are the main causes of death. Unfortunately, there is not an effective treatment described so far that has changes substantially the natural history of the disease. From a pathophysiological point of view, dystrophin loss leads to sarcolemma damage, infiltrates of inflammatory cells and muscle fiber necrosis and replacement by fat and fibrotic tissue. Although several of the factors that contribute to this process have been revealed, the molecular pathways involved in the regeneration and degeneration of muscle are not completely known. Platelet derived growth factor (PDGF) belongs to a family of growth factors that regulate proliferation, migration, and differentiation of mesenchymal cells. While PDGF-AA isoform is associated to fibrosis, the role of PDGF-BB isoform in muscle regeneration in humans has not been studied.

Platelet-Derived Growth Factor BB Influences Muscle Regeneration in Duchenne Muscle Dystrophy

Patricia Piñol-Jurado MSc, Eduard Gallardo PhD, Noemi de Luna PhD, Xavier Suárez-Calvet PhD, Carles Sánchez-Riera PhD, Esther Fernández-Simón MSc, Clara Gomis MD, Isabel Illa MD PhD, and Jordi Díaz-Manera MD PhD.

In this study it was analyzed the expression of PDGF-BB in muscle biopsy samples from controls and patients with DMD. Also, it was performed *in vitro* experiments to understand

the effects of PDGF-BB on myoblasts, which are cells involved in the pathophysiology of muscular dystrophies and *in vivo*, by treating the *mdx* murine model of DMD with repeated intramuscular injections of PDGF-BB. As a result, it was observed that PDGF-BB was expressed by regenerating and necrotic muscle fibers in muscle biopsy samples from DMD patients. *In vitro*, PDGF-BB activated proliferation and migration of myoblasts. The analysis of muscles samples from the animals treated with PDGF-BB showed an increase in the population of satellite cells (SCs) and in the number of regenerative fibers, with a decrease in the inflammatory infiltrates, compared with those vehicle-treated mice. Based on these results, we suggest that PDGF-BB may play a protective role in muscular dystrophies by enhancing muscle regeneration through activation of satellite cell proliferation and migration.

Nintedanib decreases muscle fibrosis and improves muscle function in a murine model of dystrophinopathy

Patricia Piñol-Jurado MSc; Xavier Suárez-Calvet PhD; Esther Fernández MSc; Eduard Gallardo PhD; Natalia de la Oliva PhD; Anna Martínez-Muriana PhD; Pedro Gómez-Gálvez MSc; Luis María Escudero PhD; Maria Pérez-Peiró MSc; Lutz Wollin PhD; Noemi de Luna PhD; Xavier Navarro PhD; Isabel Illa MD PhD, Jordi Díaz-Manera MD PhD.

Several therapies have been developed to counteract the fibrotic process in muscle dystrophies and other diseases. In this study the effects of nintedanib, which is a triple tyrosine kinase inhibitor, in the *mdx* murine model of DMD were studied. Nintedanib reduced proliferation and migration of human fibroblasts *in vitro* and decreased the expression of fibrotic genes such as *COL1A1*, *COL3A1*, *FN1*, *TGFB1* and *PDGFA*. Seven *mdx* mice were treated with 60 mg/kg/day nintedanib for 1 month. Electrophysiological studies showed an increase in the amplitude of the motor action potentials and an improvement of the morphology of motor unit potentials in the animals treated. Histological

studies demonstrated a significant reduction of the fibrotic areas present in the skeletal muscles. Analysis of mRNA expression from muscles of treated mice showed a reduction in *Col1a1*, *Col3a1*, *Tgfb1*, and *Pdgfa*. Western blot showed a reduction in the expression of collagen I in skeletal muscles. In conclusion, we observed that nintedanib slowed down the process of muscle fibrosis in a murine model of dystrophinopathy after 1 month of treatment, suggesting its potential role as a therapeutic agent in DMD patients.

RESUMEN

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es un tipo de distrofia muscular de origen genético que se caracteriza por una degeneración muscular a causa de la deficiencia de distrofina, una proteína estructural del sarcolema. Esta enfermedad es caracterizada por una debilidad muscular rápida y progresiva que aparece a los 5-7 años e involucra los músculos proximales y las extremidades inferiores. El corazón y el sistema respiratorio también están afectados, resultando ser las principales causas de muerte. Desafortunadamente, no existe un tratamiento efectivo descrito hasta la fecha que haya cambiado sustancialmente la historia natural de la enfermedad. Desde el punto de vista fisiopatológico, la pérdida de distrofina lleva a un daño del sarcolema, infiltrados de células inflamatorias y necrosis de fibras musculares reemplazados por tejido adiposo y fibroso. Muchos factores contribuyen a este proceso, pero las vías moleculares relacionadas a la regeneración y la degeneración muscular no son completamente conocidas. Los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) pertenecen a una familia de factores de crecimiento que regulan la proliferación, migración y diferenciación de células mesenquimales. Mientras que la isoforma PDGF-AA está asociada a fibrosis, el papel de la isoforma PDGF-BB en la regeneración muscular en humanos no ha sido estudiado.

Platelet-Derived Growth Factor BB Influences Muscle Regeneration in Duchenne Muscle Dystrophy

Patricia Piñol-Jurado MSc, Eduard Gallardo PhD, Noemi de Luna PhD, Xavier Suárez-Calvet PhD, Carles Sánchez-Riera PhD, Esther Fernández-Simón MSc, Clara Gomis MD, Isabel Illa MD PhD, and Jordi Díaz-Manera MD PhD.

En este estudio se estudió la expresión de PDGF-BB en muestras de biopsia muscular de controles y pacientes con DMD. Para ello, se realizaron experimentos *in vitro* para entender los efectos de PDGF-BB en mioblastos, los cuales están involucrados en la patofisiología de las distrofias musculares. Estos resultados se confirmaron *in vivo* mediante el tratamiento del modelo murino *mdx* de DMD con inyecciones intramusculares repetidas de PDGF-BB durante 1 mes. Como resultado, se observó que PDGF-BB estaba expresado en las fibras musculares necróticas y regenerativas en muestras de biopsias musculares de pacientes con DMD. *In vitro*, PDGF-BB activó la proliferación y migración de mioblastos. El análisis de muestras musculares de ratón de animales tratados con PDGF-BB mostró un incremento en la población de células satélite (SCs) y en el número de fibras regenerativas, con una reducción en los infiltrados inflamatorios, en comparación con los animales tratados con vehículo. Basado en estos resultados, sugerimos que PDGF-BB podría jugar un papel protector en las distrofias musculares al mejorar la regeneración muscular a través de la activación de la proliferación y migración de las células satélite.

Nintedanib decreases muscle fibrosis and improves muscle function in a murine model of dystrophinopathy

Patricia Piñol-Jurado MSc; Xavier Suárez-Calvet PhD; Esther Fernández MSc; Eduard Gallardo PhD; Natalia de la Oliva PhD; Anna Martínez-Muriana PhD; Pedro Gómez-

Gálvez MSc; Luis María Escudero PhD; Maria Pérez-Peiró MSc; Lutz Wollin PhD; Noemi de Luna PhD; Xavier Navarro PhD; Isabel Illa MD PhD, Jordi Díaz-Manera MD PhD.

Muchas terapias se han desarrollado para combatir el proceso fibrótico en distrofias musculares y otras enfermedades. En este trabajo se estudiaron los efectos de nintedanib, un triple inhibidor tirosina cinasa, en un modelo murino de DMD, el ratón *mdx*. Nintedanib redujo la proliferación y migración de fibroblastos humanos *in vitro* y disminuyó la expresión de genes fibróticos como *COL1A1*, *COL3A1*, *FN1*, *TGFB1* y *PDGFA*. Siete ratones *mdx* fueron tratados con 60 mg/kg/día con nintedanib durante 1 mes. Estudios electrofisiológicos mostraron un incremento en la amplitud de los potenciales de acción motora y un mejoramiento de la morfología de los potenciales de unidad motora en los animales tratados. Estudios histológicos demostraron una reducción significativa de las áreas fibróticas presentes en los músculos esqueléticos. El análisis de la expresión de mRNA de músculos de ratón tratado indicó una reducción en los genes de *Col1a1*, *Col3a1*, *Tgfb1* y *Pdgfa*. El western blot (WB) manifestó una reducción en la expresión de proteína del colágeno I en los músculos tratados. En conclusión, nosotros observamos que nintedanib ralentizó el proceso fibrótico muscular en un modelo murino de distrofinopatía después de 1 mes de tratamiento, sugiriendo su potencial papel como agente terapéutico en pacientes DMD.

1.INTRODUCCIÓN

1.1. EL MÚSCULO ESQUELÉTICO

Existen tres tipos de músculo según su función y características histológicas: estriado esquelético, estriado cardíaco y liso. El desarrollo del músculo se inicia en una etapa temprana de la embriogénesis, durante la gastrulación, y tienen su origen en el mesodermo, específicamente el músculo esquelético proviene del mesodermo paraxial somítico¹. El músculo esquelético es el tejido más abundante del cuerpo humano comprendiendo más del 40% de la masa de éste en un adulto joven y algo menos del 30% en adultos de edad avanzada. Está compuesto por fibras musculares, también llamadas miofibras, con propiedades contráctiles, entre otras, que le confieren al cuerpo la capacidad de moverse, mantener la postura y generar fuerza. Además, el músculo esquelético posee una gran habilidad para regenerarse².

1.1.1. ESTRUCTURA: LA FIBRA MUSCULAR Y LA MATRIZ EXTRACELULAR

Los músculos, además de estar constituidos por fibras musculares y una matriz extracelular (ECM), poseen vasos sanguíneos y fibras nerviosas embebidos en la ECM, ya que para una función correcta del músculo es necesario que las fibras reciban los nutrientes necesarios y desechen los residuos mediante la vascularización, y que cada fibra muscular esté en contacto con una terminación nerviosa que regule su actividad³.

1.1.1.1. La fibra muscular

Durante la embriogénesis los precursores musculares mononucleados llamados mioblastos, se fusionan y forman miotubos multinucleados con núcleos centrales, que son estructuras inmaduras que preceden a la fibra muscular⁴. A nivel postnatal, las fibras musculares son largas con un diámetro que oscila entre 10 y 100 nm, con núcleos postmitóticos dispuestos en la periferia de la fibra, cerca de la membrana plasmática (sarcolema). El sarcoplasma es el citoplasma de las fibras musculares el cual está compuesto por miofibrillas que se disponen paralelamente al eje longitudinal de las fibras⁵.

Las miofibrillas están formadas por filamentos de actina y miosina necesarios para la contracción, mientras que el sarcómero es la unidad funcional del músculo que se repite a lo largo del eje de una miofibrilla⁶. Además, el sarcoplasma contiene reservas de glucógeno, lípidos, lisosomas, mitocondrias y un complejo tubular intermiofibrilar conformado por retículo sarcoplásmico y un sistema tubular transverso (túbulo T) formado por invaginaciones de la membrana plasmática, permitiendo el paso de la señal nerviosa (potencial de acción) durante la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico necesario para la contracción, es decir, permite el acoplamiento entre excitación y contracción⁵ (Figura 1). La membrana plasmática está rodeada por una envoltura llamada lámina basal. Ambas estructuras están formados por múltiples proteínas que conectan el citoesqueleto del interior de las fibras con el espacio extracelular que le confieren estabilidad a la fibra, de manera que mutaciones en estas proteínas son la causa de diversas enfermedades musculares⁴.

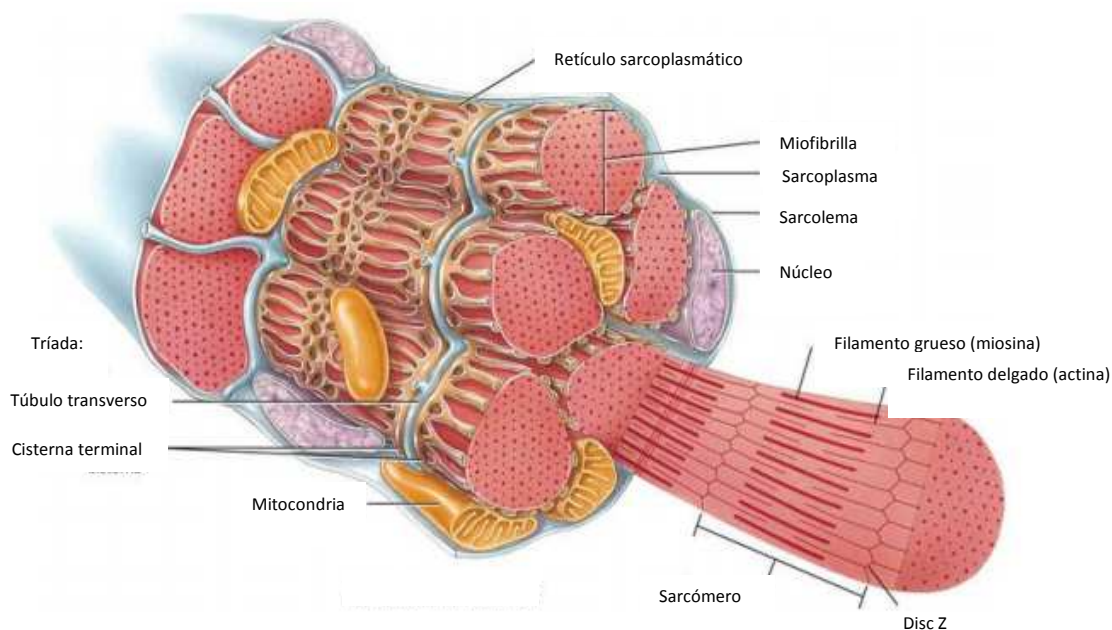


Figura 1. Estructura de la fibra muscular. Imagen modificada de Tortora et al. 2016⁷.

1.1.1.2. [La matriz extracelular](#)

Las fibras musculares se organizan en fascículos y un grupo de fascículos conforman el músculo completo, de tal manera que cada estructura queda envuelta por una capa de tejido conectivo compuesto principalmente por una ECM, cada una de ellas interconectada: el endomisio, perimisio y epimisio, los cuales rodean cada fibra muscular, cada fascículo y un músculo determinado completo, respectivamente (Figura 2)⁸.

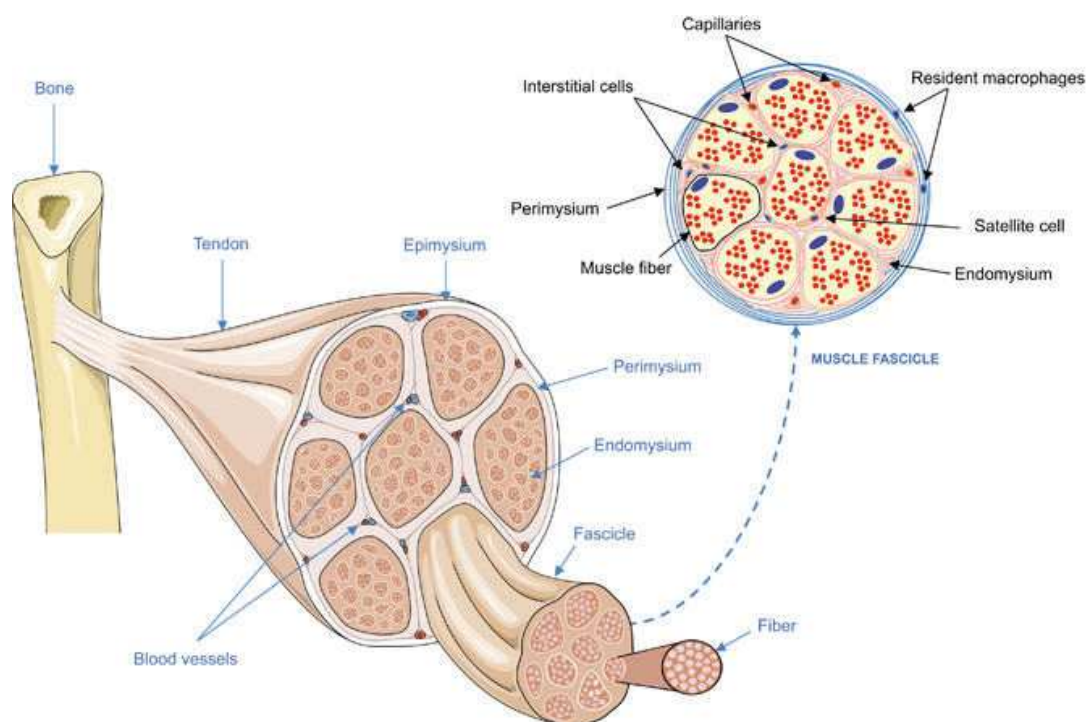


Figura 2. Estructura del músculo esquelético. Imagen obtenida de Dunn et al. 2018⁹.

La ECM contiene fibroblastos y macrófagos, además de los capilares y nervios (Figura 2). Respecto a su función, la ECM ajusta los ciclos de contracción-relajación debido a su flexibilidad, les confiere soporte a las fibras musculares y también tiene un papel en la regeneración muscular¹⁰.

Existen 4 tipos de proteínas que componen la ECM: colágenos, glicoproteínas no colagenosas, glicosaminoglicanos (GAGs) y proteoglicanos (PGs), sintetizados primordialmente por los fibroblastos. Los colágenos representan la fracción más grande de la ECM donde los colágenos de tipo I, III, V y XI son fibrilares capaces de formar

fibrilas. Entre ellos, el colágeno I es el principal tipo de colágeno del músculo, ejerciendo propiedades biomecánicas (Tabla 1). El colágeno VI, por otro lado, es una proteína microfibrilar que forma un entramado de filamentos finos¹¹.

	Endomisio	Perimisio	Epimisio
Nivel	Rodea cada fibra	Rodea cada grupo de fibras (fascículo)	Rodea cada músculo
Función	<ul style="list-style-type: none"> - Mantiene la integridad muscular - Transmite tensión entre las fibras - Contiene vasos sanguíneos de pequeño diámetro 	<ul style="list-style-type: none"> - Transmite la fuerza desde las fibras musculares a los tendones - Contiene vasos sanguíneos más grandes y nervios 	<ul style="list-style-type: none"> - Es continuo a los tendones y conecta músculos con huesos - Da acceso a los vasos sanguíneos principales y nervios que irrigan el músculo
Composición mayoritaria	Colágeno tipo I, III, IV, V y VI	Colágeno tipo I y III	Colágeno tipo I

Tabla1. Componentes de la ECM del músculo esquelético. Tabla modificada de Mahdy et al. 2018³.

El endomisio o membrana basal está compuesto por la lámina basal, adyacente al sarcolema como se ha comentado anteriormente, y por una lámina reticular exterior. La lámina basal está formada principalmente por colágeno IV, pero también se pueden encontrar otras moléculas como laminina, entactina, fibronectina, perlecan y otros PGs, siendo la fibronectina y la laminina los más abundantes junto al colágeno IV^{9, 12}. Las fibras reticulares de la lámina reticular, por otro lado, están compuestas por diferentes tipos de colágenos entre los que se encuentra el colágeno I, III, V, VI, IX y XI, PGs como decorina y versicano, y el GAG ácido hialurónico; de ellos destacan los colágenos I, III y VI⁹ (Figura 3). Esta clasificación es tema de debate actualmente².

Las metaloproteasas de la matriz (MMPs) y los inhibidores de metaloproteasas de la matriz (TIMPs) juegan un papel importante en la regulación de la degradación de la ECM,

ya que las MMPs son enzimas que degradan los componentes de la ECM cuando es necesario y los TIMPs la inhiben¹³.

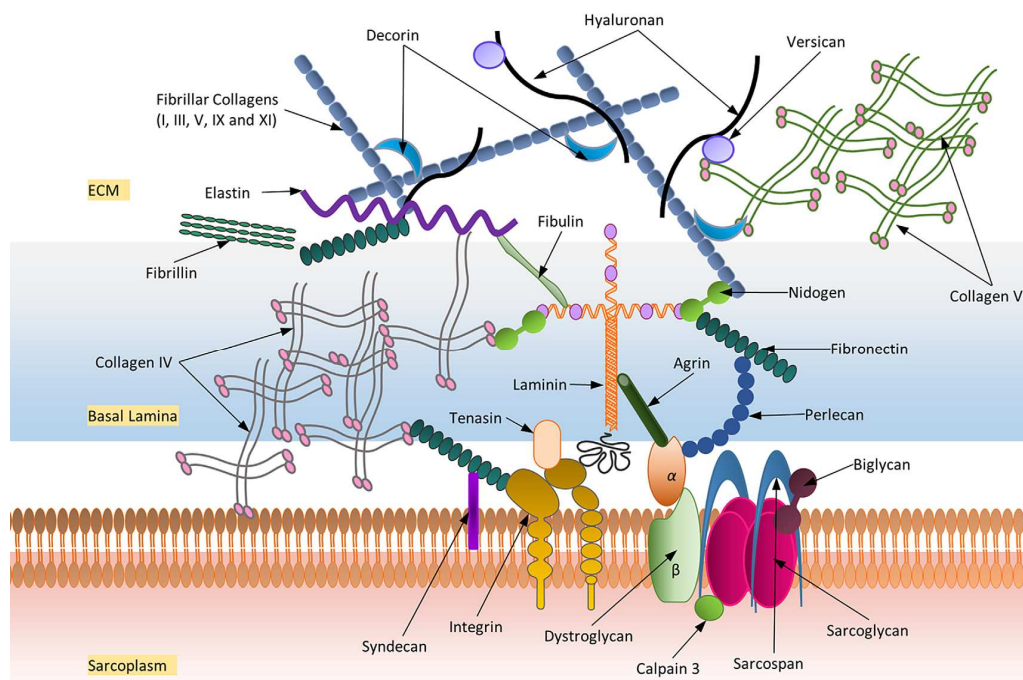


Figura 3. Componentes de la ECM del endomisio. Imagen extraída de Mukund et al. 2019².

1.1.2. LA REGENERACIÓN MUSCULAR

Las células satélite (SCs) son las células madre encargadas de llevar a cabo la regeneración tras un daño muscular y también contribuyen al crecimiento muscular postnatal. En el último caso el número de fibras no aumenta, sino que las fibras aumentan su diámetro al incrementar el número de miofibrillas y el número de núcleos¹².

Las SCs fueron descritas por primera vez por Alexander Mauro y Bernard Katz en 1961, quienes observaron que estas células mononucleadas se encontraban situadas entre la lámina basal y el sarcolema de la fibra muscular¹⁴ (Figura 2 y 4).

En el caso de la regeneración, las SCs, que en condiciones normales son mitóticamente inactivas, se activan en respuesta a estímulos como estrés inducido por trauma, empiezan

a proliferar y a diferenciar, y posteriormente o bien se fusionan con las células dañadas o bien producen nuevas fibras. Durante este proceso en el que pasan de ser células quiescentes a constituir fibras musculares maduras, las SCs son referidas en conjunto como progenitores miogénicos (MPs) o mioblastos que pueden ser identificados utilizando diferentes marcadores moleculares¹⁵ (Figura 4). Otros precursores con potencial miogénico de diferente origen están posiblemente involucrados en la regeneración muscular en alguna medida (ver sección 1.5.2. Terapia celular), pero la célula protagonista de la regeneración muscular son las SCs.

Las SCs se activan a mioblasto o MP en respuesta al daño. Una vez activadas pueden replicarse a sí mismas y volver al estado de quiescencia para mantener el *pool* de SCs y también pueden generar una progenie funcional que se expandirá y diferenciará durante la regeneración mediante. Esta función es típica de las células madre ya que tienen la capacidad de dividirse asimétricamente. Durante el proceso, las SCs mantienen el factor de transcripción *paired box 7* (*Pax7*) como marcador hasta antes de su diferenciación terminal, donde *Pax7* es regulado negativamente y se expresan otros factores, como el factor de transcripción miogenina y la proteína 1 de diferenciación miogénica (*MyoD*)¹⁶ (Figura 4).

La comunicación de las SCs con el entorno hace que éstas se activen y proliferen. El entorno puede referirse a la fibra muscular dañada, la ECM (los componentes de la lámina basal pueden interactuar físicamente con las SCs y transmitir señales), las células inflamatorias y los fibroblastos. Por ejemplo, distintos factores de crecimiento originados en las propias SCs, fibras, células intersticiales, o en suero como son el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento insulínico (IGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y distintas glicoproteínas Wnt contribuyen a este proceso¹².

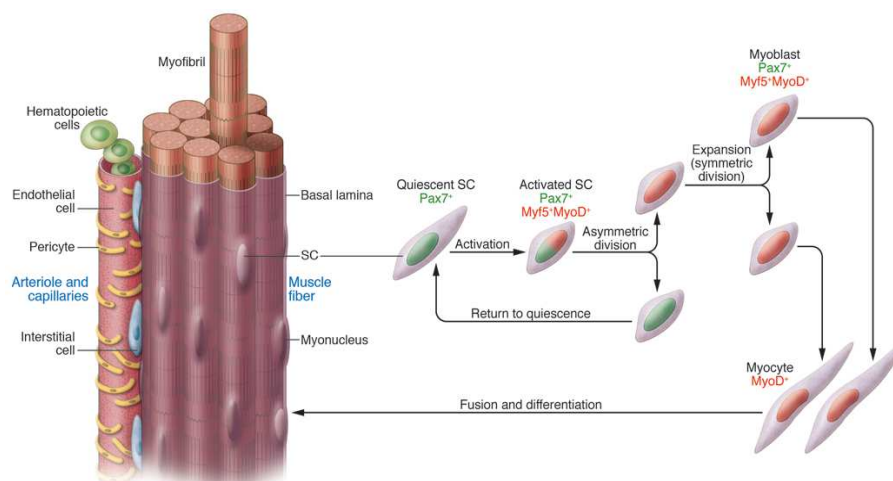


Figura 4. Activación, proliferación y diferenciación de las SCs. Imagen extraída de Tedesco FS et al. 2010¹⁶.

Después de un daño agudo, la reparación normal del músculo empieza con la eliminación de las fibras dañadas o muertas mediante células inflamatorias y después las SCs reparan el tejido¹⁷. Entrando en detalle, las SCs activadas liberan factores quimiotácticos para atraer a los neutrófilos, que son los primeros en llegar al músculo dañado y generar citocinas quimioatrayentes para atraer monocitos y macrófagos¹⁸ (Figura 5), aunque el mecanismo molecular exacto por el que las células inflamatorias van a la zona dañada es un tema de estudio en la actualidad. Los macrófagos parecen jugar un papel importante en la correcta regeneración muscular, según la naturaleza, duración e intensidad de la respuesta inflamatoria, la cual se solapa con un aumento temporal de la ECM¹⁹. Existe una población heterogénea de macrófagos que juegan papeles opuestos: en estadios tempranos del daño, los macrófagos pro-inflamatorios (M1) producen niveles altos de citocinas pro-inflamatorias, tal como el factor de necrosis tumoral α (TNF α), interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6). Diversos estudios han asociado a los macrófagos M1 a la activación y proliferación de SCs, a la fagocitosis de las fibras dañadas (Figura 5) y también a la proliferación de fibroblastos residentes²⁰; más tarde en el proceso de regeneración, se observa un cambio de macrófagos M1 a macrófagos anti-inflamatorios (M2), los cuales secretan citocinas anti-inflamatorias, como el factor de crecimiento transformante β 1 (TGF β 1), el cual activa a los fibroblastos a un fenotipo de miofibroblasto

(fibroblasto diferenciado) e induce la diferenciación de las células progenitoras fibroadipogénicas (FAPs), descubiertas en 2010, a fibroblasto o miofibroblasto²¹, así como estimula la producción de proteínas de la ECM por parte de estas células, como los colágenos fibrosos tipo I y III, y los colágenos IV y VI presentes en la lámina basal, de forma controlada²². Este aumento de la ECM está relacionado a una correcta diferenciación del mioblasto²³, además de actuar como soporte para fibras durante el proceso²⁴. Esta fase orquestada por los macrófagos M2 también está relacionada con la supresión de la respuesta inflamatoria y la diferenciación de mioblastos a miotubos maduros por mediación de IL-10, IL-4 e IL-13, citocinas segregadas por los linfocitos T que favorecen la activación de los macrófagos M2^{24, 25} (Figura 5).

Las FAPs, que proliferan durante el proceso de reparación, también ayudan a los mioblastos a diferenciarse y a reparar el músculo correctamente, al expresar diferentes factores miogénicos, como IL-6²⁶. Finalmente, la ECM se degrada hasta llegar a los niveles iniciales por acción de las MMPs²⁷ y la población de FAPs y fibroblastos también disminuye, en parte debido a las señales apoptóticas de TNF α ²⁸, generando un músculo totalmente reparado.

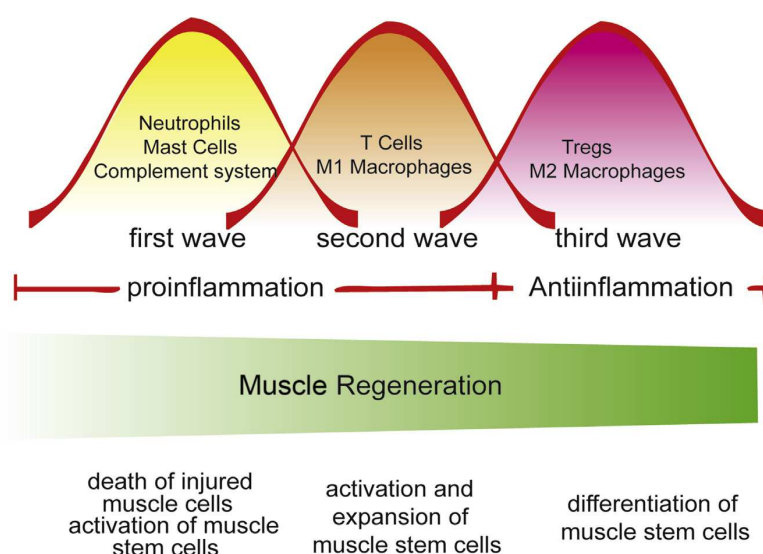


Figura 5. Papel de la inflamación en la regeneración muscular. Imagen extraída de Yang W et al. 2018²⁹.

1.2. LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

1.2.1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad neuromuscular genética caracterizada por una atrofia muscular que causa una debilidad muscular progresiva en niños, como consecuencia de la degeneración de los músculos esqueléticos provocando la pérdida de deambulación típicamente antes de los 13 años, aunque los músculos lisos y cardíacos también están afectados³⁰. La muerte se da por problemas respiratorios o cardíacos entre la segunda y tercera década de vida³¹. La DMD se engloba dentro de las distrofias musculares, que son un grupo de enfermedades asociadas a mutaciones en los genes que codifican para proteínas implicadas en la estabilización estructural y funcional de la fibra muscular, generando, como en el caso de la DMD, una atrofia y debilidad muscular en distintos músculos. La severidad, aparición y desarrollo de la enfermedad depende del tipo de mutación³². A nivel histopatológico, una distrofia muscular se describe por una combinación de regeneración y necrosis, asociado a un aumento del tejido conectivo intersticial, que va variando según la etapa de evolución de la enfermedad, lo que hace que se diferencien de otras miopatías no distróficas, como las miopatías metabólicas, congénitas o inflamatorias³³. Más en detalle, tras una tinción del tejido con hematoxilina y eosina se pueden apreciar los siguientes cambios distróficos: apariencia redondeada y variación del tamaño de las fibras, con fibras hipertróficas y atróficas, necrosis con la consiguiente pérdida de la fibra y sustitución posterior por tejido adiposo y fibroso, fibras pálidas (necróticas), incremento del número de núcleos centrales, fibras regenerantes con núcleos centrales más grandes, fibras hipercontracturadas, incremento del tejido conectivo en el perimisio y endomisio, y a veces inflamación intersticial (cuando la degeneración es rápida)³⁴ (Figura 6).

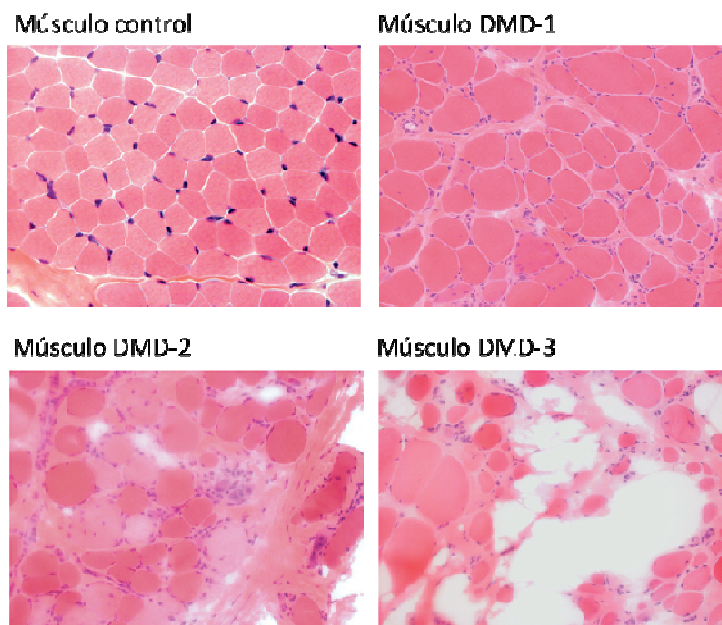


Figura 6. Comparación de secciones transversales teñidas con eosina-hematoxilina de músculo control y músculo distrófico de 3 pacientes con DMD con diferente grado de severidad. Imágenes modificadas de WB Saunders Co³⁴.

Otro signo patológico es un aumento elevado de la proteína creatina cinasa (CK) y de las alanina y aspartato transaminasas (ALT y AST, respectivamente) en suero, como resultado de la necrosis o rotura de las fibras, excepto en estados avanzados cuando la pérdida de deambulación se presenta³⁴.

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) junto con la distrofia muscular de Becker (BMD) forma el grupo de las distrofinopatías, que presentan una pérdida total o casi total (DMD) o una pérdida parcial de la proteína distrofina (BMD), por mutaciones en el gen del mismo nombre encontrado en la posición 21 del brazo corto del cromosoma X (xp21), por lo que principalmente sólo afecta a varones (en el caso de DMD la incidencia es de 1 de cada 3500-6000 nacimientos)³⁵, aunque también se han observado algunas mujeres portadoras sintomáticas. Un tercio de los casos puede deberse a nuevas mutaciones y no a una herencia ligada al cromosoma X³⁶. El gen de la distrofina es uno de los más grandes del genoma con 79 exones (lo que equivale a 14 kilobases (Kb) de ácido ribonucleico mensajero (mRNA)) pudiendo sufrir deleciones, inserciones y mutaciones puntuales³⁷. Alrededor del 70-80% de las mutaciones corresponden a deleciones e inserciones, entre

éstas el 60% son grandes deleciones, y el resto son mutaciones puntuales³⁸. En la DMD, las deleciones/inserciones están asociadas a un cambio del marco de lectura y las mutaciones puntuales suelen ser sin sentido o que implican una alteración en el *splicing* del exón, en todos los casos, esto ocasiona una proteína truncada que es degradada rápidamente. Existen zonas denominadas puntos calientes donde las deleciones ocurren con mayor frecuencia, una de ellas se encuentra entre los exones 44 y 52 y otra en la región N-terminal³⁹.

1.2.2. LA DISTROFINA Y FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

La distrofina es una proteína subsarcolemal descubierta en 1987 que forma parte del complejo de distrofina-glicoproteína (DGC). Estas glicoproteínas son transmembrana o bien se encuentran cercanas al sarcolema por la parte extracelular o citoplasmática y se compone de distroglicanos, sarcoglicanos, distrobrevina, sintrofinas, entre otras. El DGC tiene una función mecánica al mantener la integridad estructural del músculo y también tiene una función no mecánica al actuar como estructura para la señalización de diferentes vías tanto en músculo como en otros tejidos, como por ejemplo en cerebro⁴⁰.

El gen posee promotores internos que dan lugar a isoformas más cortas de la proteína encontradas en otros tejidos. La isoforma larga, Dp427, se encuentra en el músculo esquelético y su alteración es la responsable de DMD o BMD, mientras que las otras isoformas incluyen Dp260, Dp140, Dp116 y Dp71⁴¹.

En su función mecánica del músculo la distrofina sirve de anclaje entre el aparato contráctil del citoesqueleto y la ECM, al interactuar con el citoesqueleto, las glicoproteínas del DGC – que se unen a la laminina de la ECM - y el sarcolema. La distrofina normal posee 4 dominios: el N-terminal, que interactúa con la actina del citoesqueleto; un largo dominio central o *rod domain*, que constituye gran parte de la proteína y contiene secuencias de unión a filamentos de actina y a microtúbulos; un dominio rico en cisteína, que participa en la unión al β -distroglicano; y el extremo C-

terminal, también involucrado en la unión al sarcolema, junto al dominio rico en cisteínas y parte del dominio central, mediante la unión a distrobrevina y sintrofinas⁴². La distrofina también se expresa en la unión neuromuscular y en la miotendinosa⁴³ (Figura 7).

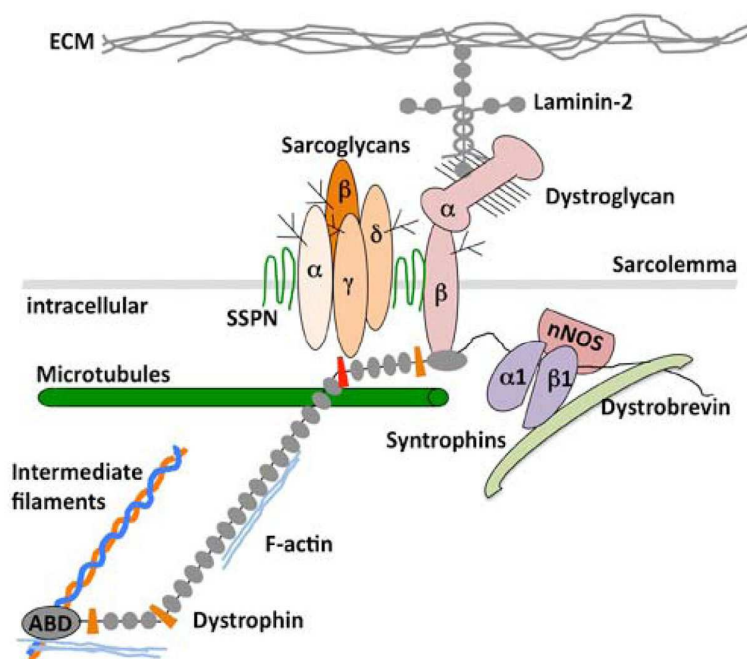


Figura 7. El complejo distrofina-glicoproteína. Imagen extraída de Gao Q et al. 2015⁴².

Por lo tanto, la ausencia de distrofina causa una deslocalización del complejo y el papel protector del DGC frente al estrés o daño producido en el sarcolema durante la contracción muscular se pierde⁴⁴. La entrada de calcio en condiciones fisiológicas está muy bien controlada y el influjo hacia el citosol sólo ocurre durante la contracción muscular, sin embargo, la falta de distrofina crea roturas en el sarcolema durante la contracción y se genera una entrada anormal de calcio al interior de la célula⁴⁵. La persistencia de calcio en el citosol provoca por un lado la activación de la proteasa calpaína involucrada en la necrosis celular y por otro la disfunción de la mitocondria y la consecuente producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que la mitocondria recoge el calcio del citosol, se hincha, pierde la membrana interna y se produce el estrés oxidativo⁴⁶. ROS tiene distintos papeles en la DMD: puede provocar un daño en el sarcolema y conducir a necrosis o apoptosis, a su vez esto también activa a las células

satélite para llevar a cabo la regeneración⁴⁷; activa canales de calcio contribuyendo a la entrada de calcio al citosol⁴⁸; y activa de forma crónica al factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB) que también puede ser activado por IL-1, IL-6, TNF α , es decir por citocinas inflamatorias secretadas por células inflamatorias reclutadas o residentes. NF-kB también está activado en macrófagos del músculo distrófico y está involucrado en la transcripción de diferentes citocinas, sobre todo pro-inflamatorias, como TNF α , involucrado en la necrosis de la fibra muscular, por lo tanto, NF-kB resulta clave en la modulación de la inflamación^{49, 50}.

Además, se ha demostrado que las SCs también expresan distrofina, y la pérdida de ésta podría alterar la capacidad regenerativa en la DMD en estas células⁵¹.

1.2.2.1. Degeneración. Inflamación y fibrosis

En el caso de la DMD (o un daño muscular crónico), las fibras musculares son susceptibles a una degeneración a causa del defecto molecular que las lleva a repetir ciclos de regeneración y degeneración, lo que conlleva al establecimiento de una respuesta inflamatoria crónica⁵² y a una fibrosis irreversible debido a la producción excesiva de proteínas de la ECM del endomisio y el perimisio, principalmente de colágeno I y colágeno III, y fibronectina en la lámina basal, lo que provoca una disfunción muscular⁵³. El proceso de degeneración no sólo causa un aumento de la ECM (Figura 8) sino que también disminuye la nutrición de las fibras y el agotamiento de las SCs⁵⁴.

La fibrosis, además de ser una característica de las distrofias musculares, también se puede encontrar en daños severos, como en laceraciones o contusiones⁵⁵.

El mecanismo molecular por el cual tiene lugar la degeneración no está completamente esclarecido, pero es conocido que la fibrosis está estrechamente ligada con la respuesta inflamatoria crónica, de modo que poder entender estos mecanismos es importante para poder combatir la fibrosis²⁴.

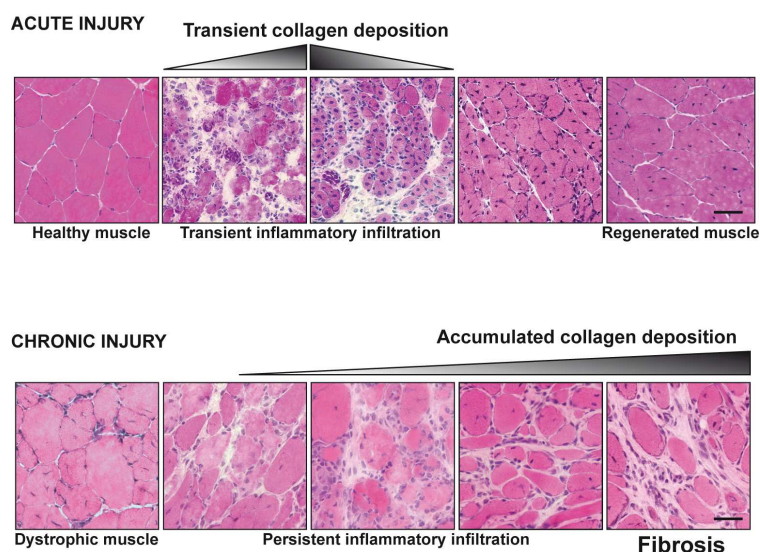


Figura 8. Deposición de la ECM durante la regeneración muscular en un modelo murino de daño agudo y crónico (*mdx*).

Imagen modificada de Mann et al. 2011²⁴.

En los últimos años se ha estudiado ampliamente el papel de los macrófagos M1 y M2, así como las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias respecto a la generación de fibrosis en las distrofias musculares^{24, 51}. Los últimos estudios apuntan a que el equilibrio entre macrófagos M1 y M2, y más específicamente el balance entre TNF α y TGF β , así como una respuesta secuencial de macrófagos (M1 y posteriormente M2) son aspectos cruciales para la correcta regeneración, por lo tanto, el microambiente actuaría como modulador de la respuesta inflamatoria^{24, 51}. Tras un daño agudo el número de macrófagos M2 decrece al completar el proceso de reparación, sin embargo, en un ambiente distrófico, como el que se produce en el modelo murino de distrofia muscular (ratón *mdx*) el número de macrófagos M2 aumenta con la edad⁵⁶. La persistente presencia de estos macrófagos modifica el microambiente al producir grandes cantidades de TGF β , llevando a un reemplazo progresivo de músculo por tejido fibrótico y adiposo como resultado final, pues como se ha comentado en el apartado 1.1.2 (regeneración fisiológica del músculo), TGF β está implicado en la producción de la ECM mediante activación de los fibroblastos y diferenciación de las FAPs. Además, en el músculo distrófico la ECM no se degrada, ya que TGF β también decrece la producción de MMPs, por el contrario, es sintetizada

persistentemente por la continua estimulación con $TGF\beta^2$ (Figura 9). También se ha reportado que este desequilibrio con $TNF\alpha$ produciría una inhibición de la apoptosis de los FAPs, a diferencia de la correcta regeneración del músculo donde los FAPs regresan a niveles normales⁵⁷.

La vía de señalización canónica estimulada por $TGF\beta$ es mediante la fosforilación y activación de *Mothers Against Decapentaplegic Homolog 2 y 3* (Smad2 y Smad3) actuando como factor de transcripción en conjunción con Smad4, pero otras vías pueden estar involucradas⁵⁸. $TGF\beta$ además de ser expresado por macrófagos M2 puede ser expresado por células mesenquimales, como FAPs y fibroblastos, así como células miogénicas⁵⁹.

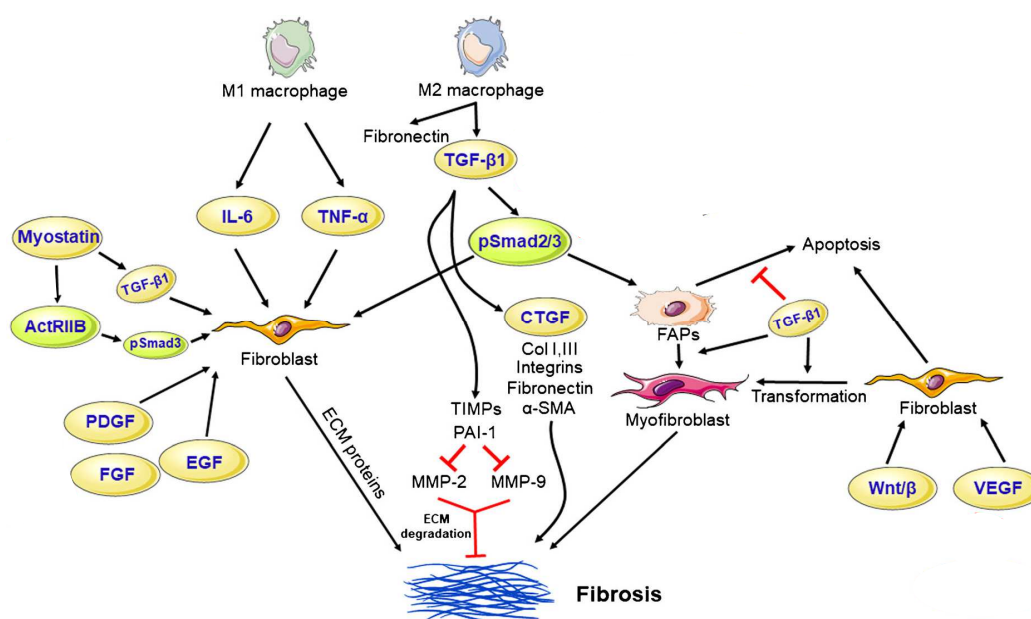


Figura 9. Factores pro-fibróticos en la degeneración muscular. Imagen modificada de Mahdy et al. 2018³.

Además de $TGF\beta$ otros factores de crecimiento y citocinas pro-fibróticos pueden estar involucrados en el proceso de fibrosis (Figura 9), así como en el proceso normal de reparación muscular, aunque en este último caso de forma regulada. Por ejemplo, IL-13 es una citocina derivada de linfocitos T colaboradores 2 (Th2) que activa macrófagos M2a (reconocidos por expresar CD206) de forma importante en el músculo distrófico. Además, IL-13 junto $TGF\beta$ induce la expresión de arginasa I en estos macrófagos, la cual es

responsable de la iniciación de la síntesis de colágeno en fibroblastos, al ser el responsable de la producción del aminoácido prolina necesario para la síntesis de colágeno⁶⁰. IL-10, citocina secretada por célula Th2, también está involucrada en la activación de un subtipo de macrófagos M2 llamados M2c que participan en el proceso de fibrosis al producir arginasa I⁶¹. Otra molécula es la fibrina, una proteína que se encuentra en el torrente sanguíneo y que extravasa a los tejidos inflamados. En el músculo distrófico, la fibrina activa a los macrófagos M1 (y la producción de citocinas pro-inflamatorias), cuya persistencia promueve la inflamación crónica y también incrementa la expresión de TGF β bajo estimulación de IL-1 β en estos macrófagos contribuyendo a la activación de macrófagos M2 productores de arginasa; y además su precursor, el fibrinógeno, activa a fibroblastos por unión al receptor $\alpha\beta$ 3 y promueve directamente la producción de colágeno. En este sentido la activación de la enzima que degrada la fibrina, el plasminógeno, y sus inhibidores (sistema de activación de plasminógeno) juegan también un papel importante en el desarrollo de la fibrosis⁶². Otro factor de crecimiento que contribuye en la fibrosis es el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), cuya expresión es inducida por TGF β en fibroblastos⁶³, aunque otras moléculas también pueden regular su expresión como HGF, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), entre otros⁶⁴. Una de las características de CTGF es que es un inductor de la producción de la ECM en varias enfermedades pro-fibróticas y durante el normal desarrollo, y está sobreexpresado en el músculo de pacientes con DMD y en el ratón *mdx*, pudiendo replicar o amplificar los efectos de TGF β con relación a la fibrosis⁵¹. La miostatina es un inhibidor del músculo esquelético en desarrollo que pertenece a la familia de TGF β , la cual se ha reportado que puede estimular la expresión de TGF β , la producción de la ECM y la proliferación de fibroblastos³. VEGF es un factor angiogénico implicado en la neovascularización, y también se le ha atribuido a promover la producción de la ECM y la diferenciación de fibroblastos en un modelo murino de distrofia muscular⁶⁵, aunque no hay muchos estudios que corroboren esta afirmación. FGF, por otro lado,

induce proliferación de fibroblastos en distintos tejidos y la migración de miofibroblastos, y su inhibición se ha asociado con una reducción de la deposición de colágeno⁶⁶, además la expresión de FGFb es inducida por TGFβ en fibroblastos de pulmón⁶⁷. Otro factor de crecimiento con efecto pro-fibrótico que ha surgido en los últimos años es el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (ver apartado 1.3).

1.2.3. SÍNTOMAS CLÍNICOS

Los niños con DMD desde bien temprana edad suelen mostrar un desarrollo motor o global más lento al resto de niños y no suelen correr o saltar. La enfermedad avanza rápidamente y el niño empieza a caerse con frecuencia, le es difícil subir escaleras, camina “en forma de pato” y puede presentar hipertrofia de las pantorrillas hasta que pierde la deambulación hacia los 10 años de media. Muestra un patrón de debilidad de cinturas escapular y pélvica típico de las distrofinopatías y las distrofias de cinturas (tipo de distrofia muscular debido a mutaciones de diferentes proteínas que conforman el DGC): primero muestran una afectación de la cintura pélvica y las extremidades inferiores, y posteriormente la cintura escapular y los miembros superiores. Tras perder la deambulación, se desarrolla una escoliosis progresiva y contracturas articulares⁶⁸.

Estos niños suelen tener problemas respiratorios al tener el diafragma afectado. Además, la escoliosis, está relacionada directamente con una disminución de la capacidad respiratoria⁶⁹.

Asimismo, los pacientes suelen mostrar signos de cardiopatía, definida como cualquier enfermedad del miocardio asociada con disfunción mecánica y/o eléctrica⁷⁰, pero a partir de los 18 años todos muestran una cardiopatía⁷¹ detectable por cambios electrocardiográficos (como taquicardia y arritmias sinusales), función sistólica y diastólica alteradas, acompañado por un incremento de fibrosis⁷². Con la ecocardiografía también pueden detectarse los hallazgos típicos de una miocardiopatía dilatada encontrada en la mayoría de los pacientes y que es originada por una fibrosis producida en la pared

posterobasal del ventrículo izquierdo que da lugar a una dilatación e hipertrofia de dicho ventrículo⁷³. Los síntomas se traducen en fatiga, disnea, dolor en el pecho y en estados tardíos pueden aparecer arritmias y fallos cardíacos ocasionando la muerte⁶⁸. La intensidad de la miocardiopatía no está directamente relacionada con la severidad del músculo esquelético⁷⁴.

Dos tercios de los pacientes muestran retraso cognitivo, con una pérdida promedio de 20 puntos de IQ en comparación a la población control, debido a que la distrofina posee diferentes isoformas que se expresan en el cerebro, y éstas pueden estar afectadas según la posición de la mutación⁶⁸.

1.2.4. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de DMD suele darse alrededor de los 5 años, aunque se puede diagnosticar mucho antes. Primero debe considerarse la sospecha del diagnóstico y ésta se basa en la exploración física, el historial familiar y los resultados de laboratorio de los niveles de CK, que a esa edad suele ser de 100 a 200 veces más elevado de lo normal. Dentro de las pruebas físicas se realiza la maniobra de Gowers que consiste en ponerse de pie desde el suelo: el niño DMD/BMD se ayudará con los brazos y se trepará a sí mismo, aunque este signo no es exclusivo de DMD/BMD⁷⁵.

Si la sospecha es positiva el siguiente paso es realizar el estudio molecular en muestra de sangre con el fin de detectar deleciones, inserciones o mutaciones puntuales utilizando diferentes técnicas. Primero se estudian deleciones y duplicaciones y si resulta negativa se secuencian el gen para buscar mutaciones puntuales o pequeñas deleciones o duplicaciones⁷⁶.

Si la prueba genética pone de manifiesto mutaciones en el gen DMD no es necesario realizar la biopsia muscular confirmatoria, por los problemas que conlleva al paciente. Si el paciente presenta elevación en los niveles de CK en suero y signos y síntomas de DMD

pero el test genético es negativo, entonces se realizará una biopsia muscular. Las pruebas clave que se hacen de la biopsia muscular para DMD son la inmunocitoquímica y el western blot (WB) de la distrofina, y deben ser interpretadas por un patólogo⁷⁷. Si las pruebas son positivas se debe de confirmar mediante pruebas de ADN para determinar el tipo de mutación⁷⁵.

Según el tipo de mutación encontrada en la prueba genética o bien la cantidad de distrofina encontrada en las pruebas de histopatología se determinará si el fenotipo es DMD o BMD.

1.2.5. TRATAMIENTO

Actualmente no existe un tratamiento eficaz para la cura de la DMD. El tratamiento es multidisciplinar y se encuentran implicados diferentes especialistas: neurólogos, rehabilitadores, ortopedistas, cardiólogos, neumólogos, nutricionistas, anestesistas, psicólogos y genetistas.

Como tratamiento farmacológico, los únicos que han demostrado ser eficaces son los glucocorticoides, al reducir la velocidad de deterioro en la fuerza muscular y en la función motora a corto plazo, 1 año para la función y 2 para la fuerza y, en consecuencia, los niños pueden mantener la deambulación por un tiempo más largo en comparación a los niños no tratados. Existen dos tipos de glucocorticoides aprobados para la DMD: prednisona y deflazacort, los cuales se cree que podrían actuar inhibiendo NF- κ B⁷⁸. Estos fármacos se evaluaron según diferentes pruebas funcionales, que consistieron en medir los tiempos en ponerse de pie, subir escaleras o caminar unos metros concretos⁷⁹. Además, los glucocorticoides pueden disminuir el riesgo de escoliosis y es aconsejable su uso aún tras perder la deambulación⁸⁰. Sin embargo, los efectos secundarios a largo plazo son considerables. Éstos incluyen ganancia de peso con apariencia cushingoide, riesgo de hipertensión, formación de cataratas, más riesgo de roturas en las caídas por pérdida de densidad ósea, afectación en el comportamiento de algunos pacientes, entre otros⁸¹. El

inicio del tratamiento debe comenzar cuando el retraso del desarrollo motor comienza a percibirse en el niño, normalmente entre los 5 y 7 años⁷⁵.

Las anomalías en la función ventricular del corazón mediante el estudio con electrocardiograma deben tratarse con el uso de inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (inhibidor ACE) como primera línea⁸². La cirugía puede estar indicada para corregir la escoliosis⁸³. El tratamiento con ventilación no invasiva para la mejora de la función respiratoria, junto a la operación de columna, ha ayudado a que la esperanza de vida de los pacientes con DMD se vea incrementada en los últimos años⁸⁴.

1.3. FACTORES DE CRECIMIENTO DERIVADOS DE PLAQUETAS Y SUS RECEPTORES

Los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGFs) se descubrieron a mediados de los años 70 basándose en la reducción del potencial mitogénico de suero preparado a partir de plasma libre de células ejercido en fibroblastos^{81, 85}, células musculares lisas⁸⁶ (SMCs) y células gliales⁸⁷ en cultivo en comparación al potencial mitogénico de suero procedente de sangre total, ya que el PDGF se encuentra en los gránulos- α de las plaquetas (de ahí su nombre) los cuales son desgranulados en el proceso de coagulación que tiene lugar durante el proceso de obtención de suero a partir de sangre total, liberándose diversos factores, entre ellos el PDGF en el suero resultante; en cambio en el plasma obtenido por plasmaféresis los gránulos- α no se desgranulan por los intermediarios de la coagulación al no producirse ésta⁸⁸. PDGF posteriormente fue purificado de plaquetas humanas, aunque más adelante se demostró que PDGF, además, era sintetizado por diferentes tipos celulares. Existen diferentes isoformas: PDGF-A y PDGF-B fueron los primeros en ser caracterizados en los años 80 y aproximadamente 15 años después se descubrieron PDGF-C y PDGF-D^{89, 90}.

1.3.1. ESTRUCTURA DE PDGF

Todos los subtipos de PDGF son dímeros de cadenas polipeptídicas unidas por un puente disulfuro. Junto a los VEGFs forman la familia PDGF/VEGF, que está estructural y funcionalmente relacionada⁹¹. Existen 4 tipos de cadenas de PDGF en mamíferos (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C y PDGF-D) codificadas por 4 genes que residen en los cromosomas 7, 22, 4 y 11 en humanos, respectivamente, dando lugar a 5 proteínas de PDGF biológicamente activas, ya que además de los 4 homodímeros, existe un heterodímero compuesto por una cadena de PDGF-A y otra de PDGF-B (PDGF-AB). Aún no se han descrito otros tipos de heterodímeros.

Todos los miembros comparten un dominio “core” de factor de crecimiento que contiene un grupo de 8 residuos de cisteína muy conservado. Este dominio es necesario para la unión al receptor y su activación, así como también para la unión entre las cadenas de PDGF, otorgándole una gran estabilidad⁹².

Las cuatro cadenas de PDGFs son sintetizadas y ensambladas como dímeros en el retículo endoplasmático como precursores inactivos que posteriormente serán procesados para su activación. La forma madura de PDGF corresponde básicamente al dominio de factor de crecimiento y se compone de aproximadamente 100 aminoácidos en todos los casos. Evolutivamente, este dominio está muy conservado en la familia PDGF/VEGF de distintos organismos, vertebrados e invertebrados⁹³. PDGF-A mantiene una gran homología, alrededor del 50%, con PDGF-B. Así mismo, PDGF-C presenta el mismo grado de homología respecto a PDGF-D, indicando que estos dos pares de PDGFs surgieron por duplicación de un gen antecesor durante la evolución dando lugar a dos genes ancestrales de PDGF que más tarde se volvieron a duplicar dando lugar a PDGF-A y PDGF-B, por un lado, y PDGF-C y PDGF-D, por otro. En consecuencia con esto, las estructuras de las secuencias genómicas que codifican para PDGF-A y PDGF-B también son diferentes respecto a PDGF-C y PDGF-D, pero el número y tamaño de exones

involucrados en el dominio core de factor de crecimiento está muy conservado entre las 4 cadenas de PDGF.

PDGF-A, que es sintetizado como un polipéptido de 211 aminoácidos (o de 196 en el caso de sufrir *splicing* alternativo según el tipo celular), y PDGF-B, compuesto por 241 aminoácidos, son procesados intracelular y proteolíticamente por su extremo N-terminal con el fin de eliminar el propéptido que los mantiene inactivos, durante el proceso de exocitosis (Figura 10). Sin embargo, PDGF-C y PDGF-D, de 345 y 370 aminoácidos de longitud, respectivamente, son secretados en una forma latente para luego ser procesados por el extremo N-terminal del dominio de factor de crecimiento por proteasas extracelulares, como el activador tisular del plasminógeno (tPA), el activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA), plasmina y matriptasa^{91, 94}, liberando la molécula de PDGF madura del dominio CUB presente en el extremo N-terminal. Este dominio novel está involucrado en la unión proteína-proteína o proteína-carbohidrato en la ECM, una vez PDGF-C o PDGF-D son secretados. Por lo tanto, la función principal del dominio CUB es impedir la unión y activación del receptor al bloquear estéricamente la secuencia de unión al receptor del dominio de factor de crecimiento del PDGF hasta que actúen las proteasas extracelulares. Se puede dar un procesamiento parcial liberando el dominio CUB de una sola cadena (hemi-dímero), esto dará lugar a la unión del receptor como un ligando monovalente actuando como un antagonista de baja afinidad, ya que la posterior dimerización del receptor no tendrá lugar.

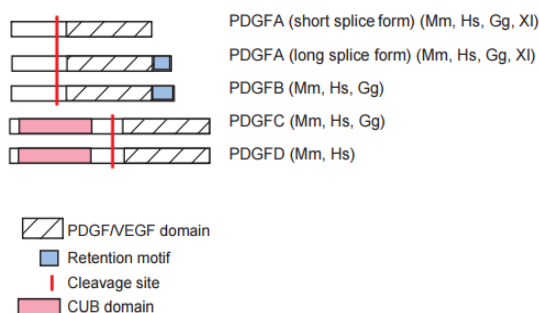


Figura 10. Estructura de los ligandos PDGF. Hoch RV et al. 2003⁹⁵.

El proceso de secreción de los PDGFs no está regulado y éstos parecen ser secretados constitutivamente, pero la ECM sí juega un papel importante en la regulación de la difusión de los diferentes PDGFs en el tejido. PDGF-B y uno de los 2 transcritos de PDGF-A poseen en su extremo C-terminal un motivo rico en aminoácidos básicos llamado motivo de retención que favorece la unión de PDGF con los componentes de la ECM. Este motivo puede ser eliminado en el caso de PDGF-B por proteasas en el interior de la célula o en el espacio extracelular mientras que en el caso de PDGF-A este motivo es eliminado en el espacio extracelular. Con lo cual, nos encontramos con diferentes situaciones: el transcrito de PDGF-A activo sin el motivo de retención y PDGF-B activo con el motivo de retención eliminado intracelularmente que podrán difundir una vez secretados, el transcrito de PDGF-A con el motivo de retención y PDGF-B con este motivo sin procesar serán secretados en una forma activa pero retenidos en la ECM hasta que sean procesados, y PDGF-C y PDGF-D que son secretados de forma inactiva y que serán retenidos en la ECM mediante el dominio CUB, antes de ser procesados. Por lo tanto, la forma de PDGF-A más corta (sin el motivo de retención) y el dímero de PDGF-B secretado sin el motivo de retención tendrán una mayor capacidad de difusión a través del tejido y podrán ejercer su función biológica sobre células situadas a más distancia de la célula productora, mientras que las formas de PDGF-A y PDGF-B que pueden ser retenidas en el espacio extracelular podrán actuar en la propia célula o en células muy próximas⁹⁶. Los PDGFs se unen a varios tipos de colágenos⁹⁷, trombospondina⁹⁸, y BM-40/osteopontina/SPARC⁹⁹; sin embargo, el componente principal de la ECM involucrado en la retención de PDGF es el proteoglicano heparán sulfato (HSPG)¹⁰⁰.

PDGF no sólo interactúa con moléculas de la ECM sino que también lo hace con proteínas solubles, por ejemplo PDGF-B se une a macroglobulina- α 2¹⁰¹ regulando la cantidad de PDGF disponible para la interacción con los receptores. PDGF-BB y PDGF-AB también pueden unirse a SPARC (osteonectina) y adiponectina, las cuales pueden retener el factor de crecimiento en el espacio extracelular inhibiendo la unión a su

receptor⁹⁹. En ambos casos, las moléculas de PDGF retenidas son liberadas cuando disminuye el pH, como por ejemplos en lugares donde existe inflamación¹⁰².

1.3.2. LOS RECEPTORES PDGF Y SU UNIÓN AL LIGANDO

Las diferentes isoformas ejercen su efecto celular por unión y activación a dos receptores tirosina cinasa estructuralmente relacionados entre sí, denominados receptor PDGF- α (PDGFR α) y receptor PDGF- β (PDGFR β), cuyos genes residen en el cromosoma 4 y 5 en humanos y en el 5 y 18 en ratones, respectivamente. Ambos receptores son los típicos receptores tirosina cinasa (RTKs): son proteínas transmembrana que poseen un dominio extracelular de unión a ligando, en este caso compuesto de 5 dominios relacionados a inmunoglobulinas, y un dominio tirosina cinasa intracelular, que en la familia de receptores PDGF posee una secuencia específica¹⁰³⁻¹⁰⁵. El ligando dimérico es capaz de unirse a dos receptores monoméricos simultáneamente y por lo tanto provoca la dimerización del receptor, que da lugar a la yuxtaposición de la parte intracelular del receptor y permite la autofosforilación de los residuos tirosina en *trans* entre los dos receptores, iniciándose así la transducción de señal.

Dependiendo del tipo de ligando y del patrón de expresión de cada receptor se podrán formar diferentes dímeros (homodímeros de PDGFR α y PDGFR β y heterodímero formado por una combinación de éstos)^{96, 106}. Las 5 isoformas diméricas del ligando PDGF muestran distintas preferencias para unirse a los dos receptores (Figura 11). Las isoformas PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB y PDGF-CC pueden unir y activar el receptor PDGFR α , mientras que PDGF-BB y PDGF-DD pueden unir y activar específicamente PDGFR β . PDGF-AB, PDGF-BB y PDGF-CC, y PDGF-DD pueden también estimular el complejo heterodímero PDGFR α/β . La respuesta celular cuando un receptor es activado es normalmente indiferente a la isoforma de PDGF que lo activa¹⁰⁷. VEGF-A también se puede unir al receptor PDGF, pero sin lograr la dimerización de éste, por lo tanto, sin activarlo eficientemente¹⁰⁸.

La dimerización y activación del receptor también acelera la internalización y degradación del receptor, terminando así la señalización. La vida media del receptor en estado inactivo es más de dos horas, sin embargo, en los receptores activados es de sólo 5 y 30 min para PDGFR α y PDGFR β , respectivamente¹⁰⁹.

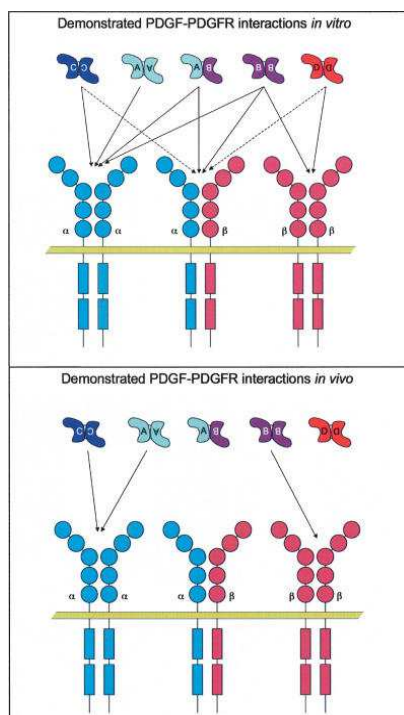


Figura 11. Especificidad de unión de las cinco isoformas de PDGF. Andrae J et al. 2008⁹⁶.

El receptor PDGFR α también se puede activar de una forma independiente a PDGF (activación indirecta). Los ligandos implicados son otras moléculas distintas a PDGF que se unen a su receptor específico y desencadenan una cascada de señalización intracelular que activan al receptor de PDGF monomérico¹⁰⁹. Esta activación es persistente dado que la internalización del receptor es más lenta en comparación a la activación clásica, dependiente de PDGF (activación directa) y además la activación indirecta induce un bucle de retroalimentación positiva promoviendo la activación del receptor PDGF incluso después de que la señal que activa al receptor no PDGF se haya agotado¹¹⁰.

El receptor PDGFR β , no obstante, no sufre este tipo de activación, pero algunas mutaciones en su receptor conducen a un mismo efecto, es decir, una activación continuada^{111, 112}.

El mecanismo de acción por el cual la activación indirecta es la predilecta sobre la directa es el siguiente: en la presencia de PDGF y moléculas no PDGF la activación clásica predomina sobre la indirecta, al dimerizarse el receptor. En cambio, en presencia de VEGF en altas concentraciones, éste favorece la activación indirecta del PDGFR α ya que actúa como un antagonista y deja más receptores monómeros libres necesarios para la activación indirecta¹¹³.

Este tipo de activación indirecta, así como la clásica, está implicada tanto en procesos patogénicos (vitreo-retinopatía proliferativa) como en fisiológicos (hipoxia)¹⁰⁸.

1.3.3. EXPRESIÓN DE PDGFs/PDGFRs

El patrón de expresión para cada molécula de PDGF en tejido a nivel de mRNA es único y está parcialmente solapado (Figura 12). En humanos, tanto el transcrito largo de PDGF-A como el corto son ampliamente expresados en muchos tejidos, pero su expresión destaca en corazón, páncreas y músculo esquelético. PDGF-B está expresado en la mayoría de los órganos analizados, con una predominancia en corazón y placenta. PDGF-C se expresa primordialmente en corazón, riñón y páncreas, y en menor medida en ovarios y hígado. La expresión PDGF-D en tejido es menor en comparación con los demás PDGFs pero detecta específicamente en corazón, páncreas y ovario¹¹⁴.

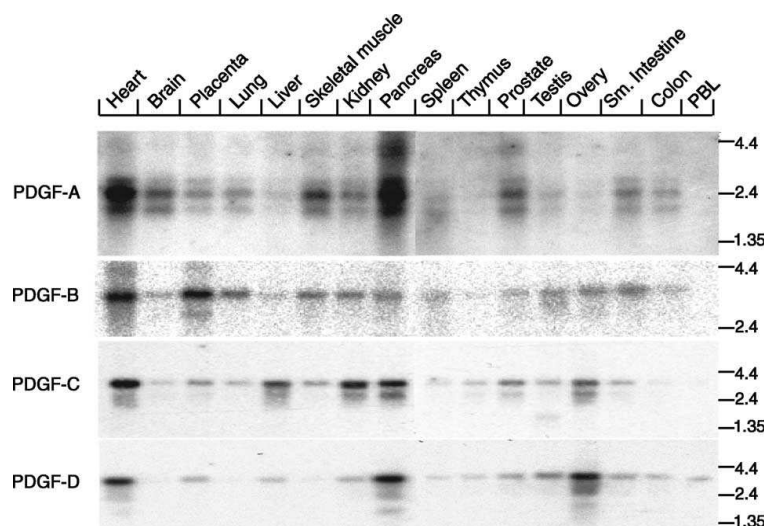


Figura 12. Análisis de la expresión de los cuatro tipos de mRNA mediante Northern Blot. Fredriksson et al. 2004⁹¹.

A nivel celular, en estudios de embriogénesis en ratón, se ha demostrado que mayoritariamente la expresión de las moléculas no coincide con la expresión de sus receptores, de manera que el modo de acción de los PDGFs es principalmente paracrino¹¹⁵⁻¹¹⁸.

La formación del heterodímero PDGF-AB no suele darse *in vivo*, excepto en plaquetas, donde PDGF-AB parece ser específico de humano¹¹⁹, aunque su función es desconocida¹²⁰. Esto significa que en las plaquetas se forman las tres combinaciones posibles entre PDGF-A y PDGF-B, mientras que en el resto de las células los patrones de expresión, en lo que respecta a PDGF-A y PDGF-B, no suelen solaparse y por ende la formación PDGF-AB no se observa⁹⁵. Por el contrario, *in vitro*, si se observa la producción de PDGF-AB en diferentes tipos celulares. Esto puede ser debido a diferentes estímulos externos como la hipoxia¹²¹, trombina¹²², interleucinas y factores de crecimiento (incluyendo los propios PDGF) que pueden aumentar los niveles de expresión de PDGF¹²³.

En cuanto a la expresión del receptor de PDGF, estos se expresan en células mesenquimales que expresan un solo tipo de receptor o los dos. Además, el nivel de

expresión no se da en una forma constante, sino que se puede ver alterado. Por ejemplo, en células del tejido conectivo el nivel de PDGFR β es bajo, pero puede aumentar durante la inflamación¹²⁴ o tras explantación a cultivo primario¹²⁵. Otros estímulos externos pueden modular el nivel de receptores en la superficie celular como FGFb¹²⁶, lipopolisacáridos¹²⁷, IL-1¹²⁸ y TNF¹²⁹ *in vitro*.

Por tanto, debido al bajo grado de solapamiento entre PDGF-A y PDGF-B y entre los propios receptores, la especificidad de unión al receptor se ve alterado en el modelo *in vivo* respecto al modelo *in vitro* (Figura 11).

1.3.4. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y RESPUESTA CELULAR

La autofosforilación del receptor lleva a un incremento de la actividad catalítica y a la formación de los sitios de acoplamiento para el sustrato del receptor a través de los dominios SH (Figura 13) que poseen dichos sustratos y que reconocen residuos de tirosina fosforilados. Estas moléculas pueden ser fosforiladas por el receptor y servir como efectores de la transducción de señal, como por ejemplo las fosfolipasa C- γ (PLC- γ), la proteína activadora GTPasa (GAP) que inactiva a Ras, la proteína cinasa de la familia Src, la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), la familia de factor de transcripción STAT y la proteína SHP-2 o bien servir como adaptadores y hacer de puente entre el receptor y una molécula efectora, como es la la proteína 2 unida a receptor de factor de crecimiento (Grb2) de la vía Ras/proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), el regulador de cinasa CT10 (crk), o la proteína adaptador de la región no catalítica de la tirosina cinasa 1 (Nck) y la proteína Shc. De esta forma se generan diversas vías de señalización, cada una de ellas puede dar lugar a diferentes respuestas celulares al generarse cambios en la transcripción génica (incluso un mismo efector puede activar diferentes sustratos *downstream* y desembocar en distintas vías de señalización), así como una misma respuesta celular puede estar desencadenada por más de una vía de señalización, es decir, una vía de señalización no se traduce a una única función celular¹⁰⁶.

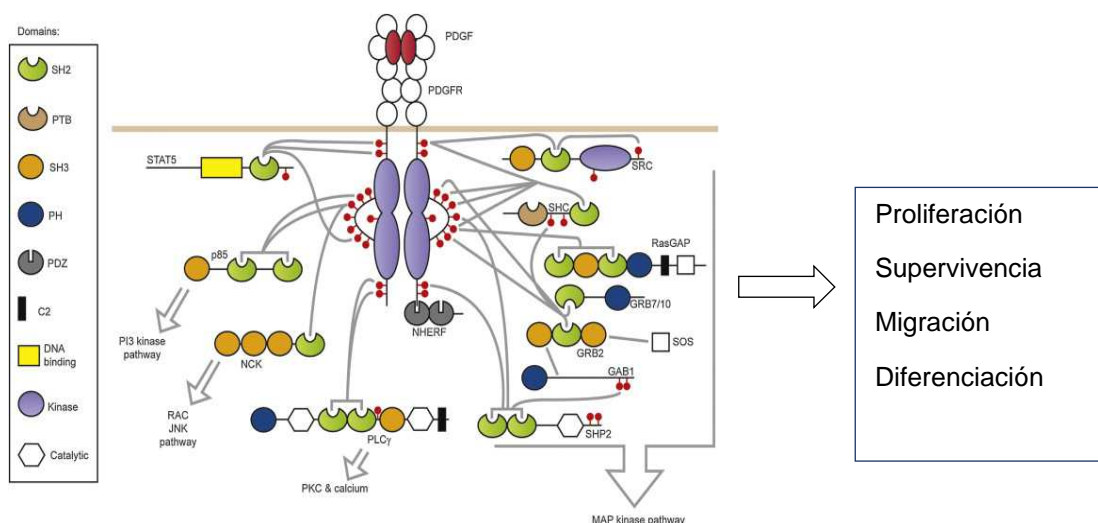


Figura 13. Vías de señalización del receptor PDGF. Imagen modificada de Demoulin et al. 2014¹³⁰.

Respecto a las respuestas celulares que se desencadenan, ambos, PDGFR α y PDGFR β transducen potentes señales mitogénicas generando una proliferación celular y también están implicados en quimiotaxis y diferenciación. Básicamente cada una de las vías de señalización, al menos las más estudiadas como son la vía PI3K-Akt, vía de las MAK cinasas y vía de la PKC, participan en todas las funciones celulares mencionadas¹³¹⁻¹³³. En el caso de STAT, éste está más asociado a PDGFR β y no se conoce demasiado su función¹³⁴. Las diferencias entre PDGFR α y PDGFR β vienen en las respuestas celulares inmediatas tras la activación génica: mientras que los dos receptores están involucrados en la reorganización de actina, estimulando la formación del *edge ruffling* (lamelipodio) y la pérdida de fibras de estrés (asociadas a la formación de adhesiones focales, esto es, la unión del citoesqueleto con la ECM mediante integrinas), sólo el receptor PDGFR β media la formación de estructuras de actina circular en la superficie dorsal de la célula (implicadas en motilidad celular)¹³⁵. Además de la reorganización de actina, la prevención de la apoptosis¹³⁶, la inhibición de las uniones gap o de hendidura entre células¹³⁷ y la entrada de calcio son otros de los efectos celulares inmediatos implicados en respuesta a la activación de los receptores PDGF. Respecto el receptor heterodímero no se conoce mucho acerca de la transducción de señal en la que participa.

Dado que se observa un alto grado de solapamiento de las vías de señalización que se desencadenan a través de los receptores PDGF β y PDGF α (y de otros receptores tirosina cinasa), así como de las respuestas celulares y de los genes de expresión inmediata temprana (IEGS)¹³⁸ generados en las diferentes vías de señalización, es más probable que la especificidad de la señalización para una determinada función biológica dependa de las diferencias cuantitativas en magnitud y de la duración de las respuestas a diferentes niveles de la señalización, así como de la expresión de los PDGFR según el tipo celular y su contexto⁹⁶.

Actualmente muchos estudios se focalizan en estudiar qué vía de señalización y qué combinación de ligando/receptor es responsable para una respuesta celular determinada en diferentes tipos celulares¹³⁹ ya que, como se ha mencionado anteriormente la misma respuesta celular puede ser señalizada por diferentes vías de señalización o por diferentes efectores de una misma vía, y la diferencia la hace el tipo celular y su entorno.

1.3.5. MODULACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN

La señalización de PDGF puede ser modulada positiva y negativamente.

Los receptores de PDGF pueden ser modulados por interacciones con otros receptores en la superficie celular, como serían las integrinas. La mayoría de las células PDGFR positivas poseen integrinas, que son receptores transmembrana para proteínas de la ECM. La unión integrina-ECM desencadena la formación de uniones focales de la célula con la ECM ya que la célula necesita de estas uniones para su crecimiento. La unión de los dos receptores mediante la transglutaminasa tisular (tTG) resulta en una mejor unión del ligando PDGF a su receptor, una mejor activación del receptor y una mejor señalización *downstream*¹⁴⁰.

Existen varias vías que modulan negativamente la señalización de los PDGFs. La internalización es una de ellas. Normalmente, la unión del ligando al receptor induce que

el complejo ligando-receptor sea internalizado por endocitosis y luego degradado tras fusionarse el endosoma con el lisosoma¹⁴¹, aunque a veces el complejo se disocia y el receptor se reutiliza. Además de la degradación en los lisosomas, los receptores también pueden sufrir degradación citoplasmática por proteasomas después de ubiquitinación¹⁴². Por otro lado, también existen fosfatasa con dominio SH2 como la proteína SHP-2 que inactiva el receptor al desfosforilar las tirosinas del dominio catalítico¹⁴³. El efector GAP, que sólo se une a PDGFR β , es un modulador negativo que inactiva a Ras, sin embargo, la activación de Ras dependerá de las señales inhibitoras y las señales estimuladoras que se dan simultáneamente durante la señalización. Finalmente, algunas proteínas del espacio extracelular mencionadas en el punto 1.3.1 modulan negativamente la señalización al secuestrar a PDGF.

La regulación de la función celular mediada por PDGF, por tanto, es compleja y altamente controlada¹⁴⁴.

1.3.6. FUNCIONES BIOLÓGICAS DE PDGF

Estudios de mutagénesis dirigida del genoma en PDGF y sus receptores en ratones han mostrado que PDGF tiene importantes funciones en el desarrollo embrionario como factor de crecimiento paracrino y en ocasiones autocrino, ya que la inactivación del gen de cualquier PDGF clásico (PDGF-A y PDGF-B) así como en cualquiera de los receptores en ratones *knock-out* lleva a la muerte durante la embriogénesis o perinatalmente¹⁰⁶. Se han generado una gran variedad de ratones *knock-in* para estudiar las células diana para la señalización de PDGF en el desarrollo embrionario y la formación de órganos. Como resultado, se ha demostrado que PDGF tiene un papel crucial en el desarrollo del riñón, vasos sanguíneos, pulmones y sistema nervioso central, entre otros órganos, al estimular las células mesangiales del riñón, los pericitos o mesoangioblastos, los fibroblastos alveolares y las células glía, respectivamente^{96, 106}.

En el adulto, la función fisiológica de PDGF está más limitada, pero tiene un papel importante en la curación de heridas, ya que estimula la mitogénesis y quimiotaxis de los fibroblastos que intervienen en la reparación tisular y de SMCs para la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis)¹⁰⁶. También tiene un papel en la inflamación ya que estimula la quimiotaxis de los neutrófilos y los macrófagos¹²⁴ y en la hipertrofia fisiológica del útero en el embarazo mediante la proliferación de SMCs¹⁴⁵.

Existen algunos patrones definidos que relacionan la expresión diferencial de PDGF y sus receptores con la función biológica: PDGF-A y PDGFR α son expresados en diversos sitios de interacción epitelial-mesenquimal durante el desarrollo embrionario, donde PDGF-A es producido por células epiteliales y PDGFR α es expresado por las células mesenquimales cercanas¹¹⁵⁻¹¹⁸. De forma similar, PDGF-B y PDGFR β son principalmente expresados en el desarrollo del sistema vascular, donde PDGFR β es producido por células murales, como por ejemplo pericitos/mesoangioblastos y células vasculares musculares lisas (VSMC)¹⁴⁶. PDGF-C es ampliamente expresado en muchos tipos de células y órganos durante la embriogénesis murina, incluyendo somitas y sus derivados, algunos precursores mesenquimales, cardiomiocitos, VSMC de algunas arterias principales, cartílago y condrocitos hipertróficos, y células del sistema nervioso central¹⁴⁷. PDGF-D también se expresa durante el desarrollo murino en el corazón, pulmón, riñón y algunos derivados musculares⁹¹.

1.3.7. PDGFs Y ENFERMEDAD

Diversas enfermedades se han relacionado con un incremento de la actividad de PDGF y con un aumento de la señalización autocrina. Estas enfermedades se pueden clasificar en 3 grandes grupos: cáncer, desórdenes vasculares y distintas enfermedades que cursan con fibrosis, donde fibroblastos y SMCs serían las principales células en responder a PDGF⁹⁶.

1.3.7.1. PDGF y fibrosis

Existen una variedad de enfermedades fibróticas con órganos afectados como pulmón, riñón, hígado, piel, corazón, intestino, etc. donde el denominador común es un proceso de fibrogénesis que incluye la proliferación de células mesenquimales con un fenotipo miofibroblástico y la consecuente deposición de colágeno y otras proteínas de la ECM, como fibronectina y glicosaminoglicanos, dando lugar a la pérdida de función del órgano involucrado¹⁴⁸.

Muchos mediadores polipeptídicos están involucrados en el proceso fibróticos, aparte de PDGF; el más importante es TGF β 1, que tiene un papel principal en estimular la producción de colágeno por parte de los miofibroblastos y también la transdiferenciación de fibroblasto a miofibroblasto¹⁴⁹. En cambio, se ha descrito que las diferentes isoformas de PDGF-A y PDGF-B (PDGF-AA, PDGF-BB y PDGF-AB) tienen un papel más relevante en promover la proliferación y quimiotaxis de fibroblastos/miofibroblastos, aunque también realizan otras funciones como promover la producción de colágeno, al igual que TGF β , y la adhesión celular (Figura 14). Sin embargo, el papel de las isoformas PDGF-CC y PDGF-DD en relación con la fibrogénesis no está tan estudiado.

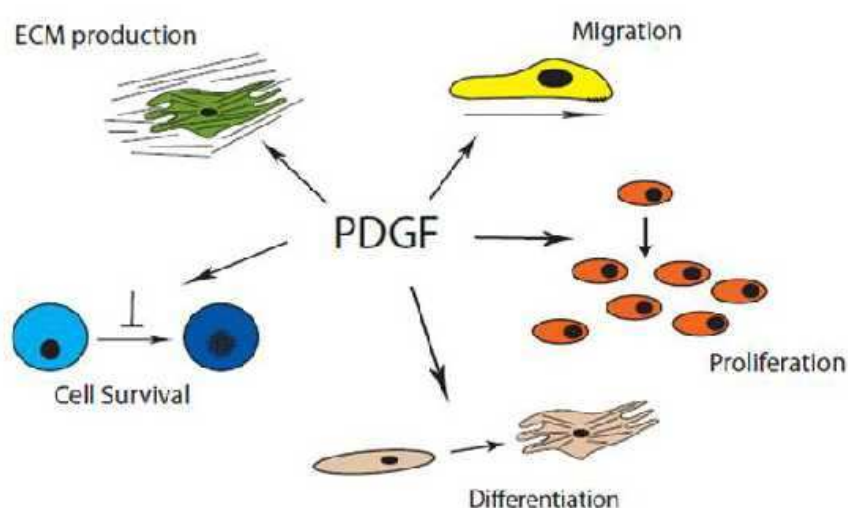


Figura 14. Papel de PDGFs en células mesenquimales. Donovan J et al. 2013¹⁴⁴.

La actividad de PDGF también está regulada por diferentes proteínas extracelulares, glicoproteínas y proteínas de la ECM que aumentan durante el proceso de fibrosis (ver apartado 1.3.1.)¹⁵⁰.

Un punto en común que tienen estas enfermedades es que la fibrosis se origina por un estímulo determinado como puede ser un factor externo (tóxico), un daño agudo, una inflamación crónica, o bien una causa desconocida¹⁵¹.

Un segundo punto en común es que los niveles de PDGF aumentan correlacionándose con la expansión de fibroblastos/miofibroblastos y dependiendo del órgano afectado podemos encontrar más relevante a la hora de promover fibrosis una molécula de PDGF u otra, o uno de los dos tipos de receptor, aunque no se sabe con detalle qué isoforma y receptor es responsable de cada función ni en fibroblastos ni en otros tipos celulares que participan en otras funciones biológicas o patológicas¹⁴⁴. Por otro lado, la fuente de miofibroblastos puede provenir de diferentes tipos celulares incluso para el mismo órgano (fibroblastos, pericitos, FAPs, etc).

Otra característica sería la participación de las células inflamatorias, principalmente macrófagos activados, como fuente de PDGFs. Estas mismas células producen citocinas u otros factores que promueven la sobreexpresión del receptor PDGF en células mesenquimales¹⁴⁸.

1.3.8. PDGF EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO

El papel de los diferentes PDGF y sus receptores en el músculo sano y en aspectos de condición fisiopatológicas como son la regeneración o la fibrosis muscular es un tema actual de estudio. Más concretamente, el cometido de PDGF-B está menos esclarecido en comparación al de PDGF-A y su receptor PDGF α , los cuales están relacionado a procesos pro-fibróticos.

En un estudio en ratones y ratas de diferentes edades se analizó la distribución de los receptores de tipo α y de tipo β en el tejido músculo-esquelético. Ambos receptores se expresaban abundantemente en el músculo esquelético durante el período embrionario pero dicha expresión disminuía hacia la etapa adulta, aunque se mantenía en células que se identificaron como SCs del músculo de animales adultos, sugiriendo que PDGF participaría durante la regeneración muscular que tiene lugar mediante las SCs¹⁵².

El músculo de pacientes que padecen una distrofia muscular muestra un patrón de expresión para PDGF-A y PDGF-B y sus receptores diferente y con una mayor intensidad en comparación al músculo sano. Mientras que en el músculo sano la expresión de PDGF-A y B se limita a la zona de unión neuromuscular (y en los vasos sanguíneos y en el núcleo de las fibras musculares en el caso específico de PDGF-B), en el músculo distrófico los PDGFs se localizan marcadamente en los infiltrados de macrófagos en células necróticas y del endomisio y en fibras regenerativas. Por otro lado, los receptores, además de expresarse en macrófagos y células regenerativas, se expresa en la propia célula necrótica, en fibroblastos del endomisio y en el sarcolema de un porcentaje elevado de fibras (Tabla 2). Sin embargo, en casos de fibrosis severa los PDGF y los receptores no se expresan prácticamente. Estos datos indicarían que PDGF y ambos receptores estarían involucrados en la fisiopatología de enfermedades distróficas en músculo, específicamente en la primera etapa de destrucción muscular y en la fase de iniciación de fibrosis, pero también podrían participar en la regeneración muscular tanto en condiciones normales como patológicas¹⁵³.

	Músculo sano	Músculo DMD
PDGF-A	Unión nueromuscular, músculo liso vascular	Infiltrado de macrófagos en células necróticas y del endomisio, Fibras regenerativas
PDGF-B	Unión nueromuscular, Músculo liso vascular, Núcleo fibras musculares	Infiltrado de macrófagos en células necróticas y del endomisio, Fibras regenerativas, Músculo liso vascular, Núcleo de las fibras no regenerativas
PDGFR α	Unión neuromuscular, Núcleo fibras musculares	Fibroblastos del endomisio, Macrófagos de células necróticas y del endomisio, Células necróticas, Fibras regenerativas, Sarcolema de algunas fibras, Núcleo fibras no regenerativas
PDGFR β	Unión neuromuscular, Músculo liso vascular y capilares	Fibroblastos del endomisio, Macrófagos del endomisio, Fibras regenerativas

Tabla 2. Expresión PDGF/PDGFR en el músculo esquelético. Zhao et al. 2003¹⁵³.

1.3.8.1. PDGF-B

A pesar de que se ha relacionado a PDGF-B con la degeneración muscular al encontrarse expresado en fibras necróticas, así como el receptor PDGF β , dos estudios adicionales del año 1990 muestran una participación de PDGF-BB en la miogénesis *in vitro*. En uno de ellos demuestran que PDGF-BB se une a la línea celular de mioblasto murino C2 con mayor afinidad que PDGF-AA o PDGF-AB, indicando que los mioblastos expresan niveles más altos de PDGFR β , y que la adición de PDGF-BB al cultivo promueve mejor la proliferación de mioblastos que participarían en la regeneración después de un daño muscular, aunque no la diferenciación a miotubo¹⁵⁴. En un segundo estudio similar al primero, observaron que la expresión del mRNA de PDGF-A y de PDGFR β está elevado en la línea L6J1 de mioblastos y en músculo crudo de rata durante el proceso de miogénesis, pero el efecto mitogénico de PDGF-BB sobre la línea celular no fue tan claro¹⁵⁵. Sin embargo, se desconoce el papel que juega PDGF-B en el músculo humano.

Tampoco se conoce cuál es el papel que juega este factor de crecimiento en el proceso de regeneración muscular ni en modelos murinos ni en pacientes.

Además, en el músculo humano y murino, como ya se ha comentado y al igual que en otros órganos, existen las células llamadas pericitos o mesoangioblastos, que son positivas para el receptor PDGF tipo β . Más allá de su implicación en la formación y homeostasis de los vasos sanguíneos, y de su contribución a la fibrosis de diferentes órganos mediante la conversión a un fenotipo miofibroblástico, algunos pericitos pueden ser células madre mesenquimales que se pueden diferenciar en adipocitos, cartílago, hueso, y también, en músculo donde el receptor PDGF podría tener un papel importante¹⁵⁶.

1.3.8.2. PDGF-A

Estudios más recientes muestran que la vía PDGFR α /PDGF-AA tiene el potencial de inducir fibrosis en músculo. Por ejemplo, las células FAPs, que se encuentran en relativa abundancia en el espacio intersticial en el músculo sano y que son positivas para PDGFR α , promueven la diferenciación de las células satélite durante la miogénesis tras un daño agudo, mientras que en condiciones de daño crónico, diferencian a adipocitos o a fibroblastos y contribuyen al proceso de proliferación fibro-adiposa, como se ha comentado en el apartado 1.2. Los FAPS estimulados *in vitro* con TGF β 1 y PDGF-AA expresan genes pro-fibróticos²⁶. Un estudio con ratones *knock-in* refuerza esta idea al identificar a las células productoras del transgén colágeno 1 - proteína verde fluorescente (GFP) como fibroblastos positivos para PDGFR α que a su vez provienen de progenitores PDGFR α + (FAPS) que se amplifican en el inicio de la fibrosis en un modelo de ratón *mdx* o durante la etapa de regeneración en un modelo de daño muscular en el ratón tipo salvaje (WT). El ligando PDGF-AA, por su parte, se encuentra aumentado en las fibras musculares del ratón *mdx* o en pacientes DMD. Estas fibras en co-cultivos con fibroblastos colágeno1 – GFP+ promueven más la expresión de colágeno de estas células

(fibroblastos/FAPs) que las fibras WT, explicando así la implicación de la señalización paracrina de PDGF-A en la mediación de la fibrogénesis. Además, los mismos resultados fueron observados tras la adición al medio de PDGF-AA, no así tras tratar los fibroblastos con PDGF-BB¹⁵⁷.

Este hallazgo, además, concuerda con el estudio de un ratón *knock-in* condicional con una mutación que genera un receptor PDGF tipo α constitutivamente activado, produciéndose así un excesivo crecimiento del tejido conectivo que da lugar a una profusa fibrosis crónica en múltiples órganos del ratón adulto, incluyendo el músculo esquelético¹⁵⁸.

En resumen, todo parece indicar que la sobreexpresión de PDGF-AA que tiene lugar en el caso de un daño muscular crónico influenciaría el proceso fibrótico del músculo esquelético.

1.4. EL RATÓN *mdx*

El ratón *mdx*, del inglés *X-linked muscular dystrophy*, es el modelo animal más comúnmente usado para el estudio de la fisiopatología de la enfermedad de Duchenne/Becker y sus posibles terapias. Conocido formalmente por el nombre de C57BL/10ScSn-*Dmd*^{*mdx*}, el ratón *mdx* posee una mutación puntual en la posición 3185 del exón 23 del gen de la distrofina en el cromosoma X. Esta mutación se originó en 1981 de forma espontánea en un ratón de la cepa C57BL/10ScSn en un centro de investigación en Surrey, Reino Unido y consiste en un cambio del nucleótido citosina a timina resultando en una forma truncada de la distrofina debido al cambio del codón que codifica para la glutamina por un codón de terminación¹⁵⁹.

1.4.1. CARACTERÍSTICAS DEL RATÓN *MDX*

A nivel microscópico, el ratón *mdx* presenta como características patológicas una inflamación y atrofia con pérdida de fibras musculares normales de forma similar al humano con DMD, sin embargo, el nivel de fibrosis es bastante menor y varía según la edad y el tipo muscular¹⁶⁰. A las 3 semanas de edad empiezan a aparecer los primeros signos de degeneración muscular en los músculos de las extremidades, observados tanto en el ensayo bioquímico, con el aumento de CK y de fosforilasa cinasa (PK), como en la biopsia muscular con la detección de macrófagos, fibras atroficas y un gran número de fibras totalmente necróticas en la semana 5. A partir de aquí se observa una fase de estabilización como consecuencia de una respuesta regenerativa compensatoria a la degeneración que implica a las células satélite, la cual es mayor en comparación a los pacientes con DMD. Por lo tanto, en la biopsia se aprecia un aumento de células regenerativas, las cuales son más pequeñas y presentan núcleos centrales de mayor tamaño y también fibras hipertróficas, además de una leve fibrosis y algunas fibras necróticas, pero no adipocitos. A pesar de la fase de regeneración y de las pocas células necróticas, los niveles de CK siguen siendo altos, indicando una degeneración simultánea. A partir de los 12 meses, se encuentran zonas con depósitos de grasa y se observa un desarrollo evidente del tejido endomisial fibrótico¹⁶¹.

A diferencia de los músculos de las extremidades, en el diafragma parece que no se da una respuesta regenerativa significativa y se comporta más como un músculo de paciente humano, presentando un alto grado de fibrosis y debilidad a una edad más temprana (3 meses aproximadamente), aunque de forma no tan severa, lo que contribuiría a la muerte del ratón debido a un fallo respiratorio¹⁶² (Figura 15).

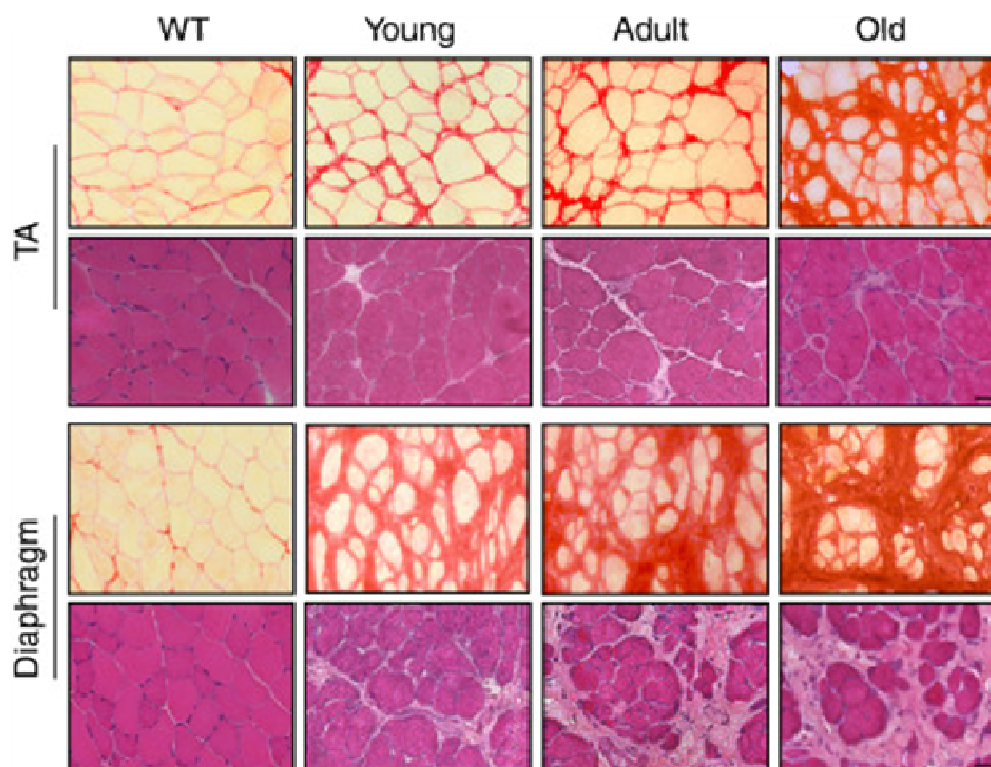


Figura 15. Evolución de la fibrosis en el diafragma y tibial anterior (TA) de un ratón joven (3 meses), adulto (9 meses) y viejo (18 meses). Imagen modificada de Pessina P et al. 2014¹⁶³

No es hasta los de 12-15 meses de edad que los ratones *mdx* macho y hembras homocigotas muestran signos clínicos de miopatía con una leve debilidad muscular, escoliosis y finalmente, fallo coronario debido a una cardiomiopatía, más leve que en pacientes. De esta forma, su esperanza de vida se encuentra reducida en un 20% aproximadamente alcanzando de media los 22 meses de edad, en comparación al 75% de reducción que sufren los pacientes¹⁶⁴.

1.4.2. SIMILITUDES Y DIFERENCIAS CON EL PACIENTE DMD

La degeneración muscular del músculo esquelético es menor en el ratón *mdx*, excepto en el diafragma. Por ejemplo, la fibrosis no es tan evidente y sólo algunas fibras son reemplazadas por tejido adiposo en la edad adulta, como ya se ha comentado anteriormente. Los ratones presentan una deambulación normal y no presentan contracturas en las articulaciones, ya que la unión miotendinosa no está muy afectada al

contrario de lo que ocurre en pacientes¹⁶⁵. El modelo murino también presenta una marcada cardiopatía, aunque menos severa que en el humano y por esta razón su esperanza de vida no se ve tan reducida. El electrocardiograma (ECG) del ratón *mdx* a los 6 meses de edad presenta algunas anormalidades asociadas a cambios en el músculo cardíaco como la fibrosis, visible a partir de la misma edad, y que progresa con el avance de la enfermedad. La resonancia magnética cardíaca detecta cambios en el corazón en estadios más tempranos de la enfermedad. Por ejemplo, a diferencia del humano con DMD, el ratón *mdx* desarrolla primero (sobre los tres meses de edad) una disfunción en el ventrículo derecho, normalmente no presente en pacientes, y que se agrava con el transcurso del tiempo, y después, sobre los 10 meses de edad, una disfunción leve del ventrículo izquierdo de tipo cardiomiopatía dilatada. Por todo ello, el ratón *mdx* puede ser un modelo adecuado para estudiar tanto los mecanismos moleculares y celulares de la cardiopatía asociada a la falta de distrofina como el efecto de posibles terapias¹⁶⁶.

No se sabe la causa exacta por la cual el *mdx* tiene un fenotipo más moderado, pero se ha especulado con la idea de que las células satélites de ratón tienen más capacidad de regeneración¹⁶⁷ o bien la ausencia de distrofina puede estar compensada por la proteína homóloga utrofina, la cual está sobre-regulada en las fibras regenerativas del ratón adulto. De hecho, dos laboratorios generaron un doble *knock out* (*dko*) de las proteínas distrofina y utrofina¹⁶⁸, con el resultado de un ratón con un fenotipo más severo que presentaba más degeneración muscular que el ratón *mdx* con un alto grado de fibrosis y tejido adiposo, lo que se traducía en una movilidad reducida, cifosis, contracturas articulares y cardiomiopatía produciendo la muerte hacia las 20 semanas de edad^{168, 169}. En pacientes con DMD la utrofina también está sobre-regulada y redistribuida en el sarcolema, pero a un nivel menor no suficiente para ralentizar la progresión de la enfermedad¹⁷⁰.

1.5. TERAPIAS EN ESTUDIO

Existen diversas estrategias terapéuticas para las distrofias musculares. Un grupo de las mismas está enfocado en conseguir restablecer la expresión de la distrofina (esto incluye terapia génica y celular) o sobreexpresar otras proteínas que pueden compensar la función de la distrofina, con el fin de preservar la integridad del sarcolema. Sin embargo, debido a las limitaciones técnicas de la terapia génica y celular, se han desarrollado una serie de fármacos que intentan revertir algunos de los eventos patológicos de la enfermedad, como son la inflamación, fibrosis, pérdida de volumen muscular, etc⁵⁰.

1.5.1. TERAPIA GÉNICA PARA EL GEN DE LA DISTROFINA

1.5.1.1. Transferencia génica

El objetivo de esta terapia consiste en restaurar la expresión de la distrofina mediante la transferencia de un gen funcional utilizando diferentes vehículos. Los principales componentes de la terapia de transferencia génica son:

1. Transportador o vector: elemento que transporta el gen sintético a los tejidos.
 2. Gen sintético: gen ideado para la transferencia
 3. Promotores: elementos que van a permitir la expresión del gen introducido en los tejidos.
1. Transportador: Los vehículos que más se han utilizado han sido los virus. La tabla 3 muestra los diferentes tipos de virus utilizados, sus ventajas e inconvenientes. El transportador ideal debería tener una alta capacidad infectiva, asegurando la colonización del máximo número de fibras musculares posibles, una baja capacidad inmunogénica (limitando al máximo la reacción inmunitaria), una gran capacidad de transporte (que permitiese transportar genes de todos los tamaños posibles) y con una limitada capacidad de inserción (evitando de este modo la inserción al azar en el DNA de las células). No existe un transportador perfecto, pero de todos los virus testados,

el que mejores resultados ha obtenido son los virus adenoasociados (AAV) por su baja patogenicidad e inmunogenicidad, así como por su gran capacidad de infección en músculo. Aunque no se integra en el genoma presenta una elevada persistencia (de algunos años) en, al menos, el músculo de ratón sano¹⁷¹. A parte de los vectores virales se han testado otras sustancias con capacidad de transporte, como son, los liposomas o microesferas en el ratón *mdx* con resultados limitados hasta el momento.

	Tamaño límite de empaquetamiento	Integración genómica (expresión estable)	Infeción en células post-mitóticas	Riesgo o preocupación principal
Retrovirus	~8 Kb	Si	No	Leucemia
Lentivirus	~8 Kb	Si	Si	Leucemia, recombinación con VIH
Virus del herpes simple	~150 Kb	No	Si	Citotoxicidad e inmunogenicidad
Adenovirus (helper-dependent)	~30 Kb	No	Si	Inmunogenicidad contra la cápside
Virus adenoasociados (AAV)	~4 Kb	No	Si	Inhibido por anticuerpo neutralizantes

Tabla 3. Ventajas y desventajas de los virus utilizados en terapia génica para la DMD. Tabla modificada de Hotta et al. 2015¹⁷².

2. Gen sintético: El gen de la distrofina no puede ser transportado de forma íntegra por un AAV ya que tiene un tamaño que supera la capacidad de transporte de los AAV. Para contrarrestar esta limitación, se han probado diversas estrategias¹⁷³. Una de ellas fue transferir las isoformas más cortas de la distrofina en el ratón *mdx*, pero al no conservar el N-terminal, el cual es necesario para la unión a actina, no se obtuvieron resultados suficientemente beneficiosos ni a nivel funcional ni histológico¹⁷⁴,¹⁷⁵. Con el objetivo de obtener distrofinas funcionales que quepan en los AAV, se han creado diferentes mini (distrofina que causa un fenotipo DMB) y micro-genes sintéticos de distrofina que codifican para las regiones imprescindibles o presumiblemente más

importantes de la proteína. Si bien no se conoce con exactitud cuál es la expresión mínima necesaria de distrofina para obtener una mejoría clínica significativas, se especula que ésta debería estar alrededor del 20%, aunque algunos estudios en ratón muestran que a partir de un 5% de expresión se pueden observar algunos beneficios a nivel funcional¹⁷⁶. Uno de los inconvenientes que se ha observado en ensayos pre-clínicos con un modelo canino de la DMD es que tras la inyección intramuscular de AAV portador de micro-distrofina se puede generar una fuerte respuesta celular, tanto contra la cápside como contra la distrofina, no observada en el modelo murino, sin embargo este defecto es tratable con la supresión transitoria del sistema inmune¹⁷⁷. Más tarde, dicha respuesta celular fue observada en niños con DMD, incluso en los que no expresaban la distrofina¹⁷⁸. En los últimos años se ha probado en modelos animales la transferencia de la isoforma larga de la distrofina o mini-distrofina utilizando 2 o incluso 3 AAV mediante una técnica conocida como concatemerización que permite unir en el interior de la célula transfectada los diversos fragmentos que codifican para el gen que se pretende reemplazar y que se encuentran separados en los distintos plásmidos¹⁷⁹ o bien la transferencia de una micro-distrofina sintética (las cuales se han descrito más de 30 constructos hasta la fecha) en un solo vector, con resultados prometedores^{180, 181}.

3. Promotores: Los promotores son los elementos que van a asegurar una expresión continuada de la proteína deficitaria. Pueden ser promotores ubicuos, con los que se pretende obtener una expresión del gen por todos los tejidos del cuerpo, o promotores específicos, es los que se pretende conseguir una expresión limitada a ciertos tejidos, en este caso el músculo cardíaco y esquelético. Los promotores que se han estudiado en terapia génica para las distrofias musculares son el de la CK y el de la desmina.

La terapia de transferencia génica ha mostrado avances notables en los últimos años. En este momento se están realizando ensayos clínicos en fase I/II en pacientes con

enfermedad de Duchenne con inyección de AAV que transportan un gen de la micro-distrofina¹⁸².

1.5.1.2. Edición del genoma

La edición del genoma es posible con el revolucionario sistema CRISPR/Cas9 (*RNA-guided clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated enzyme protein 9*) derivado de bacterias. La técnica consiste en introducir mediante AAV una o varias secuencias guía, complementarias a un fragmento de ADN y la endonucleasa Cas9 capaz de reconocer una secuencia específica de este RNA y cortar la doble cadena de ADN¹⁸³. Con esta técnica se puede saltar un exón (ver más abajo exon skipping) al deletar una secuencia del sitio aceptor de empalme del pre-mRNA con una secuencia guía o deletar un fragmento del ADN al utilizar dos secuencias guías en la zona del intrón generándose una posterior recombinación no homóloga; también se puede deletar un fragmento que contiene la mutación y sustituirlo por el fragmento WT mediante combinación homóloga (aunque esta aplicación está limitada en células en fase S y G2 del ciclo celular y las fibras musculares y cardiomiocitos se encuentran en fase G1); y finalmente, también es posible recuperar el marco de lectura al introducir una pequeña deleción o inserción con una sola secuencia guía¹⁸⁴. Estudios *in vitro* e *in vivo* utilizando vectores AAV han mostrado resultados positivos, pero por el momento aún no se han desarrollado ensayos clínicos en pacientes¹⁸⁵.

1.5.1.3. Modificadores del producto génico

1.5.1.3.1. Salto de exón (*exon-skipping*)

Esta terapia consiste en alterar el ARN pre-mensajero en el lugar de corte y empalme de un exón de tal forma que un exón o varios se eliminan de la secuencia del mRNA con el fin de recuperar el marco de lectura ocasionado por deleciones, o bien para eliminar un exón que contiene un codón de terminación, mediante el uso de oligonucleótidos antisentido (AONs). De esta forma se estaría consiguiendo una proteína trunca pero

parcialmente funcional (fenotipo Becker)¹⁸⁶. Una mutación típica en DMD que causa un cambio en el marco de lectura es la deleción de los exones 49-50, pero con el salto del exón 51, el cual es diana para el fármaco Eteplirsen o Exondys 51, lo que se pretende es recuperar el marco de lectura traduccional. Este fármaco se evaluó en un ensayo clínico en fase II en pacientes con enfermedad de Duchenne. El objetivo primario del estudio, que era el aumento de expresión de distrofina por las fibras musculares, se consiguió en todos los pacientes tratados. Los objetivos secundarios, que eran una mejoría funcional, se analizaron comparando los resultados en pacientes tratados con una cohorte histórica no tratada. Este análisis mostró una mejoría en la distancia recorrida en el test de los 6 minutos (6MWT). Si bien la agencia americana del desarrollo farmacológico (FDA o Administración de Alimentos y Medicamentos) aprobó la comercialización del fármaco, aconsejó a la empresa con los derechos de desarrollo de eteplirsen realizar un nuevo ensayo clínico en fase III con pruebas funcionales como objetivo primario. Este ensayo, conocido como PROMOVI, se ha completa en Estados Unidos, si bien hasta la fecha no se conocen los resultados¹⁸⁷. A pesar de que en 2016 la FDA en Estados Unidos otorgó la aprobación acelerada a este tratamiento para aproximadamente el 13% de todos los pacientes DMD, en Europa no ha sido admitido y se requieren más estudios para mostrar su eficacia¹⁸⁸.

Otros medicamentos se están desarrollando con el fin de eliminar otros exones como son los exones 53, 45 y 44¹⁸⁹. Por ejemplo, el fármaco Golodirsen, el cual “salta” el exón 53, está en trámites para ser aprobado por la FDA.

Las limitaciones del salto de exón incluyen una baja eficiencia en músculos cardíacos, un bajo nivel de penetración celular en el propio músculo esquelético junto a un alto grado de eliminación de los AONs en sangre¹⁹⁰. Por este motivo actualmente se están estudiando una nueva generación de AONs, en los que se ha realizado una modificación de la estructura química del oligonucleótido añadiendo una proteína sintética. Estos nuevos

AON se conocen como péptidos de penetración celular conjugados a un oligómero de morfolino fosforodiamidato (PPMO) y en teoría tienen una mayor capacidad de penetración celular llegando a tejidos como el corazón e incluso, cruzando la barrera hematoencefálica y llegando al cerebro. Existe un ensayo clínico en fase I en marcha en pacientes con Duchenne con el objetivo de valorar la seguridad y farmacocinética de estos nuevos AONs^{191, 192}.

1.5.1.3.2. Supresión de codón de terminación (*Read-through*)

Es la única estrategia que ayuda a restaurar la expresión de la distrofina basada en fármacos, actuando sobre la traducción. Ataluren, aunque se desconoce su mecanismo de acción, es un fármaco que causa que el ribosoma se salte un codón de terminación (generado por una mutación puntual) permitiendo una teórica y correcta traducción de la distrofina¹⁹³. En ensayos clínicos, Ataluren, (conocido como Translarna en Europa), mostró resultados inconsistentes en la prueba 6MWT, pese a una mejora de la expresión de la distrofina en un 11% en las biopsias musculares de los pacientes, después de un año de tratamiento¹⁹⁴. A pesar de los resultados poco claros y de una alta tasa de efectos secundarios, Translarna es el único medicamento aprobado en Europa desde 2014 condicionado a pacientes DMD con una mutación sin sentido y con capacidad de deambulación, con el fin de retrasar la evolución de la enfermedad, mientras se sigue investigando su eficacia¹⁹⁵.

1.5.2. TERAPIA CELULAR

La terapia celular con células madre fue una de las primeras terapias experimentales estudiadas en pacientes con la enfermedad de Duchenne. El concepto básico de este tipo de terapia consiste en la administración células madre procedentes de un donante (alógenas) o del propio paciente (autólogas) pero corregidas genéticamente, con capacidad de regenerar el músculo deficitario¹⁹⁷. La célula madre ideal debería tener las siguientes características: 1) ser de fácil obtención y expansión *in vitro*; 2) tener una gran

capacidad de diferenciación al tejido que se desee tratar una vez inyectada; 3) tener una nula capacidad teratogénica; 4) tener una gran distribución dentro del tejido diana; 5) mantener la capacidad de diferenciación después de numerosos ciclos de proliferación; y 6) ser fácilmente manipulable desde un punto de vista genético, lo que permitiría la corrección de las mutaciones en las terapias con células autólogas.

Una limitación de la terapia génica es que su efectividad es dependiente de la edad ya que con la progresión de la enfermedad la masa muscular se va sustituyendo por tejido fibroadiposo con lo cual queda poco tejido muscular para ser reparado. Sin embargo, la terapia celular podría solventar este problema al regenerar el músculo dañado¹⁹⁶.

La primera célula que se probó en el caso de la enfermedad de Duchenne fue la SC. En los primeros ensayos se obtenían SCs de un donante emparentado del paciente, se expandían *in vitro* y se inyectaban mediante inyección intramuscular en los pacientes a los que se administraba terapia inmunosupresora de forma concomitante para evitar un rechazo. Si bien las biopsias musculares demostraron que las células inyectadas tenían capacidad de unirse a fibras musculares residentes y reestablecer la expresión de distrofina, el número de fibras en que eso ocurría era tan pequeño que no se obtuvieron cambios funcionales destacables en los pacientes tratados. Los últimos ensayos realizados a principios de este siglo fracasaron, y a día de hoy no se considera a la SC como una terapia eficaz en esta enfermedad. Entre los factores que se manejan para explicar el fallo de esta terapia se encuentra: muerte precoz de la mayoría de las células inyectadas posiblemente por encontrarse en un tejido inflamado y fibrótico, reacción inmunitaria contra las propias células, limitada capacidad de regenerar el músculo *in vivo* después de ser expandidas en cultivo y limitada capacidad de migración más allá del punto de inyección^{198, 199}. Por este motivo, se trató de administrar de forma fallida a las células satélite mediante inyección intraarterial sin resultados efectivos, ya que las células no eran capaces de salir de los capilares²⁰⁰. Debido a estos problemas, otras células

madre pluri o multipotenciales, que han demostrado potencial miogénico *in vivo* e *in vitro* han sido estudiadas para el tratamiento de DMD. Entre ellas destacarían los progenitores miogénicos derivados de la médula ósea (células madre hematopoyéticas (HSCs) y las células madre mesenquimales (MSCs) que pueden dar lugar a todo tipo de tejido mesenquimal (hueso, cartílago, grasa, músculo liso, cardíaco y esquelético). Estas células se pueden expandir *in vitro*, diferenciar a precursores musculares y trasplantar sistémicamente para regenerar los músculos del ratón *mdx*²⁰¹⁻²⁰³. De todas las células madre mesenquimales estudiadas, los mesoangioblastos son los únicos que se han probado en ensayos clínicos en pacientes. Estas células son una subpoblación de pericitos asociados a los vasos sanguíneos que presentan una serie de ventajas sobre el resto de células madre mesenquimales: tienen capacidad miogénica *in vitro* en *in vivo*, pueden expandirse *in vitro* notablemente y pueden atravesar la pared de los vasos sanguíneos y colonizar el músculo diferenciando a miofibras, por lo que es posible diseñar una estrategia con administración sistémica²⁰⁴. En la década de 2000 a 2010 se realizaron numerosos estudios pre-clínicos en modelos animales de diversas distrofias musculares con inyección intraarterial de mesoangioblastos. En el modelo canino de DMD, se detectó una alta expresión de distrofina y una mejoría de la estructura histológica de los músculos tratados asociada a una mejoría en la función muscular de los animales²⁰⁵. Sin embargo, en un ensayo clínico en fase I/II con cinco pacientes DMD, la inyección intraarterial de mesoangioblastos de donante emparentado no produjo ninguna mejoría funcional, ni tampoco se evidenciaron niveles elevados de DNA de distrofina procedente del donante en las fibras musculares estudiadas²⁰⁶. Otras células de estudio son las células madre pluripotentes inducidas (iPS cells) ya que son una fuente ilimitada de células madre autóloga y no generan respuesta inmunitaria, pero requieren de corrección genética antes de ser trasplantadas²⁰⁷.

1.5.3. TERAPIA BASADA EN LA SOBREEXPRESIÓN DE LA UTROFINA

La utrofina comparte un alto grado de semejanza en su secuencia con la distrofina. Esta proteína, al igual que la distrofina, se expresa en la membrana muscular y también se asocia con los miembros del DGC, es por ello por lo que se cree que ambas tienen funciones redundantes²⁰⁸. La utrofina se trata de una forma fetal de la distrofina que deja de expresarse en el sarcolema de la fibra muscular del adulto en condiciones normales para expresarse sólo en la unión neuromuscular²⁰⁹ y miotendinosa²¹⁰. Se especula que niveles elevados de esta proteína en músculo de pacientes podrían ser un factor modificador de la enfermedad, enlenteciendo el proceso degenerativo del músculo: por ejemplo, los niveles de utrofina muscular se correlacionan con un retraso en el uso de silla de ruedas por pacientes con DMD²¹¹; por lo tanto, el reto es que la utrofina se exprese en el sarcolema para cubrir la ausencia de la distrofina. Existen varios estudios que pretenden aumentar la expresión de utrofina mediante diferentes estrategias como son la terapia génica²¹², o la regulación de la expresión de la utrofina endógena a diferentes niveles: transcripcional, al activar el promotor, post-transcripcional, traduccional o post-traduccional con diferentes compuestos. La ventaja del uso de esta terapia es que va dirigido a cualquier tipo de paciente, a diferencia del *read-through* o del *exon-skipping* que son terapias dirigidas a un grupo reducido de pacientes con mutaciones específicas tratables con estas estrategias²¹³.

Recientemente, se ha realizado un ensayo en fase II con el compuesto Ezutromid, un modulador transcripcional de la utrofina que pretendía aumentar la expresión de esta proteína y mejorar la función muscular de los pacientes tratados. Lamentablemente, los resultados de dicho ensayo no aportaron ninguna evidencia de que Ezutromid tenga un impacto significativo en retrasar el progreso de la enfermedad²¹⁴.

1.5.3. TERAPIA FARMACOLÓGICA

1.5.3.1 Agentes anti-flamatorios/antioxidantes

En el momento actual el único tratamiento aprobado para la enfermedad de Duchenne y ampliamente usado son los corticoides. En el caso de los pacientes se administran dos tipos diferente, prednisona y deflazacort. No existen diferencias significativas entre ambos en cuanto a la eficacia, pero sí parece que deflazacort tiene una tasa más baja de efectos secundarios. A pesar de todo, la tasa de efectos adversos de estos medicamentos sigue siendo muy elevada, por lo que desde hace años se están desarrollando otros corticoides. Por ejemplo, vamorolone (VBP15) es un análogo de corticoide que puede ofrecer beneficios similares a los corticosteroides, pero con una menor tasa de efectos adversos. En el ratón *mdx*, vamorolone hace aumentar la fuerza muscular al inhibir la vía de señalización de NF-κB y estabilizar la membrana, pero sin causar cambios hormonales ni inmunosupresión²¹⁵. Recientemente, dos ensayos clínicos, uno en fase I y otro en fase IIa, mostraron que el fármaco era igual de eficaz que la prednisona, pero con una menor tasa de efectos secundarios que los glucocorticoides tradicionales, mientras que un ensayo en fase IIb está actualmente en marcha^{216, 217}.

Se han descrito una serie de dianas terapéuticas relacionadas con los mecanismos de inflamación en los músculos esqueléticos de DMD como serían los canales de calcio, la producción de ROS en el proceso de oxidación, y la vía de NF-κB. Una revisión de la Fundación Cochrane publicada en 2010 mostró que de los fármacos bloqueadores de los canales de calcio testados en la DMD en los últimos años sólo uno, verapamil, tenía un efecto beneficioso aumentando la fuerza muscular, si bien dicho estudio se asoció con efectos secundarios cardíacos intolerables²¹⁸. En la actualidad se está estudiando el efecto de rimeporide, un inhibidor del intercambiador de sodio-protones tipo 1 (NHE-1) el cual está implicado en la regulación del nivel de sodio en la célula y a su vez modula los niveles de calcio, ya que los niveles de ambos iones están descompensados en pacientes

con DMD y en el ratón *mdx*²¹⁹. En estudios pre-clínicos, rimeporide manifestó prevenir al ratón *mdx* del daño muscular, como la inflamación y fibrosis²²⁰. En un ensayo clínico en fase I rimeporide ha mostrado ser seguro en niños DMD de 6 a 14 años²²¹. El principal protagonista del estrés oxidativo son las moléculas ROS, las cuales aumentan tras la acumulación de calcio en la mitocondria dando lugar a una permeabilización de la membrana²²². Idebenona es una benzquinona (análogo de la coenzima Q10) con propiedades antioxidantes capaz de disminuir la producción de ROS²²³ y que retrasa la aparición del fallo respiratorio en DMD²²⁴ demostrado en un ensayo clínico en fase II y III. Actualmente hay un segundo estudio en fase III en marcha para pacientes tratados también con corticosteroides²²⁵. Compuestos previamente estudiados con propiedades antioxidantes como N-acetilcisteína, extracto de té verde, melatonina y pentoxifilina han generado resultados no concluyentes en ensayos clínicos²²⁶. La combinación de los compuestos antioxidantes L-arginina y metformina²²⁷ así como L-citrulina y metformina²²⁸ están bajo estudio en pacientes BDM y DMD. Entre los inhibidores de NF-κB, cuya señalización está elevada en fibras musculares y células del sistema inmune, destaca CAT-1004 (edasalonexent), el cual inhibe NF-κB activado. Existe un estudio de seguridad de CAT-1004 en fase I, dónde éste disminuyó significativamente los niveles de NF-κB después de dos semanas de tratamiento, con efectos secundarios leves, aunque estudios más elaborados se están llevando a cabo en la actualidad²²⁹. Otro fármaco de estudio es flavocoxid, una mezcla de flavonoides derivado de plantas que en *dmx* demostró tener propiedades anti-inflamatorias (al inhibir NF-κB) y antioxidantes, mejorando la regeneración y reduciendo la necrosis muscular²³⁰.

1.5.3.2. Agentes anti-fibróticos

Los fármacos anti-fibróticos van dirigidos principalmente contra las citocinas pro-inflamatorias como IL-6, TNFα y IL-1β, las cuales están incrementadas en el ratón *mdx* así como TGFβ, PDGF y CTGF²³¹. Muchos de los tratamientos se centran en inhibir la

señalización de la citocina pleiotrópica TGF β . Halofuginona (HT-100) es un derivado halogenado sintético de febrifugina, un alcaloide de quinazolinona de origen natural que ha obtenido resultados prometedores en ensayos pre-clínicos en modelos animales de DMD. Esta molécula bloquea la activación de Smad3 vía TGF β y la consiguiente síntesis de colágeno. En un estudio pre-clínico realizado en el modelo de ratón *mdx*, halofuginona redujo la fibrosis y mejoró la activación de las SCs en el músculo esquelético y cardíaco después de 10 semanas de tratamiento²³². Sin embargo, el ensayo clínico en fase II que se estaba realizando con esta molécula ha sido suspendido debido a los graves efectos adversos experimentados por los pacientes, pese a reducir significativamente la fibrosis y aumentar la fuerza muscular en un 11%²³³. Losartan es un antagonista del receptor de angiotensina II (ARB), cuya hormona regula positivamente la actividad TGF y, por lo tanto, el bloqueo de su receptor atenúa la señalización de TGF β . En comparación a los inhibidores de la ACE, como perindopril y enalapril, los ARB son de interés porque deberían presentar un perfil de efectos secundarios más bajo²³⁴. En el modelo de ratón *mdx*, los primeros estudios con losartan mostraron una reducción de fibrosis en diversos músculos y una mejoría de la función del músculo esquelético y cardíaco²³⁵, no obstante, en estudios posteriores, losartan sólo preservó la función cardíaca pero no la esquelética²³⁶. Otro fármaco de interés es tamoxifen, un antiestrogénico utilizado contra el cáncer de mama con propiedades anti-fibróticas que se cree que también actúa inhibiendo la vía TGF β , además de haber demostrado ser seguro para niños en ensayos para otros usos²³⁷. En el ratón *mdx*, tamoxifen redujo la fibrosis del diafragma y del corazón contribuyendo al retraso de la progresión de la enfermedad tras quince meses de tratamiento²³⁸. En el momento actual, se está estudiando la efectividad del fármaco en pacientes en un ensayo clínico en fase I/II. La fibrosis también se puede tratar con el uso de inhibidores tirosina cinasa. Imatinib, una molécula efectiva para el tratamiento de la leucemia mielógena crónica (CML) y los tumores gastrointestinales (GISTs), inhibe la proteína con actividad tirosina cinasa c-abl, que puede interactuar con el mediador pro-

fibrótico Smad1 en la vía señalización de TGF β ²³⁹, además de inhibir los receptores PDGF. Imatinib es una molécula muy estudiada para entender mejor los mecanismos moleculares subyacentes en diversas enfermedades tumorales, así como en enfermedades fibrogénicas que involucran diferentes órganos⁹⁶. El tratamiento del ratón *mdx* con imatinib redujo la fibrosis en diafragma y mejoró la función del músculo esquelético, así como la inflamación¹⁶². Otros inhibidores de PDGF tirosina cinasa son nilotinib⁵⁷ - que también bloquea el efecto de TGF β al inhibir la actividad tirosina cinasa de c-Abl- y crenolanib¹⁵⁷. Estos fármacos reducen la fibrosis en el ratón *mdx*, pero de momento no hay ningún ensayo clínico en marcha en DMD con ningún inhibidor tirosina cinasa. Otra estrategia anti-fibrótica desarrollada recientemente es la de bloquear la vía de señalización del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF): FG-3019 es un anticuerpo monoclonal contra CTGF que reduce la fibrosis tras dos meses de tratamiento en el modelo *mdx*²⁴⁰ y en la actualidad, un ensayo clínico en fase II está en proceso de reclutamiento de pacientes.

1.5.3.3. Tratamiento de la isquemia muscular

La óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) es una enzima asociada al DGC en los músculos liso y esquelético que produce óxido nítrico (NO) el cual cataliza la conversión de guanosina trifosfato (GTP) a guanosina monofosfato cíclica (cGMP), estimulando la vasodilatación. La pérdida de distrofina causa una deslocalización de nNOS y por lo tanto una reducción de NO que, presumiblemente, da lugar a una isquemia muscular, especialmente durante la realización de actividad física²⁴¹. Aunque la pérdida de nNOS no da lugar a un fenotipo distrófico, la isquemia asociada contribuye a la enfermedad y tratarla podría aportar un beneficio para los pacientes²⁴². PDE5 es una enzima hidrolasa que actúa sobre cGMP. Los inhibidores de PDE, por tanto, tienen un efecto vasodilatador al bloquear la ruptura de cGMP, mejorando la isquemia en DMD. El tratamiento con los inhibidores específicos de PDE5, tadalafil y sildenafil, fue beneficioso para el ratón *mdx*.

En el caso de sildenafil, éste mejoró la función muscular del diafragma y redujo la fibrosis²⁴³. El otro inhibidor, tadalafil, mejoró la histopatología muscular y redujo el daño en la fibra muscular inducida por contracción²⁴⁴. En ensayos clínicos, sin embargo, ninguno de los dos fármacos ha mostrado tener eficacia al no encontrar efecto en el 6MWT, ni en la función cardíaca ni en la calidad de vida entre los diferentes grupos de estudio^{245, 246}.

1.4.3.4 Reguladores del crecimiento y la regeneración muscular

Una de las consecuencias de la ausencia de la distrofina es la pérdida de masa muscular. La masa muscular es regulada negativamente y de forma crucial por la miostatina, al regular negativamente genes importantes para la miogénesis²⁴⁷. Por lo tanto, la inhibición de la miostatina es una estrategia terapéutica para mejorar la masa muscular en pacientes DMD. Diversos ensayos clínicos contra la miostatina realizados en el pasado han fracasado^{248, 249}, sin embargo, se siguen realizando estudios basados en este principio. El anticuerpo monoclonal anti-miostatina domagrozumab (PF-06252616) ha mostrado un incremento del peso muscular y fuerza de agarre en el ratón *mdx* y un incremento del volumen muscular en monos sanos²⁵⁰. Un estudio clínico en fase I mostró que domagrozumab se tolera bien y como resultado del tratamiento se observó un incremento de un 6% de media de la masa muscular²⁵¹. Por el contrario, un estudio en fase II ha terminado recientemente al no encontrar beneficios funcionales. Existe otro ensayo clínico en fase II en marcha con la molécula adnectina anti-miostatina RG6206 de administración subcutánea²⁵² que demostró aumentar la masa muscular en un 5% aproximadamente en sujetos sanos²⁵³. La folistatina es un antagonista natural de la familia TGF β expresado ubicuamente que ha mostrado ser más eficaz que los anticuerpos dirigidos sólo a la miostatina ya que, además de reducir la pérdida muscular en modelos murinos²⁵⁴, produjo un aumento de la masa muscular y una mejoría del 6MWT en pacientes BMD tratados con el gen de la folistatina mediante inyección intramuscular de AAVs en un ensayo clínico en fase I/II²⁵⁵, motivo por el cual la misma estrategia se aplicó en pacientes DMD en un estudio clínico en fase I/II²⁵⁶. Otra estrategia es utilizar inhibidores de las histonas

deacetilasas (HDAC) con el fin de descondensar los cromosomas y permitir la activación de la transcripción génica al reducirse la capacidad de las histonas acetiladas de unirse al DNA²⁵⁷. Givinostat es un inhibidor de la HDAC que en estudios pre-clínicos incrementó la regeneración muscular y disminuyó la fibrosis en el ratón *mdx*²⁵⁸. En un ensayo clínico en fase II givinostat aumentó el área de la fibra muscular y redujo la fibrosis y el tejido adiposo en pacientes DMD²⁵⁹. En el momento actual un nuevo ensayo con givinostat, esta vez en fase III, está en marcha. El factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF) es una citocina que liberan las células madre de la médula ósea al torrente sanguíneo pudiendo llegar al músculo contribuyendo a la regeneración, como se demostró en modelos murinos de distrofia muscular²⁶⁰. Un ensayo clínico en fase I con este fármaco en niños DMD está actualmente en marcha²⁶¹. Otro compuesto de estudio es el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), el cual es un mediador clave en la vía anaeróbica de la producción de masa muscular y está involucrado en la diferenciación de mioblastos, pudiendo incrementar la masa y la fuerza muscular²⁶². En este sentido, el ratón *mdx* transgénico para IGF-1 específicamente en músculo (*mdx:mIgf_{+/+}*) mostró un 40% más de masa muscular y un aumento similar de la fuerza en diferentes músculos en comparación al *mdx*, además de observarse una disminución de la fibrosis en el diafragma del ratón adulto y de la necrosis muscular²⁶³. En un estudio pre-clínico en el ratón *mdx* se ha investigado que IGF-1 administrado subcutáneamente cambia las fibras a un tipo más oxidativo, las cuales están asociadas a una reducción de daño causado por la contracción, por lo tanto, IGF-1 podría ser útil para proteger a las fibras musculares²⁶⁴. Sin embargo, los resultados preliminares de un ensayo clínico en fase II del IGF-1 recombinante (INCRELEX) en pacientes DMD²⁶⁵, no demostraron una mejoría en la función motora tras 6 meses de tratamiento. Un dato importante a considerar en los ensayos clínicos es que un aumento de masa muscular no implica directamente un aumento de la fuerza²⁶⁶.

1.6. NINTEDANIB

Nintedanib, formalmente conocido como BIBF-1120, es un inhibidor intracelular desarrollado por la farmacéutica alemana Boehringer Ingelheim que bloquea diferentes proteínas tirosina cinasa. En 2015 nintedanib, comercializado con el nombre de OFEV®, fue aprobado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la FDA como tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática (IPF) por su efecto anti-fibrótico⁶⁷, después de demostrarse su seguridad y eficacia. La IPF es una enfermedad devastadora de origen desconocido caracterizada por la aparición de fibrosis en el intersticio - esto incluye las paredes alveolares, vasos sanguíneos pulmonares y tejidos peribronquiales - que progresa hasta dar lugar a una pérdida de función pulmonar y finalmente a un fallo respiratorio. El tratamiento con nintedanib en un ensayo clínico en fase III de un año de duración mostró la retardación de la fibrosis en un 50% y, como consecuencia, la disminución de exacerbaciones agudas con un mismo porcentaje y una mejor función pulmonar – por medición de la capacidad vital forzada (FVC) – en comparación al grupo no tratado. Los efectos adversos más comunes fueron el vómito, náuseas y dolor abdominal y diarrea siendo ésta última la más frecuente con una intensidad leve o moderada²⁶⁷. Recientemente se ha concluido un ensayo clínico en fase III para la enfermedad intersticial pulmonar asociada a esclerosis sistémica (esclerodermia) con resultados favorables, al reducir la pérdida de función pulmonar, con lo cual nintedanib está en vías de ser aprobado para esta indicación²⁶⁸.

El mecanismo de acción anti-fibrótico de nintedanib no es conocido con exactitud, pero se conoce que principalmente actúa sobre los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) y los PDGFRs al unirse al sitio de unión del ATP, inhibiéndose la autofosforilación y las consiguientes cascadas de señalización²⁶⁹ (Figura 16). En un primer momento, nintedanib fue pensado para tratar la angiogénesis involucrada en el crecimiento y expansión de

tumores ya que los receptores FGF-1 (FGFR-1) y VEGF-2 (VEGFR-2) son conocidos pro-angiogénicos²⁷⁰, pero más tarde, al inhibir también los receptores PDGF fue propuesto como tratamiento anti-fibrótico para IPF. Ensayos *in vitro* han mostrado un efecto anti-fibrótico de nintedanib al bloquear el gran efecto proliferativo y migratorio de las moléculas PDGF y FGF tanto en fibroblastos controles como de pacientes, además de reducir la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos inducida por TGFβ^{270, 271} y la producción de proteínas de la ECM²⁷².

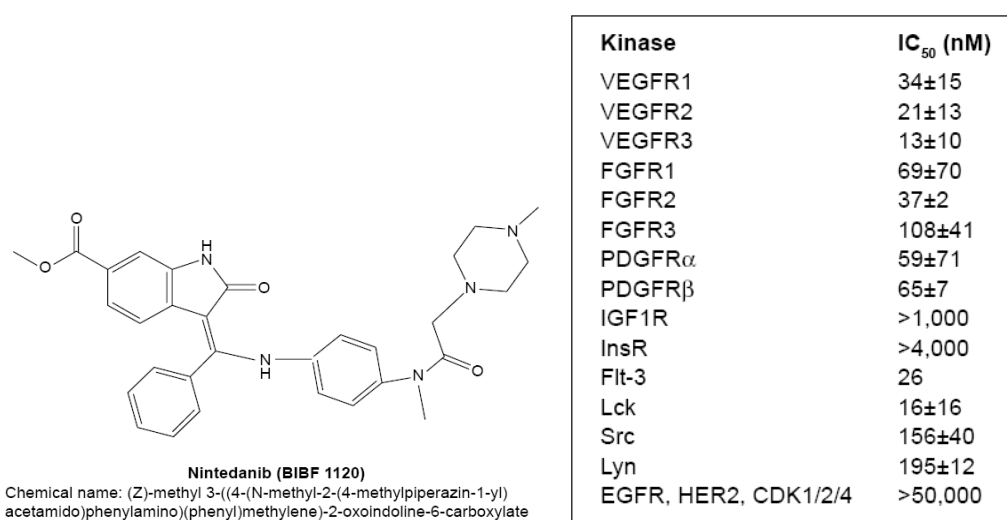


Figura 16. Estructura y constante de inhibición (IC₅₀) *in vitro* de nintedanib. Imagen modificada de Awasthi N et al. 2015²⁷¹.

En estudios *in vivo* en un modelo de ratón de IPF, nintedanib no sólo mostró tener un efecto anti-fibrótico al disminuir los marcadores de fibrosis TGFβ y colágeno, sino que también tuvo un poder anti-inflamatorio al reducirse diferentes células inflamatorias en el tejido pulmonar^{271, 274}.

Debido a su efecto antiangiogénico, como se ha comentado anteriormente, nintedanib también está indicado con el nombre de Vargatef® como tratamiento de segunda línea en el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) localmente avanzado, metastásico o localmente recurrente con histología tumoral de adenocarcinoma después de la quimioterapia de primera línea²⁷⁵. Asimismo, nintedanib está siendo estudiado en diferentes ensayos clínicos para evaluar su eficacia en otro tipo de tumores como son el

cáncer de ovario, el carcinoma de células renales, el cáncer de próstata, el carcinoma hepatocelular, el cáncer colorectal y el cáncer de mama²⁷¹.

2. HIPÓTESIS

2.1. HIPÓTESIS

- PDGF-BB tiene un papel importante en el proceso de regeneración muscular influenciando la proliferación, migración y diferenciación de las células encargadas del proceso de regeneración muscular.
- Nintedanib es efectivo como tratamiento de un modelo murino de distrofia muscular por déficit de distrofina (*mdx*) a través el del bloqueo de los receptores de PDGF lo que conduce a un enlentecimiento del proceso fibrótico muscular.

3. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Estudiar la importancia de los receptores PDGF y sus ligandos en la degeneración y regeneración de la distrofia muscular de Duchenne.

2.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

2.2.1. PAPEL DE PDGF-BB EN MÚSCULO ESQUELÉTICO

1. Conocer la influencia de PDGF-BB en la proliferación, migración y diferenciación de los mioblastos humanos y su efecto como tratamiento de un modelo murino de distrofia muscular de Duchenne
2. Conocer si la expresión de PDGF-BB y de su receptor (PDGFR β) se modifica en pacientes con distrofia muscular de Duchenne con relación a los controles sanos así como estudiar el papel de PDGF-BB en el proceso de regeneración muscular tras un daño agudo y crónico en un modelo celular humano y en modelos murinos.

2.2.2. ESTUDIO DE NINTEDANIB COMO AGENTE ANTI-FIBRÓTICO

3. Estudiar el efecto de nintedanib en los procesos de proliferación, migración y diferenciación de fibroblastos musculares controles humanos.
4. Estudiar la posible eficacia de nintedanib como agente anti-fibrótico en el ratón *mdx* de 9 meses de edad durante un mes tratamiento, mediante estudios funcionales, analíticos e histológicos.

4. ARTÍCULOS

4.1. ARTÍCULO I

The American Journal of Pathology, Vol. 187, No. 8, August 2017



The American Journal of
PATHOLOGY
ajp.amjpathol.org

MUSCULOSKELETAL PATHOLOGY

Platelet-Derived Growth Factor BB Influences Muscle Regeneration in Duchenne Muscle Dystrophy



Patricia Piñol-Jurado,^{*†} Eduard Gallardo,^{*†} Noemi de Luna,^{*†} Xavier Suárez-Calvet,^{*†} Carles Sánchez-Riera,^{*} Esther Fernández-Simón,^{*†} Clara Gomis,^{†‡} Isabel Illa,^{*†} and Jordi Díaz-Manera^{*†}

From the Neuromuscular Disorders Unit,^{*} Department of Neurology, Universitat Autònoma de Barcelona, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; the Network Research Center in Rare Diseases,[†] Barcelona; and the Department of Neurology,[‡] Hospital Universitario de la Fe, Valencia, Spain

Accepted for publication
April 5, 2017.

Address correspondence to
Jordi Díaz-Manera, M.D.,
Ph.D., Neuromuscular Disor-
ders Unit, Department of
Neurology, Hospital de la Santa
Creu i Sant Pau, C/Sant Antoni
M^o Claret 167, Barcelona
08025, Spain. E-mail: jdiazm@santpau.cat

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is characterized by a progressive loss of muscle fibers, and their substitution by fibrotic and adipose tissue. Many factors contribute to this process, but the molecular pathways related to regeneration and degeneration of muscle are not completely known. Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB belongs to a family of growth factors that regulate proliferation, migration, and differentiation of mesenchymal cells. The role of PDGF-BB in muscle regeneration in humans has not been studied. We analyzed the expression of PDGF-BB in muscle biopsy samples from controls and patients with DMD. We performed *in vitro* experiments to understand the effects of PDGF-BB on myoblasts involved in the pathophysiology of muscular dystrophies and confirmed our results *in vivo* by treating the *mdx* murine model of DMD with repeated i.m. injections of PDGF-BB. We observed that regenerating and necrotic muscle fibers in muscle biopsy samples from DMD patients expressed PDGF-BB. *In vitro*, PDGF-BB attracted myoblasts and activated their proliferation. Analysis of muscles from the animals treated with PDGF-BB showed an increased population of satellite cells and an increase in the number of regenerative fibers, with a reduction in inflammatory infiltrates, compared with those in vehicle-treated mice. Based on our results, PDGF-BB may play a protective role in muscular dystrophies by enhancing muscle regeneration through activation of satellite cell proliferation and migration. (*Am J Pathol* 2017, 187: 1814–1827; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.04.011>)

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a genetic disorder produced by mutations in the dystrophin gene.¹ Patients develop muscle weakness that progresses over years, producing severe impairment of the patient's mobility and requiring help for all daily life activities. This clinical progression is the result of a continuous loss of muscle fibers and their substitution by fibrotic and fat tissue.² The persistent damage of muscles that occurs in muscular dystrophy exhausts the pool of satellite cells—the main protagonists of muscle regeneration—and enhances the proliferation of fibro-adipogenic progenitor cells.^{2,3} Several growth factors and cytokines have been related to the processes of muscle degeneration and regeneration. These growth factors include transforming growth factor β ; IL-1 β ; IL-6; tumor necrosis factor α ; and, more recently, platelet-derived growth factors (PDGFs).^{4,5}

The family of PDGFs participates in several biological functions, such as cell proliferation, migration, and differentiation.⁶ All PDGFs are secreted as dimers of disulfide polypeptide chains by platelets, monocytes, endothelial cells, and other cell types.⁷ There are five types of PDGF dimers: the homodimers PDGF-AA, -BB, -CC, and -DD and the heterodimer PDGF-AB. Once released, these factors have a paracrine effect on surrounding PDGF receptor

Supported by the Fundacion Isabel Gemio, Mutua Madrileña de Seguros, Duchenne Parent Project Spain, Spanish Ministry of Health Fondo de Investigaciones Sanitarias (FISS) grants PI15/01822 (J.D.-M.) and PI12/02291 (E.G.), Myositis Association of the United States fellowship grant (X.S.-C.), Fundación Universia (C.S.-R.), and Fundació Caixa Enginyers (C.S.-R.).

Disclosures: Nintedanib was supplied by Boehringer Ingelheim.

(PDGFR)-positive cells.⁶ Mesenchyme-derived cells, such as satellite cells or pericytes, express PDGFR.^{8,9} The two PDGFR isoforms, α and β , each are capable of homo- or heterodimerization in the presence of PDGF. PDGF-AA and -CC activate PDGFR $\alpha\alpha$ homodimers, whereas PDGF-BB and -DD activate PDGFR $\beta\beta$ homodimers, *in vivo*.¹⁰ Once activated, PDGFR acquires tyrosine kinase activity, triggering multiple downstream pathways, such as Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (Akt), phospholipase C γ /protein kinase C, or STATs that finally regulate gene expression.⁷

PDGFs play a crucial role in early developmental processes, such as the formation of the neural crest, the spread of cells into growing tubular structures (eg, vessels or brachial pouches), and the proliferation of tissue-specific stromal cells (eg, dermal or renal fibroblasts).^{11–13} In adult humans, increased PDGF signaling has been related to several diseases, examples being atherosclerosis, cancer, and fibrosis.^{14–16}

The role of PDGFs in normal or pathologic skeletal muscle is not completely understood. It is known that PDGF-AA and -BB are secreted by muscle fibers in DMD patients.¹⁷ There is evidence to support a profibrotic role of PDGF-AA in muscle dystrophies: i) perivascular PDGFR α fibro-adipogenic progenitor cells proliferate after a muscle injury^{18,19}; ii) skeletal muscles from knock-in mice with PDGFR α -activating mutations in which there is a constitutive expression of PDGFR α , showed increased fibrotic tissue²⁰; and iii) treatment of *mdx* mice in a murine model of DMD—with PDGFR α antagonists—reduces skeletal muscle fibrosis.^{21,22}

In contrast, the role of PDGF-BB in skeletal muscle has not been clarified. Endothelial cells in healthy muscle express PDGF-BB, acting as a ligand for PDGFR β pericytes, which confer structural support to the vessel wall.²³ The role of PDGF-BB after muscle damage is unknown. It has been reported that PDGF-BB influences the proliferation of satellite cells in several animal species.^{24,25} Based on this previous finding, some authors have suggested that PDGF-BB could be relevant in muscle regeneration in patients with muscle diseases, but this concept has not been demonstrated.²⁶

Our aim was to study the possible role of PDGF-BB in muscle regeneration through a series of *in vitro* and *in vivo* experiments.

Materials and Methods

Muscle Biopsy

Muscle biopsies were performed as part of the diagnostic process in patients who visited the Neuromuscular Disorders Unit at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain). We studied the expression of PDGF-BB in muscle biopsy samples from patients with genetically confirmed

DMD ($n = 5$) and from patients undergoing orthopedic surgery but who were otherwise healthy (controls; $n = 5$). All participants signed an informed-consent form, and all of the procedures were in accordance with the principles set forth in the Declaration of Helsinki.

Immunofluorescence and Western Blot

Muscle samples were frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane, and serial 7-mm sections were cut with a cryostat (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Cell cultures were washed three times with phosphate-buffered saline and fixed with 4% paraformaldehyde at 4°C for 10 minutes. Cells and tissue sections were processed for microscopic evaluation as previously described.²⁷ Primary antibodies used in the experiments were rabbit anti-CD56 (Abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-PDGF-BB (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), mouse anti-human embryonic myosin heavy chain (Novocastra, Newcastle on Tyne, UK), mouse anti-murine embryonic myosin heavy chain (Hybridoma Bank, Iowa City, IA), rabbit anti-PDGFR β (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), mouse anti-CD4 (Dako North America, Carpinteria, CA), mouse anti-CD8 (Dako), mouse anti-CD68 (Dako), rabbit anti-collagen I (Abcam), rabbit anti-neural/glial antigen 2 chondroitin sulfate proteoglycan (EMD Millipore, Billerica, MA), mouse anti-desmin (Novocastra), mouse anti- α -smooth muscle actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), mouse anti-paired box protein (Pax) 7 antibody (Hybridoma Bank), rat anti-laminin (Abcam), and the lectin *Ulex europaeus* (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Appropriate Alexa-conjugated secondary antibodies were used.

Western blot analysis of cell cultures was performed as previously described.²³ We extracted proteins from the cell pellets with a buffer containing 125 mmol/L Tris, 4% SDS, 4 M urea, 5% mercaptoethanol, 1% glycerol, bromophenol blue 0.0002%, and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). The antibodies used for Western blot analysis were mouse anti-phospho-STAT-1 and mouse anti-STAT-1 (Santa Cruz Biotechnology); rabbit anti-p44/42 MAPK (Erk1/2), rabbit anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204), rabbit anti-Akt, and mouse anti-phospho-Akt (Ser473) (Cell Signaling Technologies); rabbit anti-collagen I (Abcam); and mouse anti-glyceraldehyde-3-phosphate (Sigma-Aldrich).

Isolation of Satellite Cells from Human Muscle Biopsy Samples

Human satellite cells were isolated from the muscle biopsy samples of patients with DMD and controls ($n = 3$ per group) as previously described.²⁸ Briefly, muscle biopsies were minced into 1- to 2-mm pieces, transferred onto collagen type I (Sigma-Aldrich) coated dishes, and incubated in proliferating medium at 37°C, 5% CO₂, and 5% O₂. Proliferating medium consisted of a mixture of Iscove

Piñol-Jurado et al

Dulbecco's modified Eagle's medium and M-199 medium (both from Lonza, Verviers, Belgium), in a 3:1 ratio, supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS; Lonza), 2 mmol/L L-glutamine (Lonza), 5 ng/mL basic fibroblast growth factor (PeproTech, Rocky Hill, NJ), and 1% penicillin–streptomycin (Lonza). After 5 to 7 days, cells started to sprout from the muscle explants. We isolated myoblasts using anti-CD56–coated microbeads (Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany) and confirmed that the purity of the samples was >95% performing immunofluorescence (IF) with antibodies anti-CD56 (Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, San Jose, CA) and anti-desmin (Leica Biosystems, Newcastle, UK) (Supplemental Figure S1). All experiments performed with myoblasts were repeated with the cells isolated from all patients ($n = 3$) and were replicated in triplicate.

Culture Studies: Myotubes and Wounding Assays

To obtain myotubes, human myoblasts were seeded at a density of 2500 cells/cm² using growth medium containing Dulbecco's modified medium/M-199 (3:1), 1% glutamine, 15% FBS, and 1% penicillin–streptomycin. Once myoblasts were confluent, we substituted this medium with a differentiation medium containing 2% FBS.

Several membrane-wounding assays were used for damaging myotubes: i) incubation with 0.25 mmol/L SDS for 2 minutes, followed by two washes with Hanks' balanced salt solution 1X (Lonza); ii) incubation with 5 μmol/L ionomycin (Sigma-Aldrich) for 5 minutes, followed by two washes with Hanks' balanced salt solution 1X; and iii) incubation of plates with 50 mg of glass beads in Hanks' balanced salt solution 1X medium (Sigma-Aldrich) on a shaker for 5 minutes.

After damage, myotubes were incubated with Hanks' balanced salt solution 1X medium for 10, 20, and 30 minutes. We measured the concentration of PDGF-BB in the supernatants using enzyme-linked immunosorbent assay (Human PDGF-BB Quantikine enzyme-linked immunosorbent assay; R&D Systems, Minneapolis, MN) following the manufacturer's instructions. To measure the concentration of creatine kinase, supernatants were concentrated using Centricon Plus filter devices with a 30-kDa molecular weight cutoff (EMD Millipore) according to the manufacturer's protocol. The samples obtained were analyzed in the Biochemistry Laboratory at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau using an architect ci16200 device (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL).

Culture Studies: Transwell Assays

Myoblasts (40,000 cells in Opti-MEM I medium; Lonza) were deposited into Falcon insert (3-μm–diameter pores; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) and placed on top of a well containing PDGF-BB concentrations of 10, 50, and 100 ng/mL (R&D Systems); PDGF-BB

incubated previously with blocking anti-PDGF-BB antibody (EMD Millipore) for 1 hour at 37°C; or anti-PDGF-BB antibody alone. The culture inserts were incubated at 37°C for 24 hours.

We counted the cells present in the lower well and in the membrane. Chemotaxis toward Opti-MEM I medium was considered as nonspecific. The cells present in the insert were fixed in ethanol 70% for 10 minutes and stained for 30 minutes with crystal violet (Sigma-Aldrich). After three washes with phosphate-buffered saline, filters were cut, mounted onto a slide, and observed with an Olympus microscope (Olympus, Center Valley, PA).

Proliferation and Differentiation Assays

To study the specific influence of PDGF-BB on cell proliferation, we plated myoblasts with a concentration of 3500 cells/cm² and cultured them in a basal medium that contained only 1% FBS. We added to the medium PDGF-BB (R&D Systems) at a concentration of 10 nmol/L. Fresh PDGF-BB was added to the medium every 24 hours for 6 days. In parallel we also analyzed cell proliferation on an FBS-enriched medium; we plated myoblasts with a concentration of 3500 cells/cm² and cultured them in proliferating medium with or without PDGF-BB at a concentration of 10 nmol/L. For studying the effect of nintedanib (kindly donated by Boehringer Ingelheim, Rhein, Germany), a tyrosine kinase inhibitor that blocks the PDGFR, it was added to the proliferation medium at a concentration of 500 nmol/L. For counting the cells, the cultures were trypsinized and cells were stained with Trypan Blue. Living cells were counted in a hemocytometer.

For studying differentiation, myotubes obtained from three different conditions were compared: control myotubes, myotubes obtained from a differentiation medium containing 10 ng/mL PDGF-BB, and myotubes obtained from a differentiation medium containing 50 ng/mL PDGF-BB. After 7 days in differentiation medium, cultures were fixed and we performed IF using antibodies against developmental myosin and DAPI for the nuclei. We obtained images of 10 areas randomly at 20× magnification from every culture condition with the microscope. Images were analyzed using Adobe Photoshop software version CS6 (Adobe Systems, San Jose, CA). We assessed the differentiation rate by counting the total number of nuclei present in developmental myosin-positive myotubes versus the total number of nuclei.

Analysis of Intracellular Pathways

For these experiments, myoblasts were cultured overnight with 1% FBS Dulbecco's modified Eagle's medium. The following day, cells were treated with 10 ng/mL PDGF-BB for 15 minutes and fixed. A group of cells were pretreated with the tyrosine kinase inhibitor nintedanib at a concentration of 500 nmol/L for 2 hours before PDGF-BB treatment.

RNA Extraction and Reverse Transcription

Total RNA from cells was isolated using TRIzol following the manufacturer's instructions (InvitroGen, Carlsbad, CA) and stored at -80°C . RNA was reverse-transcribed from 1 μg of total RNA using the High-Capacity cDNA Reverse-Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA).

qPCR

Real-time quantitative (qPCR) of cDNA obtained from cells and tissues was performed using TaqMan Universal PCR Master Mix and the 7900HT Fast Realtime PCR System (both from Applied Biosystems). mRNA-specific fluorescein amidite-labeled primers/probe were purchased from Applied Biosystems for detecting cDNA from the following genes: *PDGFB* (Hs00966522_m1), *MYOD1* (Hs00159528_m1), *GAPDH* (Hs99999905_m1), and *Pdgfb* (Mm00440677_m1). All experiments were performed in triplicate. Relative quantification was performed using the comparative Ct method, and all results were compared with the control samples for each treatment after normalization to an endogenous control (glyceraldehyde-3-phosphate) using the Relative Quantification Manager 7900 HT Fast Real-Time PCR System software package version 2.4.1 (Applied Biosystems). Data in bar graphs are expressed as the means \pm SD of three independent samples.

In Vivo Treatment with Notexin

To investigate whether acute damage in skeletal muscle could increase the expression of PDGF-BB, we treated 5-month-old C57 (control) and *mdx* mice ($n = 21$ per group) with a single i.m. injection of 50 μL of Notexin Np (Latoxan S.A.S., Portes-lès-Valence, France) in the tibialis anterior muscles. We obtained the muscles injected at 1 and 24 hours and 3, 7, 15, and 21 days after damage (all time points, $n = 3$) and compared them with those from nontreated animals ($n = 3$). We studied muscle structure using hematoxylin and eosin staining and analyzed the expression of PDGF-BB using IF. In parallel, we quantified PDGF mRNA levels after damage as described in *qPCR*.

In Vivo Treatment with Repeated Injections of PDGF-BB

We used 8-month-old *mdx* mice for the *in vivo* experiments. Four mice were treated with repeated i.m. injections of PDGF-BB. We injected 100 μL at 50 ng/mL concentration, two times per week for 1 month in both tibialis anterior muscles. In parallel, four mice were treated with repeated i.m. injections of 100 μL of saline solution (vehicle) using the same protocol. Four nontreated *mdx* mice were used as controls. After treatment, the animals were sacrificed, and both tibialis anterior muscles were isolated for histologic analysis.

Using an Olympus microscope at $20\times$ magnification, we obtained images of five random areas from each muscle biopsy sample. Images were analyzed using Adobe Photoshop software (Adobe Systems). To estimate the number of satellite cells, we performed double IF with the antibodies anti-Pax7 and anti-laminin, adding DAPI to identify the nuclei of the cells and myofibers. We counted the total number of Pax7⁺ cells and the total number of cells using DAPI. Moreover, we counted the total number of myofibers. The number of satellite cells was expressed as the ratio of Pax7⁺ cells to the total number of DAPI cells. We also analyzed the ratio of Pax7⁺ cells to the total number of fibers. A cross-sectional area of muscle fibers was analyzed using ImageJ software version 1.49 (NIH, Bethesda, MD; <http://imagej.nih.gov/ij>). To analyze inflammation in the muscles, we counted all F4/80⁺ cells present in the muscle sections. We expressed the result as the ratio of F4/80⁺ cells to the total number of DAPI nuclei. Finally we analyzed the collagen I⁺ area using ImageJ software.

Statistical Analysis

We used the *t*-test to compare quantitative measures between samples, and analysis of variance to study repeated measures. Statistical significance was obtained at $P < 0.05$. Statistical studies were performed with IBM SPSS Statistics software version 21 (IBM, Armonk, NY), and graphics were developed using DataGraph software version 4.0 (Visual Data Tools; <http://www.visualdatatools.com/DataGraph>).

Results

PDGF-BB Expression in Control Patients and in Patients with DMD

In muscle biopsy samples obtained from controls ($n = 5$), we observed that PDGF-BB was expressed in the vessel wall of capillaries but not in muscle fibers (Figure 1, A and C). Conversely, in muscle biopsy samples from DMD patients, PDGF-BB was expressed in vessels but also in the sarcoplasm of many muscle fibers (Figure 1, B and D) and in inflammatory infiltrates (Figure 1, F–N). We observed that both CD8⁺ T cells and CD4⁺ T cells and also CD68⁺ cells (macrophages) expressed PDGF-BB. Satellite cells did not express PDGF-BB *in vivo* (Supplemental Figure S2). qPCR showed an increased expression of PDGF-BB in muscle biopsy samples from patients with DMD compared with those from controls (Figure 1E).

PDGF-BB Is Expressed in Regenerating Fibers and Necrotic Fibers

We observed that, in many cases, several PDGF-BB⁺ muscle fibers were pale on hematoxylin and eosin staining, suggesting that the fibers were necrotic (Figure 2, A and B).

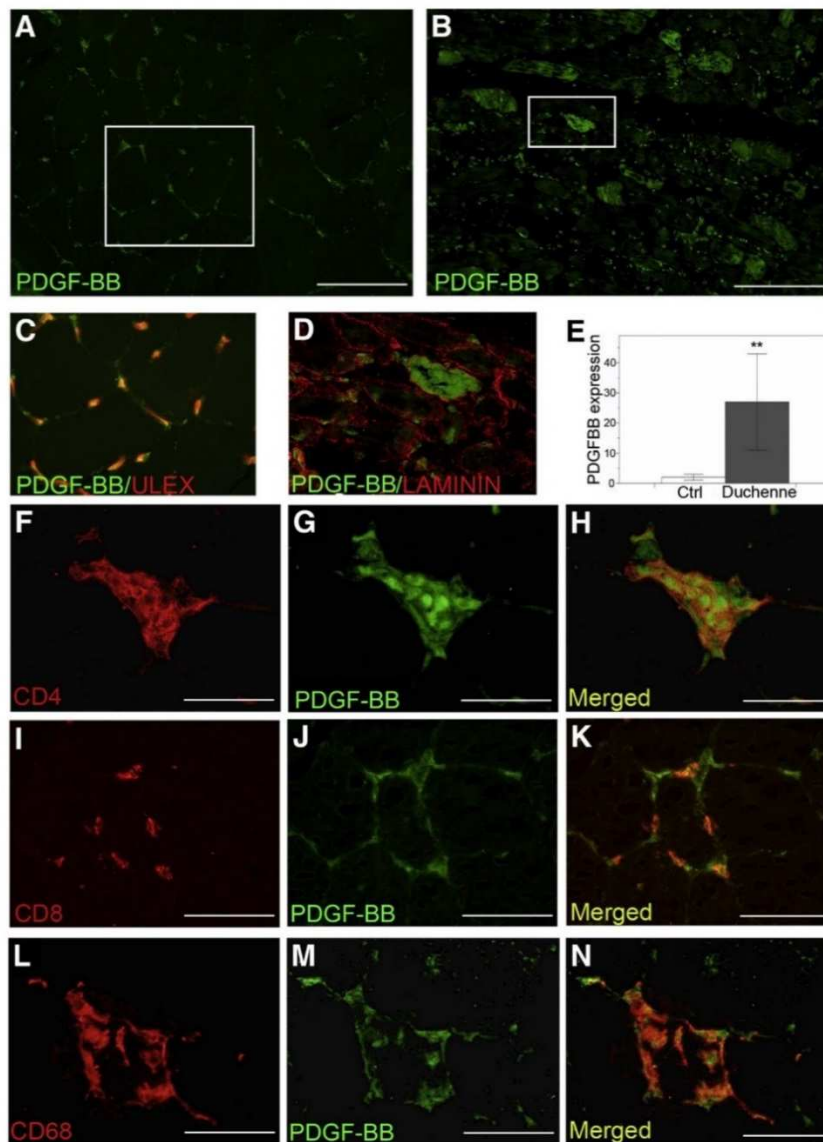


Figure 1 Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB expression in healthy and pathologic muscle. The expression of PDGF-BB was studied using immunohistochemistry analysis in biopsy samples from healthy muscle (A and C) and in Duchenne dystrophic muscle (DMD; B and D). In healthy muscle, PDGF-BB was expressed in the vessel wall (boxed region from A is detailed in C). In muscle from DMD patients, PDGF-BB was also expressed in muscle fibers (boxed region from B is detailed in D). The expression of PDGF-BB in inflammatory infiltrates in muscle biopsy samples from patients with DMD was detected: CD4⁺ T cells (F–H), CD8⁺ T cells (I–K), and CD68⁺ macrophages (L–N); real-time quantitative PCR performed on cDNA obtained from control (Ctrl) muscle and from muscle of patients with DMD shows increased expression of *PDGFB* in DMD muscle biopsy samples (E). Data are expressed as means ± SD (E). $^{***}P < 0.01$ (*t*-test). Scale bars: 200 μ m (A and B); 50 μ m (F–N).

However, we also observed that many PDGF-BB fibers expressed developmental myosin, a known marker of regenerative fibers (Figure 2, C and D). To confirm this observation *in vitro*, we cultured myoblasts from controls

and patients with DMD and differentiated them into myotubes. Using IF, we observed that myotubes expressed higher levels of PDGF-BB than did myoblasts (Figure 2, E–J). A significant increase in mRNA levels of *PDGFB* in

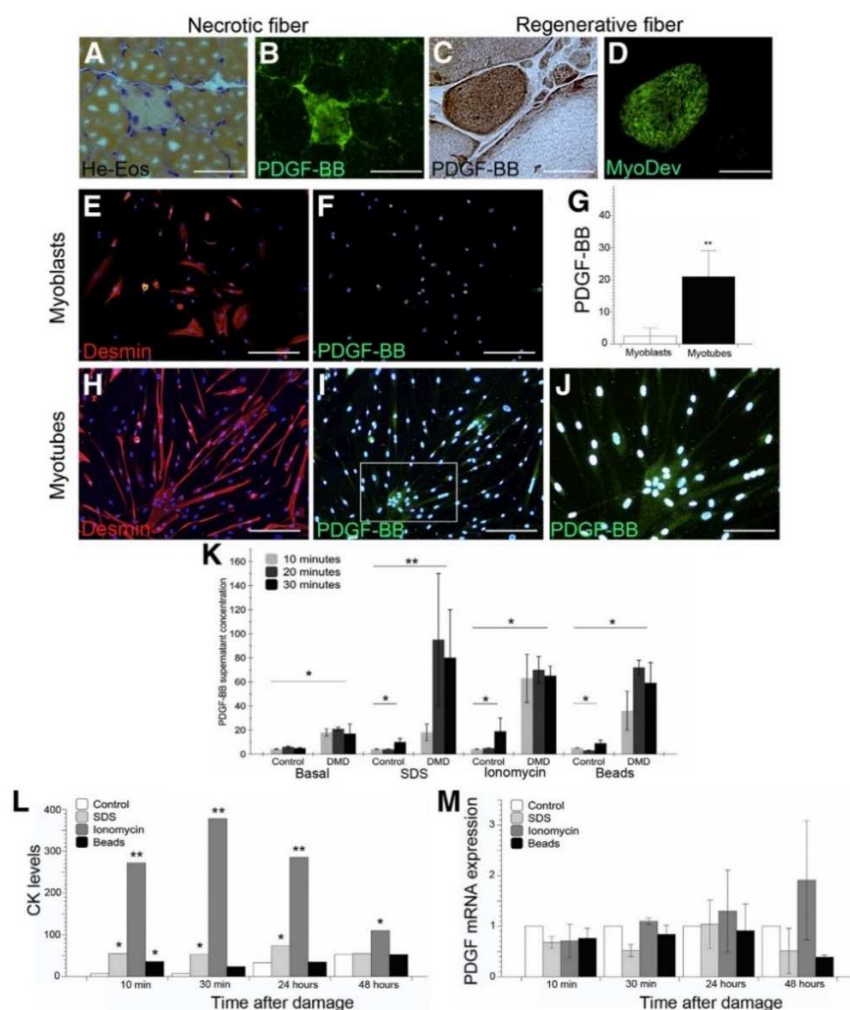


Figure 2 Regenerating and necrotic myofibers and myotubes express platelet-derived growth factor (PDGF)-BB. **A–D:** PDGF-BB is expressed *in vivo* by necrotic fibers (**A** and **B**) and by regenerative developmental myosin (MyoDev)-positive fibers (**C** and **D**). PDGF-BB is more highly expressed in myotubes compared with undifferentiated myoblasts. **E–J:** Double immunofluorescence shows expression of PDGF-BB by multinucleated myotubes (**H–J**) but not in nondifferentiated myoblasts (**E** and **F**) (the boxed region from **I** is detailed in **J**). Relative quantification of *PDGFB* mRNA in healthy skeletal muscle cultures shows a 33-fold increase in *PDGFB* in myotubes compared with controls (**G**). **K:** Expression of PDGF-BB by enzyme-linked immunosorbent assay in supernatants of myotubes obtained from DMD patients and controls after the induction of a chemical (SDS and ionomycin) or a physical (glass beads) injury. **L:** Quantification of creatine kinase levels in supernatants of control damaged myotubes 10 and 30 minutes and 24 and 48 minutes after damage. **M:** Relative quantification of *PDGFB* mRNA in damaged myotube cultures obtained from control patients. Data are expressed as means \pm SD (**G**, **K**, and **M**). $n = 5$ (**G**, **K**, and **L**); $n = 3$ DMD patients (**K**). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Scale bars: 50 μ m (**A–D**); 200 μ m (**E**, **F**, **H**, and **I**); 100 μ m (**J**). He-Eos, hematoxylin and eosin.

myotubes compared with those in undifferentiated myoblasts was observed using qPCR ($n = 3$; $P = 0.045$; *t*-test) (Figure 2G).

To investigate whether an injury can release PDGF-BB from inside muscle fibers, we induced a chemical injury (SDS and ionomycin) or a physical injury (glass beads) in

myotubes obtained from the myoblasts of controls and DMD patients ($n = 3$ per group). We subsequently analyzed PDGF-BB concentrations in culture supernatants using enzyme-linked immunosorbent assay. We observed that the concentration of PDGF-BB was increased progressively in all samples after damage (Figure 2K). The

increase was significantly greater ($P < 0.05$; analysis of variance) and occurred earlier in the myotubes from DMD patients than in those from controls. Creatine kinase level in the supernatant of cultures was increased just after damage and returned to normal value at 48 hours after the initial lesion (Figure 2L). *PDGFB* mRNA, however, remained unchanged despite the damage (Figure 2M).

PDGFR β Is Expressed in Muscle Fibers, Pericytes, and Satellite Cells in Muscle Biopsy Samples from Patients with Muscular Dystrophies

It is well known that PDGF-BB has a paracrine effect on PDGFR β ⁺ cells.⁶ For this reason, we analyzed which cells expressed PDGFR β in muscle biopsy samples from controls and DMD patients ($n = 5$ per group). PDGFR β was expressed in vessel wall (Figure 3A) in controls. We identified PDGFR β in vessel-associated cells (Figure 3, B–D) expressing neural/glial antigen 2 (Figure 3, E–H) and smooth muscle actin (Figure 3, I–L). These cells might be pericytes, as they have been previously shown/demonstrated to express PDGFR β .⁸ In patients with DMD, we found that PDGFR β was expressed in vessels and also in the sarcolemma (Figure 3, M–O) and sarcoplasm (Figure 3, M–O) of some muscle fibers (Figure 3B). Satellite cells expressing CD56⁺ were also positive for PDGFR β (Figure 3, P–V). Myoblasts isolated from muscle biopsy samples expressed PDGFR β in culture (Supplemental Figure S2), supporting the results obtained *in vivo*. CD4 and CD68 cells did not express PDGFR β *in vivo* in muscle biopsy samples from patients with DMD (Supplemental Figure S3).

Injection of Notexin into Skeletal Muscle of Control Mice Increases Expression of Pdgf-BB

Acute damage after injection of notexin or cardiotoxin in skeletal muscle has been widely studied.²⁹ In wild-type muscle, we observed widespread necrotic fibers 24 hours after injection (Figure 4, A and B). After 3 days, inflammatory infiltrates coexisted with incipient regenerating fibers (Figure 4C), which were more prominent at 7 days (Figure 4D). At 21 days, muscle regeneration was complete (Figure 4E). Sequence of muscle damage in *mdx* mice was similar, although there were some differences. Inflammatory infiltrates appeared earlier; at 24 hours, groups of necrotic fibers were undergoing phagocytosis (Figure 4, K and L). At 3 days, inflammatory cells coexisted with regenerating fibers (Figure 4M), which were predominant at 7 days (Figure 4N). Pdgf-BB expression in skeletal muscle was clearly increased after damage (Figure 4, F–J). Muscle fibers [both necrotic (Figure 4, H and Q) regenerating (Figure 4, I and R)] and inflammatory infiltrates produced Pdgf-BB. In control muscles, *Pdgfb* progressively increased, peaking at 3 days, which coincided with maximum inflammatory infiltration and with the start of the regeneration process (Figure 4U). Then, *Pdgfb* levels

decreased progressively and returned to normal values at 21 days, when skeletal muscle regeneration was completed. In *mdx* mice, *Pdgfb* levels started increasing earlier (Figure 4U). We observed a first peak at 24 days, which coincided with the inflammatory infiltration. The high levels persisted at 3 days, when many incipient regenerating fibers could be detected, and then it progressively decreased, returning to normal levels at 21 days after damage.

Influence of PDGF-BB on Myoblast Proliferation, Chemotaxis, and Differentiation

We analyzed the effects of PDGF-BB on proliferation, migration, and differentiation of myoblasts isolated from human skeletal muscles. PDGF-BB significantly increased the proliferation of myoblasts after 4 and 6 days of treatment at concentrations of 10 ng/mL both in proliferation medium enriched with FBS ($n = 3$; $P = 0.03$; analysis of variance) (Figure 5A) and in more demanding culture conditions, such as a medium containing only 1% FBS and PDGF-BB ($P = 0.02$; analysis of variance) (Figure 5B). Nintedanib completely reversed the effect of PDGF-BB on myoblast proliferation (Figure 5, A and B). PDGF-BB did not have any effect on the differentiation of myoblasts to myotubes. We detected a variation in neither the differentiation ratio nor in the number of nuclei per myotube after adding 10 or 50 ng/mL PDGF-BB to the culture medium (Figure 5, C and D and F–H). Moreover, we did not observe differences in the mRNA levels of *MYOD1* in myoblasts treated with 10 ng/mL PDGF-BB for 24 hours (Figure 5E). PDGF-BB produced a statistically significant increase in the chemotaxis of myoblasts in a dose-dependent manner ($P < 0.05$; *t*-test) (Figure 5I).

To explore the molecular basis of the biological effect produced by PDGF-BB on myoblasts, we studied the intracellular pathways activated by PDGF-BB after 15 minutes of treatment. We observed that 10 ng/mL of PDGF-BB significantly increased phosphorylated (p)-AKT levels in myoblasts ($P = 0.001$; *t*-test), whereas it had no effect on the phosphorylation of ERK1/2 or STAT-1 (Figure 5, J and K). Nintedanib blocked phosphorylation of Akt after treatment with PDGF-BB.

Treatment of *mdx* Mice with PDGF-BB Enhances Muscle Regeneration

We studied whether the treatment of *mdx* mice with i.m. injections of PDGF-BB would induce an expansion of the satellite cell pool *in vivo* as a proof of principle. We treated four *mdx* mice twice a week with i.m. injections of PDGF-BB. After 1 month of treatment, muscles from PDGF-BB-treated animals were clearly different from those of vehicle-treated mice. We observed a clear reduction in inflammatory infiltrates (Figure 6, A–D and M–P) in muscles treated with PDGF-BB compared with those in

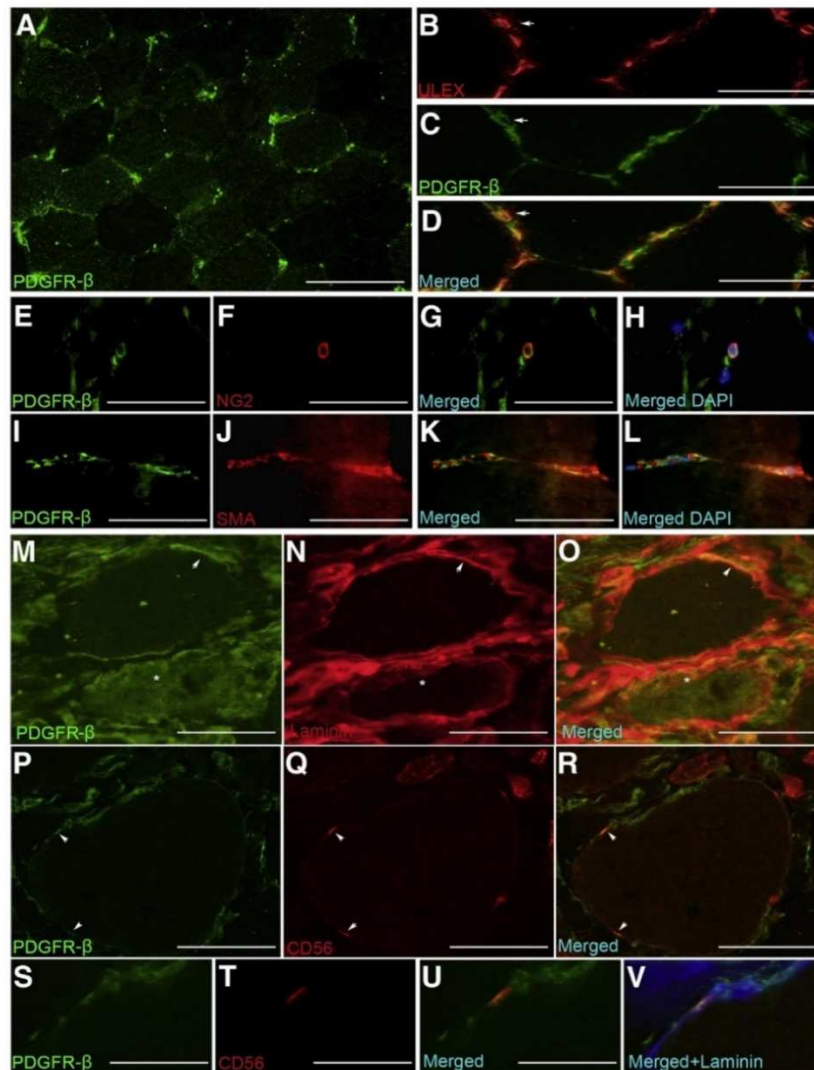


Figure 3 Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)- β expression in control and dystrophic muscle biopsy samples. **A–D:** PDGFR- β is expressed by perivascular cells in control muscle biopsy samples. **Arrows in B–D** show a PDGFR- β^+ cell (**C**) close to a *Ulex*⁺ capillary (**B**). **E–O:** PDGFR- β^+ cells co-express neural/glial antigen 2 (**E–H**) and smooth muscle actin (**I–L**), probably being pericytes. In Duchenne muscle biopsy samples, sarcolemma and sarcoplasm in some muscle fibers were also stained (**M–O**). **Arrows in M–O** show sarcolemma of a muscle fiber stained by laminin and PDGFR- β^+ . **Asterisks in M–O** show sarcoplasm of a muscle fiber stained with PDGFR- β^+ . **P–V:** Satellite cells co-express CD56 and PDGFR β in Duchenne muscle dystrophy patients. **Arrowheads in P–R** show two satellite cells co-expressing CD56 and PDGFR- β^+ . Scale bars: 50 μ m (**A–D**); 200 μ m (**E–G**, **I**, **K**, and **M–U**); 100 μ m (**J**).

controls (nontreated) and vehicle-treated muscles. The population of Pax7⁺ satellite cells was increased significantly in muscle from PDGF-BB-treated *mdx* mice compared with those from nontreated and vehicle-treated *mdx* mice ($P = 0.03$; *t*-test) (Figure 6, E–H). The increase in the population of satellite cells was

associated with an increase in the number of regenerative muscle fibers (11.8% in PDGF-BB-treated muscle versus 6.93% in vehicle-treated muscle) ($P = 0.04$; *t*-test) (Figure 6, I–L) and a reduction in the cross-sectional area of the fibers ($P = 0.03$; *t*-test) (Figure 5D). Collagen I expression was not influenced by injection of PDGF-BB;

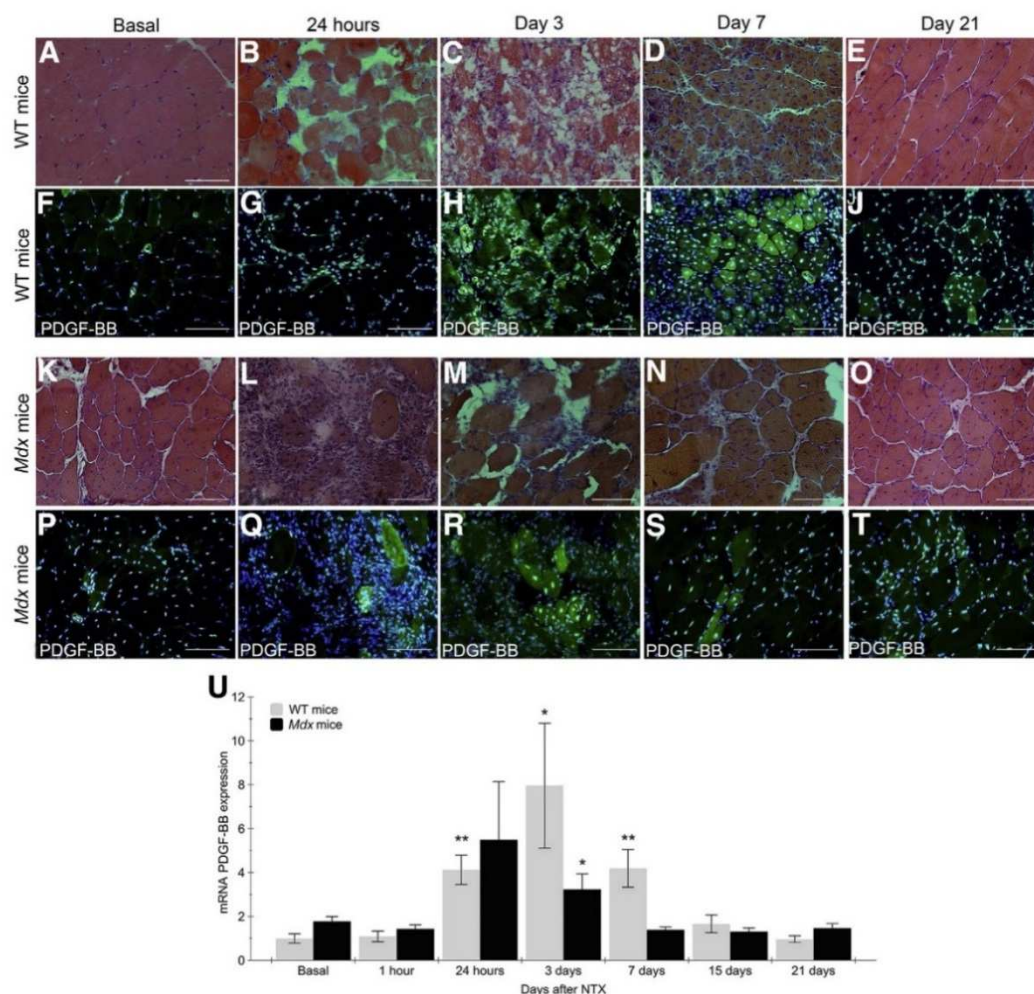


Figure 4 Study of platelet-derived growth factor (PDGF)-BB expression after acute damage produced by notexin in healthy C57 and dystrophic *mdx* mouse models. **A–T:** The panels show the process of muscle regeneration in healthy C57 (**A–J**) and dystrophic *mdx* (**K–T**) mouse models after notexin injection. **A–E:** Hematoxylin and eosin (H&E) staining. **A:** Muscle structure at baseline, before notexin injection. **B:** Necrotic fibers and normal fibers 24 hours after injection, with no inflammation. **C:** Widespread inflammatory infiltrates surrounding necrotic muscle fibers 3 days after injection. **D:** Several regenerating muscle fibers 7 days after injection, characterized by basophilic internal nuclei. **E:** Complete muscle regeneration 21 days after injection, but evidencing the presence of internal nuclei in many fibers. **F–J:** PDGF-BB expression in muscles from control mice after notexin injection. **F:** Only vessels at baseline express PDGF-BB. **G:** PDGF-BB expression 24 hours after injection. **H:** PDGF-BB expression by necrotic fibers. **I and J:** Regenerative muscle fibers with internal nuclei express PDGF-BB. **K–O:** Muscle structure of *mdx* mice after notexin injection (H&E staining). **K:** Mild dystrophic changes. **L:** Inflammatory infiltrates surrounding necrotic fibers are clearly seen at 24 hours after injection. **M:** Scarce inflammatory infiltrates are still observed at 3 days and are associated to many small regenerative fibers. **N:** Regenerative fibers are clearly observed at 7 days. **O:** Complete muscle regeneration is detected, although muscle structure is clearly dystrophic at 21 days after injection. **P–T:** PDGF-BB expression studied using immunofluorescence in *mdx* mice. **P:** PDGF-BB is expressed by vessels and some muscle fibers at baseline. **Q:** Necrotic fibers express PDGF-BB at 24 hours after notexin injection. **R and S:** Regenerative fibers express PDGF-BB at 3 and 7 days after the injection. **T:** At 21 days, PDGF-BB expression is evident in the sarcoplasm of some muscle fibers. *Pdgfb* levels increase after muscle damage in both animal models. In C57 mice, levels peak at 3 days, whereas in the *mdx* mice, *Pdgfb* levels reach the maximum at 24 hours. **U:** In both cases, *Pdgfb* levels return to normal basal levels at 21 days after muscle damage. Data are expressed as means \pm SD (**U**). $n = 3$ (**U**). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Scale bars = 100 μ m. NTX, notexin; WT, wild type.

we did not detect significant changes in the area covered by collagen I in muscle tissue and we did not observe differences in the expression of collagen I using Western blot analysis (Supplemental Figure S4).

Discussion

Our study demonstrates that PDGF-BB may influence the process of muscle regeneration in patients with DMD. We

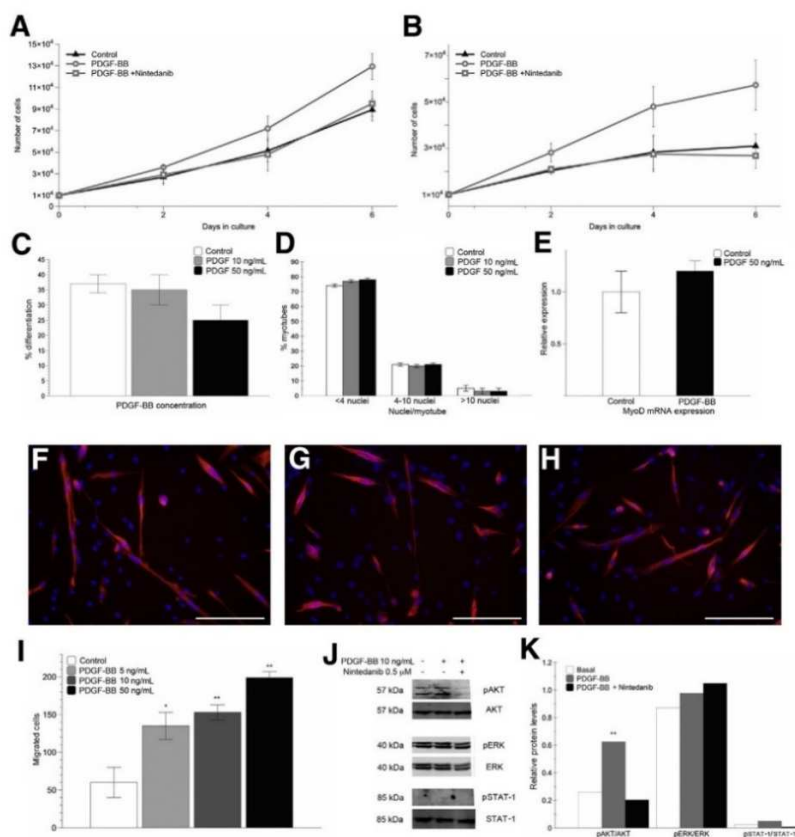


Figure 5 Functional effect of platelet-derived growth factor (PDGF)-BB on myoblasts in culture. **A** and **B**: PDGF-BB enhances proliferation of myoblasts both in 20% enriched proliferation medium (**A**) and in low serum (1% fetal bovine serum) conditions (**B**). Significant differences are observed at days 4 and 6 of culture in both cases. **C** and **D**: PDGF-BB does not have any effect on the differentiation of myoblasts to myotubes using the following parameters: differentiation ratio (**C**) and mean number of nuclei per myotube (**D**). **E**: Expression of MyoD in myoblasts treated with PDGF for 24 hours is not significantly different from that observed in nontreated myoblasts (*t*-test). **F–H**: Myotubes cultured in a differentiation medium not enriched with PDGF-BB (**F**), cultured in a medium enriched with 10 ng/mL PDGF-BB (**G**), and cultured in a medium enriched with 50 ng/mL PDGF-BB (**H**). **I**: PDGF-BB enhances chemotaxis of myoblasts in a dose-dependent manner (*t*-test). **J** and **K**: PDGF-BB activates protein kinase B (AKT) phosphorylation in myoblasts but does not have any effect on phosphorylation of ERK or STAT-1. Data are expressed as means \pm SD (**C–E**, **I**). *n* = 3 (**A–E**, **I**, and **K**). **P* < 0.05, ***P* < 0.01. *P* < 0.05 [**B**, days 4 and 6 (*t*-test)]. Scale bars = 50 μ m (**F–H**). MyoD, myogenic differentiation 1.

base our conclusion on the following key results: i) PDGF-BB was secreted by necrotic and regenerative fibers and by inflammatory infiltrates in muscle biopsy samples from patients with DMD; ii) myotubes expressed higher levels of PDGF-BB than did undifferentiated myoblasts in culture; iii) secretion of PDGF-BB from damaged mature myotubes after chemical and physical damage was detected; iv) PDGF-BB expression in notexin-injured muscle was clearly increased, coinciding with infiltration of inflammatory cells and muscle regeneration; v) PDGF-BB activated myoblasts, inducing their proliferation and migration; and vi) treatment of *mdx* mice with i.m. injections of PDGF-BB increased the

population of satellite cells and the number of regenerative fibers.

We previously reported that the population of satellite cells increases in biopsy samples from patients with DMD and Becker muscle dystrophy.³⁰ To determine which factors could influence this increase, we studied PDGFs because they have been related to the proliferation of several mesenchymal cells.^{23,31} We found that PDGF-BB was the member of the PDGF family that displayed the highest level of expression in muscle biopsy samples from DMD patients (data not shown). Zhao et al¹⁷ had already reported an increased expression of PDGF-BB in muscle fibers from DMD patients, although their results were based only in IF

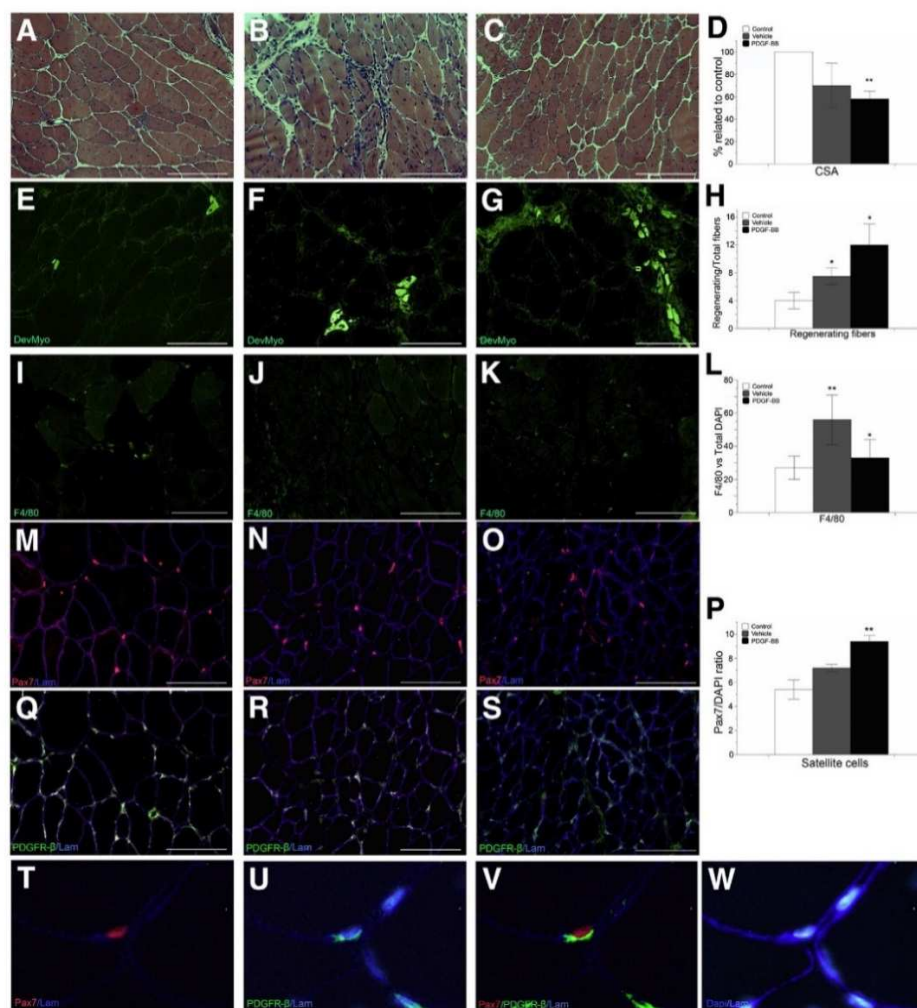


Figure 6 Treatment of *mdx* mice with platelet-derived growth factor (PDGF)-BB enhances muscle regeneration and proliferation of satellite cells and pericytes. **A–C:** Muscle from *mdx* mice treated with an i.m. injection of PDGF-BB show significant histologic changes compared with vehicle-treated muscle. More regenerative fibers that are smaller, and fewer inflammatory cells, are observed. **D:** Cross-sectional area of muscle fibers is smaller in PDGF-BB-treated muscles. **E–H:** The number of developmental myosin (DevMyo)-expressing fibers is significantly increased in PDGF-BB-treated muscles compared with nontreated (control) muscles and vehicle-treated muscles. **I–L:** The population of inflammatory cells invading muscles treated with PDGF-BB decreases compared with that in vehicle-treated muscles. **M–P:** The population of paired box 7 protein (Pax7) satellite cells significantly increases in PDGF-BB-treated muscles compared with that in nontreated muscles and vehicle-treated muscles. **Q–V:** Most of the Pax7⁺ cells also express PDGF receptor (PDGFR)- β . Data are expressed as means \pm SD (**D**, **H**, **L**, and **P**). $n = 4$ per group (**D**, **H**, **L**, and **P**). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Scale bars = 50 μ m. Original magnification: $\times 400$ (**T–W**). Lam, laminin.

and were not confirmed using Western blot analysis, qPCR, or *in vitro* studies as we performed in our study. We observed that PDGF-BB⁺ muscle fibers expressed markers of muscle regeneration, such as developmental myosin, suggesting that PDGF-BB could have an effect in the process of muscle regeneration *in vivo*. Our *in vitro* results supported this hypothesis: *PDGFB* increased during differentiation from myoblast to myotubes. Moreover, we have observed that PDGF-BB is quickly released by myotubes

after chemical or physical damage and then can activate surrounding cells. We have also observed that many necrotic fibers expressed PDGF-BB *in vivo*, suggesting that PDGF-BB could function as a regeneration signal released by fibers after injury, as described in other tissues such as bone or liver.^{32,33} The results of our notexin-induced muscle damage support this fact. PDGF-BB expression was clearly increased after acute damage, coinciding with the inflammatory infiltrate and the start of the regeneration process

mimicking that has been described with other well-known promitotic factors, such as hepatic growth factor, fibroblast growth factor, and insulin growth factor.^{29,34,35} PDGFs act primarily as paracrine growth factors, so it is likely that the release of PDGF-BB from regenerating muscle fibers has an effect on surrounding cells expressing PDGFR β , such as pericytes or satellite cells.^{36,37}

Satellite cells in a quiescent state are located beneath the basal lamina of healthy muscle fibers.^{5,36} After damage, satellite cells are activated and then proliferate and differentiate into myoblasts, fusing to injured muscle fibers and contributing to muscle regeneration.³⁸ Satellite cells are activated in response to several signals from regenerative microenvironment, such as adhesion molecules, necrotic cues released from damaged fibers, and growth factors and cytokines produced by neighboring cells. Several growth factors, including hepatic growth factor, fibroblast growth factor, IL-1, IL-6, insulin growth factor, influence the proliferation of satellite cells.^{39–42} It is well known that PDGFs are potent mitogens for a variety of mesenchymal cell types.⁶ It has been previously described that PDGF-BB enhances the proliferation of myoblasts obtained from several animal species, such as the mouse, rat, and chicken.^{24–26} We have observed a homologous effect in human myoblasts. The fact that this process seems to be conserved along the vertebrate lineage, supports an important role of PDGF-BB in proliferation of satellite cells. Phosphorylation of PDGFR β activates several well-characterized intracellular signaling pathways such as MAPK/ERK, phosphoinositide 3-kinase/Akt, and protein kinase C, which are known to be involved in multiple cellular responses.⁴³ Some of these pathways, including Akt, ERK1/2, and STATs, have also been involved in the proliferation of myoblasts.^{44–46} Here, we observed that PDGF-BB enhanced Akt phosphorylation, but in contrast it had no effect on the MAPK/ERK or Janus kinase (JAK)/STAT pathway.

To differentiate and fuse into damaged fibers, proliferating myoblasts must migrate and establish stable cell contact.⁴⁷ Cell migration is therefore essential for adult muscle repair. The effect of several factors on myoblast migration has been previously studied, yet the process of cell migration is not completely understood. PDGF-BB has a well-characterized role in the migration of many different mesenchymal cells during organogenesis and in disease.^{6,13,48} In the case of skeletal muscle, PDGF-BB orchestrates the migration of murine embryonic myoblasts from somites toward the limb.⁴⁹ Hereby we have shown that PDGF-BB enhanced satellite cell migration *in vitro* in a dose-dependent manner. Based on our observations it is tempting to hypothesize that PDGF-BB released by regenerating muscle fibers activates satellite cell proliferation and migration of these cells toward muscle fibers.

We have observed that PDGF-BB does not have any effect on the differentiation of myoblasts *in vitro*. It has been previously reported that PDGF-BB delayed and

decreased the differentiation process of myoblasts *in vitro*.^{24,50} However, Jin et al^{24,50} reported that PDGFR mRNA rapidly decreased once differentiation of rat myoblasts started, suggesting that PDGF-BB acts only on proliferating myoblasts and not on myoblasts undergoing differentiation *in vitro*. Our results support this hypothesis; we did not observe any effect in the differentiation index of myoblasts *in vitro*. In contrast, we observed that treatment of *mdx* mice with repeated i.m. injections of PDGF-BB increased the number of satellite cells, confirming the positive effect on proliferation of PDGF-BB. Consequently, the number of regenerative fibers increased, suggesting that PDGF-BB did not decrease the ability of satellite cells to differentiate *in vivo*.

We confirmed our *in vitro* results with an *in vivo* model of DMD as a proof-of-principle approach. We observed that the treatment of *mdx* mice with repeated i.m. injections of PDGF-BB produced increases in the population of satellite cells and in the number of regenerative fibers. Inflammatory infiltrates were also reduced and muscle tissue fibrosis did not increase. These observations demonstrate that PDGF-BB could promote muscle regeneration in a murine model of DMD. Muscle degeneration in patients with muscular dystrophies is a complex process produced by the confluence of different factors.⁵¹ On one hand there is an expansion of fibrotic tissue; on the other hand there is an impairment of the regenerative process of skeletal muscle. It is well known that proinflammatory invading macrophages continuously release profibrotic growth factors, such as transforming growth factor β and PDGF-AA, which activates PDFR α^+ fibro-adipogenic progenitor cells, enhancing the expansion of fibrotic tissue.^{4,17,52} Tyrosine kinase inhibitor drugs, such as imatinib or crenolanib, block phosphorylation of several cell receptors, including PDGFRs. These drugs have shown effectiveness in reducing fibrosis and accordingly improving muscle function.^{21,22,53} Based on our results, we could hypothesize that tyrosine kinase inhibitors may impair muscle regeneration by blocking the effects of PDGF-BB on satellite cells. This concept has not been studied in any of the reports published. However, satellite cell proliferation does not depend only on the effects of PDGF-BB; other growth factors such as IL-6, hepatic growth factor, and stromal cell–derived factor 1 influence it.³⁶ None of them are blocked by tyrosine kinase inhibitor; therefore, expansion of satellite cells in a tyrosine kinase–treated animal model may not be compromised. It has also been suggested that damaged muscle fibers could express factors that promote muscle regeneration.^{54,55} Hereby we present data supporting a role of PDGF-BB released by muscle fibers as a pro-regenerative factor in patients with DMD.

In conclusion, our results support the hypothesis that PDGF-BB would be released by muscle fibers to promote muscle regeneration in dystrophic muscles by activating the proliferation and migration of satellite cells to injured

Piñol-Jurado et al

muscle fibers. Based on our results, we propose that treatment with agonists of PDGFR β in animal models of muscular dystrophy may result in an improvement in muscle regeneration and, consequently, a reduction in muscle loss.

Acknowledgments

We thank Miquel Navas for technical support with the experiments and Luis Querol, Sonia Segovia, Juan Jesus Vilchez, Carolyn Newey, Sergi Martinez-Ramirez, and Sara DeGregorio for editorial comments.

P.P.-J., N.d.L., and X.S.-C. designed and performed experiments, collected and analyzed data, and wrote the manuscript; E.G. and J.D.-M. designed the experiments, analyzed data, wrote the manuscript, and provided funding; C.S.-R. designed the experiments, analyzed data, and wrote the manuscript; E.F.-S. and C.G. performed experiments, collected and analyzed data, and wrote the manuscript; and I.I. performed experiments, wrote the manuscript, and provided funding.

Supplemental Data

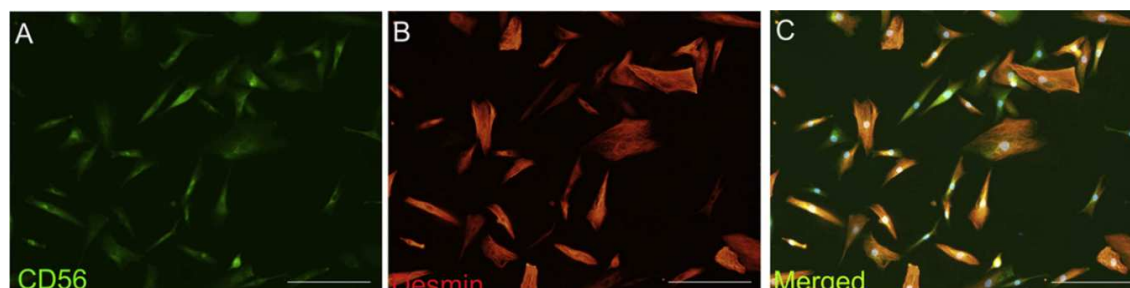
Supplemental material for this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.04.011>.

References

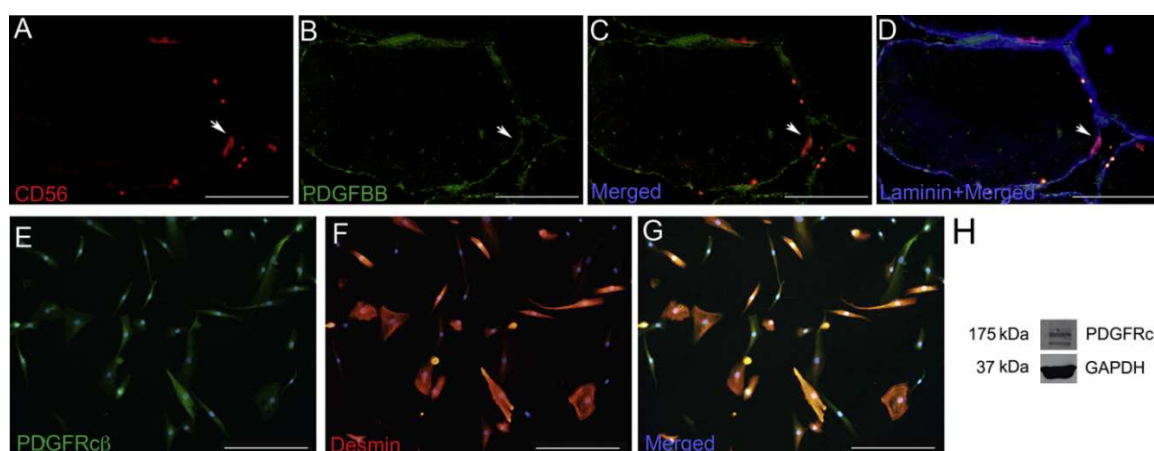
- Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K, McDonald C, Pandya S, Poysky J, Shapiro F, Tomczko J, Constantin C: DMD Care Considerations Working Group: Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol* 2010, 9:77–93
- Wallace GQ, McNally EM: Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annu Rev Physiol* 2009, 71:37–57
- Saccone V, Consalvi S, Giordani L, Mozzetta C, Barozzi I, Sandona M, Ryan T, Rojas-Munoz A, Madaro L, Fasanaro P, Borsellino G, De Bardi M, Frige G, Termanini A, Sun X, Rossant J, Bruneau BG, Mercola M, Minucci S, Puri PL: HDAC-regulated myomiRs control BAF60 variant exchange and direct the functional phenotype of fibro-adipogenic progenitors in dystrophic muscles. *Genes Dev* 2014, 28:841–857
- MacDonald EM, Cohn RD: TGF β signaling: its role in fibrosis formation and myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 2012, 24:628–634
- Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G: Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest* 2010, 120:11–19
- Andrae J, Gallini R, Betsholtz C: Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 2008, 22:1276–1312
- Heldin CH, Westermark B: Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999, 79:1283–1316
- Dellavalle A, Sampaulesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L, Innocenzi A, Galvez BG, Messina G, Morosetti R, Li S, Belicchi M, Peretti G, Chamberlain JS, Wright WE, Torrente Y, Ferrari S, Bianco P, Cossu G: Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* 2007, 9:255–267
- Trojanowska M: Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatology* 2008, 47(Suppl 5):v2–v4
- Tallquist M, Kazlauskas A: PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004, 15:205–213
- Li X, Ponten A, Aase K, Karlsson L, Abramsson A, Uutela M, Backstrom G, Hellstrom M, Bostrom H, Li H, Soriano P, Betsholtz C, Heldin CH, Alitalo K, Ostman A, Eriksson U: PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat Cell Biol* 2000, 2:302–309
- Enge M, Bjarnegard M, Gerhardt H, Gustafsson E, Kalen M, Asker N, Hammes HP, Shani M, Fassler R, Betsholtz C: Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *EMBO J* 2002, 21:4307–4316
- Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C: Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 2005, 97:512–523
- Gallini R, Lindblom P, Bondjers C, Betsholtz C, Andrae J: PDGF-A and PDGF-B induces cardiac fibrosis in transgenic mice. *Exp Cell Res* 2016, 349:282–290
- Hu W, Huang Y: Targeting the platelet-derived growth factor signalling in cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2015, 42:1221–1224
- Appiah-Kubi K, Wang Y, Qian H, Wu M, Yao X, Wu Y, Chen Y: Platelet-derived growth factor receptor/platelet-derived growth factor (PDGFR/PDGF) system is a prognostic and treatment response biomarker with multifarious therapeutic targets in cancers. *Tumour Biol* 2016, 37:10053–10066
- Zhao Y, Haginoya K, Sun G, Dai H, Onuma A, Inuma K: Platelet-derived growth factor and its receptors are related to the progression of human muscular dystrophy: an immunohistochemical study. *J Pathol* 2003, 201:149–159
- Joe AW, Yi L, Natarajan A, Le Grand F, So L, Wang J, Rudnicki MA, Rossi FM: Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol* 2010, 12:153–163
- Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K: Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 2010, 12:143–152
- Olson LE, Soriano P: Increased PDGFR α activation disrupts connective tissue development and drives systemic fibrosis. *Dev Cell* 2009, 16:303–313
- Huang P, Zhao XS, Fields M, Ransohoff RM, Zhou L: Imatinib attenuates skeletal muscle dystrophy in mdx mice. *FASEB J* 2009, 23:2539–2548
- Ieronimakis N, Hays A, Prasad A, Janebodin K, Duffield JS, Reyes M: PDGFR α signalling promotes fibrogenic responses in collagen-producing cells in Duchenne muscular dystrophy. *J Pathol* 2016, 240:410–424
- Armulik A, Genove G, Betsholtz C: Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell* 2011, 21:193–215
- Jin P, Sejersen T, Ringertz NR: Recombinant platelet-derived growth factor-BB stimulates growth and inhibits differentiation of rat L6 myoblasts. *J Biol Chem* 1991, 266:1245–1249
- Yablonka-Reuveni Z, Seifert RA: Proliferation of chicken myoblasts is regulated by specific isoforms of platelet-derived growth factor: evidence for differences between myoblasts from mid and late stages of embryogenesis. *Dev Biol* 1993, 156:307–318
- Yablonka-Reuveni Z, Balestreri TM, Bowen-Pope DF: Regulation of proliferation and differentiation of myoblasts derived from adult mouse skeletal muscle by specific isoforms of PDGF. *J Cell Biol* 1990, 111:1623–1629
- Diaz-Manera J, Touvier T, Dellavalle A, Tonlorenzi R, Tedesco FS, Messina G, Meregalli M, Navarro C, Perani L, Bonfanti C, Illa I, Torrente Y, Cossu G: Partial dysferlin reconstitution by adult murine mesoangioblasts is sufficient for full functional recovery in a murine model of dysferlinopathy. *Cell Death Dis* 2010, 1:e61

28. de Luna N, Gallardo E, Soriano M, Dominguez-Perles R, de la Torre C, Rojas-Garcia R, Garcia-Verdugo JM, Illa I: Absence of dystferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation "in vitro". *J Biol Chem* 2006, 281:17092–17098
29. Hardy D, Besnard A, Latil M, Jouvion G, Briand D, Thepenier C, Pascal Q, Guguin A, Gayraud-Morel B, Cavaillon JM, Tajbakhsh S, Rocheteau P, Chretien F: Comparative study of injury models for studying muscle regeneration in mice. *PLoS One* 2016, 11:e0147198
30. Diaz-Manera J, Gallardo E, de Luna N, Navas M, Soria L, Garibaldi M, Rojas-Garcia R, Tonlorenzi R, Cossu G, Illa I: The increase of pericyte population in human neuromuscular disorders supports their role in muscle regeneration in vivo. *J Pathol* 2012, 228:544–553
31. Nazari M, Ni NC, Ludke A, Li SH, Guo J, Weisel RD, Li RK: Mast cells promote proliferation and migration and inhibit differentiation of mesenchymal stem cells through PDGF. *J Mol Cell Cardiol* 2016, 94:32–42
32. Hankenson KD, Gagne K, Shaughnessy M: Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 2015, 94:3–12
33. Adas G, Koc B, Adas M, Duruksu G, Subasi C, Kemik O, Kemik A, Sakiz D, Kalayci M, Purisa S, Unal S, Karaoz E: Effects of mesenchymal stem cells and VEGF on liver regeneration following major resection. *Langenbecks Arch Surg* 2016, 401:725–740
34. Liu X, Liu Y, Zhao L, Zeng Z, Xiao W, Chen P: Macrophage depletion impairs skeletal muscle regeneration: the roles of regulatory factors for muscle regeneration. *Cell Biol Int* 2017, 41:228–238
35. Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE: HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol* 1998, 194:114–128
36. Yin H, Price F, Rudnicki MA: Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev* 2013, 93:23–67
37. Dellavalle A, Maroli G, Covarello D, Azzoni E, Innocenzi A, Perani L, Antonini S, Sambasivan R, Brunelli S, Tajbakhsh S, Cossu G: Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. *Nat Commun* 2011, 2:499
38. Joannis S, Parise G: Cytokine mediated control of muscle stem cell function. *Adv Exp Med Biol* 2016, 900:27–44
39. Miller KJ, Thaloer D, Matteson S, Pavlath GK: Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000, 278:C174–C181
40. Kastner S, Elias MC, Rivera AJ, Yablonka-Reuveni Z: Gene expression patterns of the fibroblast growth factors and their receptors during myogenesis of rat satellite cells. *J Histochem Cytochem* 2000, 48:1079–1096
41. Han B, Tong J, Zhu MJ, Ma C, Du M: Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and leucine activate pig myogenic satellite cells through mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. *Mol Reprod Dev* 2008, 75:810–817
42. Allen RE, Boxhorn LK: Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 1989, 138:311–315
43. Farooqi AA, Siddik ZH: Platelet-derived growth factor (PDGF) signalling in cancer: rapidly emerging signalling landscape. *Cell Biochem Funct* 2015, 33:257–265
44. Jones NC, Fedorov YV, Rosenthal RS, Olwin BB: ERK1/2 is required for myoblast proliferation but is dispensable for muscle gene expression and cell fusion. *J Cell Physiol* 2001, 186:104–115
45. Ho TC, Chiang YP, Chuang CK, Chen SL, Hsieh JW, Lan YW, Tsao YP: PEDF-derived peptide promotes skeletal muscle regeneration through its mitogenic effect on muscle progenitor cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015, 309:C159–C168
46. Barzilai-Tutsch H, Bodanovsky A, Maimon H, Pines M, Halevy O: Halofuginone promotes satellite cell activation and survival in muscular dystrophies. *Biochim Biophys Acta* 2016, 1862:1–11
47. Goetsch KP, Myburgh KH, Niesler CU: In vitro myoblast motility models: investigating migration dynamics for the study of skeletal muscle repair. *J Muscle Res Cell Motil* 2013, 34:333–347
48. Andrae N, Kirches E, Hartig R, Haase D, Keilhoff G, Kalinski T, Mawrin C: Sunitinib targets PDGF-receptor and Flt3 and reduces survival and migration of human meningioma cells. *Eur J Cancer* 2012, 48:1831–1841
49. Webb SE, Lee KK: Effect of platelet-derived growth factor isoforms on the migration of mouse embryo limb myogenic cells. *Int J Dev Biol* 1997, 41:597–605
50. Yablonka-Reuveni Z, Rivera AJ: Influence of PDGF-BB on proliferation and transition through the MyoD-myogenin-MEF2A expression program during myogenesis in mouse C2 myoblasts. *Growth Factors* 1997, 15:1–27
51. Tabebordbar M, Wang ET, Wagers AJ: Skeletal muscle degenerative diseases and strategies for therapeutic muscle repair. *Annu Rev Pathol* 2013, 8:441–475
52. Burks TN, Cohn RD: Role of TGF-beta signaling in inherited and acquired myopathies. *Skelet Muscle* 2011, 1:19
53. Lemos DR, Babaeijandaghi F, Low M, Chang CK, Lee ST, Fiore D, Zhang RH, Natarajan A, Nedospasov SA, Rossi FM: Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat Med* 2015, 21:786–794
54. Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM, Rando TA: Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* 2003, 302:1575–1577
55. Ratajczak MZ, Majka M, Kucia M, Drukala J, Pietrzowski Z, Peiper S, Janowska-Wieczorek A: Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. *Stem Cells* 2003, 21:363–371

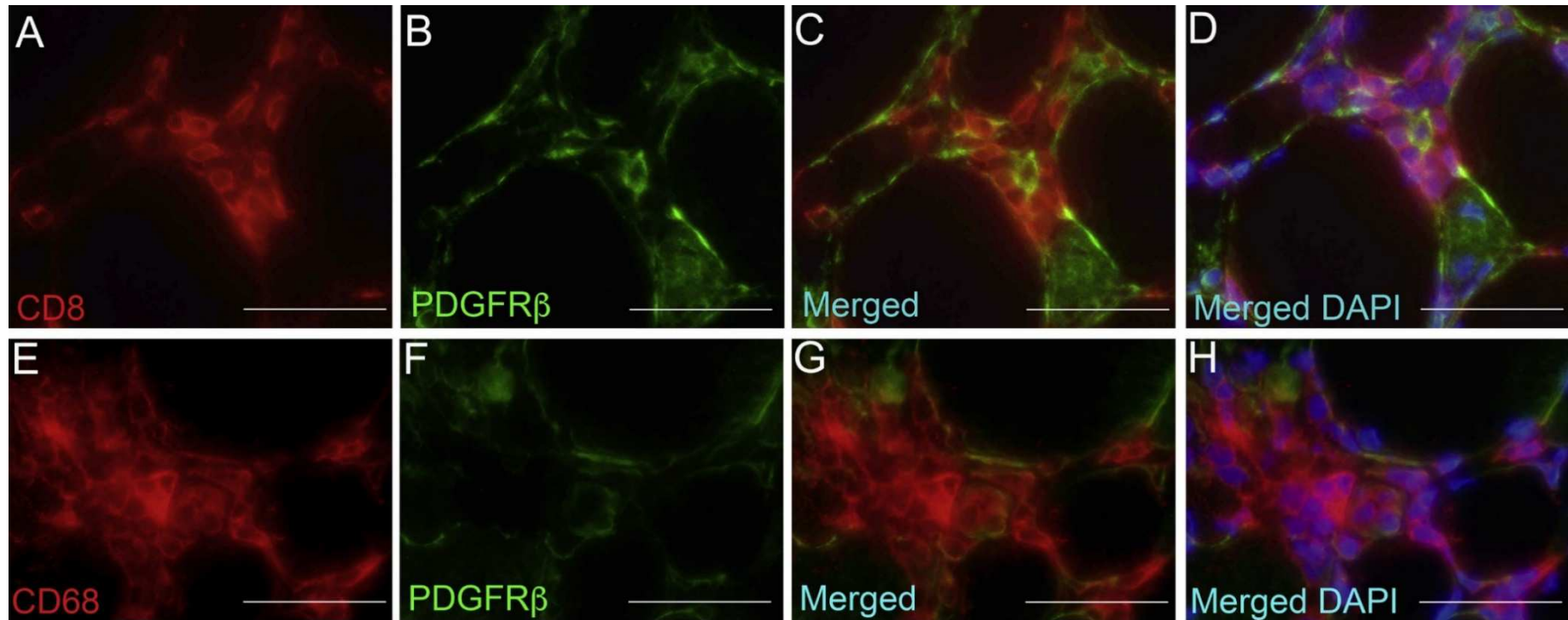
4.1.1 MATERIAL SUPLEMENTARIO

**Supplemental Figure S1**

Myoblasts were isolated from muscle biopsy samples from healthy volunteers and Duchenne muscle dystrophy patients, as described in the Materials and Methods. **A–C**: Cells used in the experiments were identified as myoblasts by the co-expression of CD56 and desmin. Scale bars = 100 μm .

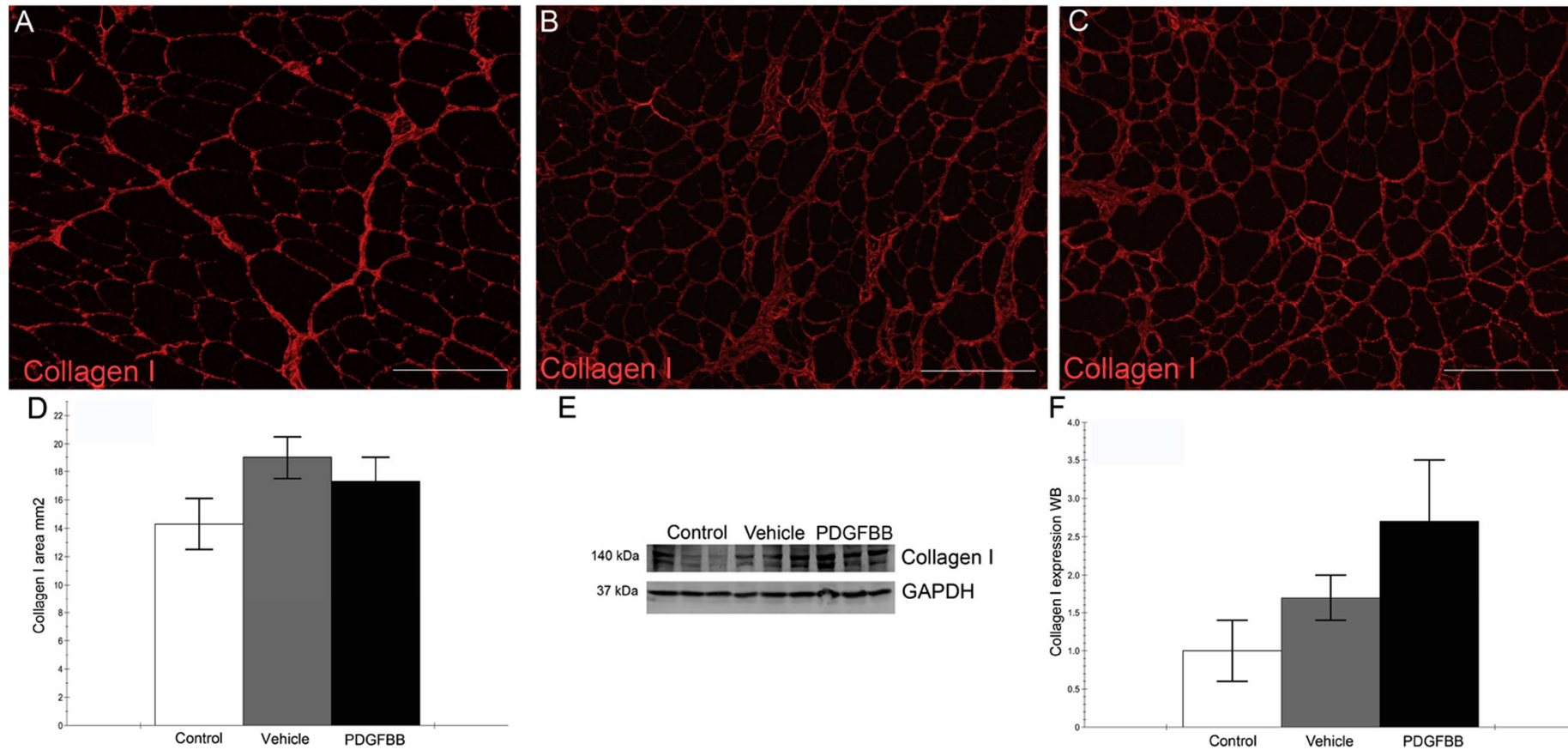
**Supplemental Figure S2**

Satellite cells do not express platelet-derived growth factor (PDGF)-BB *in vivo* in muscle biopsy samples from both controls and Duchenne muscle dystrophy patients (**A–D**; **arrows**). In culture, myoblasts express PDGF receptor (PDGFR)- β , as demonstrated by immunofluorescence (**E–G**) and Western blot analysis (**H**). Scale bars: 50 μm (**A–D**); 100 μm (**E–G**).



Supplemental Figure S3

An analysis of the expression of platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)- β in inflammatory cells of muscle biopsy samples from patients with Duchenne muscle dystrophy. Neither CD8⁺ T cells (A–D) nor CD68⁺ macrophages (E–H) express PDGFR β . Scale bars = 50 μ m.



Supplemental Figure S4

Collagen I expression in tibialis anterior muscle of control (nontreated), vehicle-treated, and PDGF-BB-treated muscles were analyzed using both immunofluorescence (**A–C**) and Western blot (WB) analysis (**E**). Significant changes are not seen either in the area of fibrotic tissue (**D**) or in the levels of collagen expression on WB analysis (**F**). Scale bars = 100 μ m (**A–C**).

4.2. [ARTÍCULO II](#)

Piñol-Jurado et al. *Cell Death and Disease* (2018)9:776
DOI 10.1038/s41419-018-0792-6

Cell Death & Disease

ARTICLE

Open Access

Nintedanib decreases muscle fibrosis and improves muscle function in a murine model of dystrophinopathy

Patricia Piñol-Jurado¹, Xavier Suárez-Calvet^{1,2}, Esther Fernández-Simón¹, Eduard Gallardo^{1,2}, Natalia de la Oliva^{3,4}, Anna Martínez-Muriana^{3,4}, Pedro Gómez-Gálvez⁵, Luis M. Escudero⁵, María Pérez-Peiró¹, Lutz Wollin⁶, Noemi de Luna^{1,2}, Xavier Navarro^{3,4}, Isabel Illa^{1,2} and Jordi Díaz-Manera^{1,2}

Abstract

Duchenne muscle dystrophy (DMD) is a genetic disorder characterized by progressive skeletal muscle weakness. Dystrophin deficiency induces instability of the sarcolemma during muscle contraction that leads to muscle necrosis and replacement of muscle by fibro-adipose tissue. Several therapies have been developed to counteract the fibrotic process. We report the effects of nintedanib, a tyrosine kinase inhibitor, in the *mdx* murine model of DMD. Nintedanib reduced proliferation and migration of human fibroblasts in vitro and decreased the expression of fibrotic genes such as *COL1A1*, *COL3A1*, *FN1*, *TGFB1*, and *PDGFA*. We treated seven *mdx* mice with 60 mg/kg/day nintedanib for 1 month. Electrophysiological studies showed an increase in the amplitude of the motor action potentials and an improvement of the morphology of motor unit potentials in the animals treated. Histological studies demonstrated a significant reduction of the fibrotic areas present in the skeletal muscles. Analysis of mRNA expression from muscles of treated mice showed a reduction in *Col1a1*, *Col3a1*, *Tgfb1*, and *Pdgfa*. Western blot showed a reduction in the expression of collagen I in skeletal muscles. In conclusion, nintedanib reduced the fibrotic process in a murine model of dystrophinopathy after 1 month of treatment, suggesting its potential use as a therapeutic drug in DMD patients.

Introduction

Duchenne muscle dystrophy (DMD) is a genetic disorder produced by mutations in the *dystrophin* gene. DMD patients develop muscle weakness that usually starts at an age of 5–7 years and progresses quickly. At 14 years of age, most of the patients have lost ambulation. At 20 years, patients are completely dependent on care givers or relatives owing to severe muscle weakness. Respiratory muscle failure and/or cardiomyopathy are the main causes of mortality in these patients^{1,2}.

Several therapeutic strategies have been tested in murine models of DMD, and some of them have also been studied in clinical trials in patients³. Cell therapy using different stem cells, such as myoblasts or mesoangioblasts, have been tested both in animals and in patients⁴. Although results of animal experiments have shown promising results, tests in humans have not led to any functional change in the patients treated^{5,6}. Gene-based strategies, such as exon-skipping or readthrough of null mutations have demonstrated to restore the expression of dystrophin in muscles fibers both in mice and in patients^{7,8}. Ataluren is at present commercialized in Europe to treat patients with non-sense mutations, and eteplirsén is being commercialized in USA to treat DMD patients with skipping of the exon 51^{9,10}. CRISPR-Cas9 is a promising genetic strategy, that could be useful in

Correspondence: Jordi Díaz-Manera (jdiazm@santpau.cat)

¹Neuromuscular disorders Unit, Neurology department, Universitat Autònoma de Barcelona, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

²Centro de Investigación Básica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article.

These authors contributed equally: Patricia Piñol-Jurado, Xavier Suárez-Calvet. Edited by M. Agostini

© The Author(s) 2018



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/>.

patients although it has only been tested in animal models and cell cultures so far^{11,12}. Drugs interfering the process of muscle degeneration are another potential strategy to treat muscle dystrophies. The process of muscle degeneration in DMD patients has been thoroughly studied. The absence of dystrophin weakens muscle membrane, leading to contraction-induced muscle fiber damage and death¹³. Muscle fiber loss is associated to expansion of fibro-adipose tissue producing muscle weakness¹⁴. Several cytokines and growth factors have been related to skeletal muscle fibrosis, although it has been reported that transforming growth factor β (TGF- β) is the most important factor in this process^{15–17}. Several therapeutic strategies trying to decrease TGF- β activity have been developed, which have been shown to reduce fibrous tissue but also to increase inflammatory infiltration^{18,19}. These results have promoted the investigation of other growth factors involved in muscle fibrosis.

Platelet-derived growth factors (PDGFs) are associated with multiple cellular processes such as proliferation, migration, and cell differentiation²⁰. PDGF have been implicated in a broad range of diseases such as cancer, atherosclerosis and fibrosis. Several evidences supporting a role on muscle fibrosis of PDGF-AA have been published justifying therapeutic interventions targeting the PDGF signaling cascade^{21,22}. Nintedanib is a tyrosine kinase inhibitor (TKI) also targeting fibroblast growth factor receptor (FGFR) 1 and 2, PDGF receptors α and β and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)²³. Nintedanib is approved for the treatment of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), a condition in which expansion of the fibrotic tissue is crucial^{24,25}. The anti-fibrotic activity of nintedanib has been confirmed in primary lung fibroblasts from patients with IPF and in dermal fibroblasts from patients with systemic sclerosis^{25,26}.

In this study, we explored the effect of nintedanib on human fibroblasts obtained from muscle biopsies and on muscle fibrosis and function in the *mdx* mouse model of DMD.

Results

Nintedanib reduced proliferation, migration, and mRNA expression of fibrotic markers in human fibroblasts

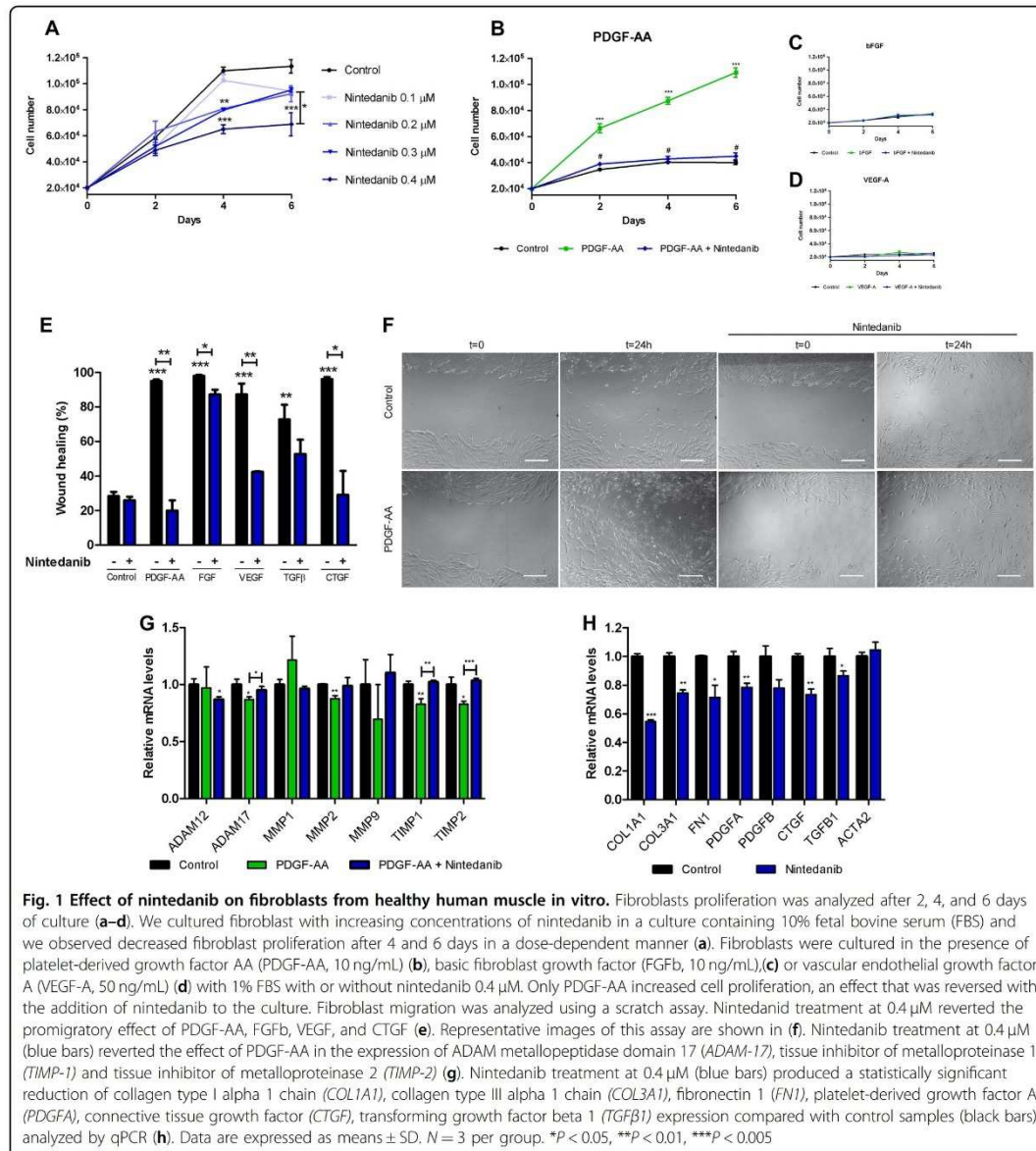
In muscle dystrophies, activated fibroblasts proliferate and express high levels of extracellular proteins leading to the expansion of fibrotic tissue^{27,28}. We analyzed whether nintedanib was able to decrease fibroblast proliferation in vitro. Nintedanib significantly reduced fibroblast proliferation in a dose-dependent manner reaching the highest effect using a concentration of 0.4 μ M (Fig. 1a) without any cytotoxic effect measured by cell viability and apoptosis assays (Fig. S1A, B). Accordingly, the expression of the gene PT53 (tumor protein p53) and

the number of Ki-67+ cells, which are well known cell cycle markers, were significantly lower in nintedanib-treated cells than in control non-treated cells (Fig. S1C, D). To study which growth factor signaling cascade targeted by nintedanib affects more prominently fibroblasts proliferation, we cultured human fibroblasts in the presence of recombinant PDGF-AA, recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF), or recombinant human vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, with or without nintedanib (Fig. 1b–d). In order to avoid possible interferences with other growth factors present in the fetal bovine serum (FBS), we cultured the cells with 1% FBS only. PDGF-AA significantly increased fibroblast proliferation at days 2, 4, and 6 (Fig. 1b) but not bFGF or VEGF (Fig. 1c, d). This increase was completely blocked by the addition of nintedanib at 0.4 μ M (Fig. 1b).

After muscle damage, activated fibroblasts gain migratory capabilities that allow them to move to the site of injury^{29,30}. Using a scratch assay, we observed that nintedanib blocked cell migration promoted by PDGF-AA, bFGF, VEGF, and collagen tissue growth factor (CTGF) (Fig. 1e). The highest effect of nintedanib on cell migration was observed when PDGF-AA was added to the culture (Fig. 1e, f) and it was dose dependent (Fig. S2A, B). Transwell experiments confirmed these results showing that nintedanib reduced the effect of PDGF-AA in migration (Fig. S2C). Furthermore, nintedanib reverted significantly the effect of PDGF-AA on expression of the genes related with cell migration such as *ADAM-17* (ADAM metalloproteinase domain 17), *TIMP-1* (tissue inhibitor of metalloproteinase 1), and *TIMP-2* (tissue inhibitor of metalloproteinase 2) (Fig. 1g). No significant differences were found in *ADAM-12* (ADAM metalloproteinase domain 12), *MMP1* (metalloproteinase 1), *MMP2* (metalloproteinase 2), and *MMP9* (metalloproteinase 9) (Fig. 1g). To know whether nintedanib treatment modified mRNA expression of skeletal muscle fibroblasts in vitro we analyzed the expression of genes related with muscle fibrosis using Real-Time PCR after 4 days of culture. We observed that nintedanib at 0.4 μ M reduced significantly the expression of *COL1A1* (Collagen type I alpha 1 chain), *COL3A1* (collagen type III alpha 1 chain), *FNI* (Fibronectin 1), *CTGF* (connective tissue growth factor), *PDGFA* (platelet-derived growth factor A), and *TGFBI* (transforming growth factor beta 1) (Fig. 1h). In contrast, we did not observe significant differences in the expression of *ACTA-2* (actin, alpha 2, smooth muscle, aorta) or *PDGF-B* (platelet-derived growth factor B).

Nintedanib had no effect on myoblast differentiation to myotubes in vitro

To analyze whether nintedanib could interfere with myoblast differentiation we cultured confluent human myoblasts in differentiation medium with increasing

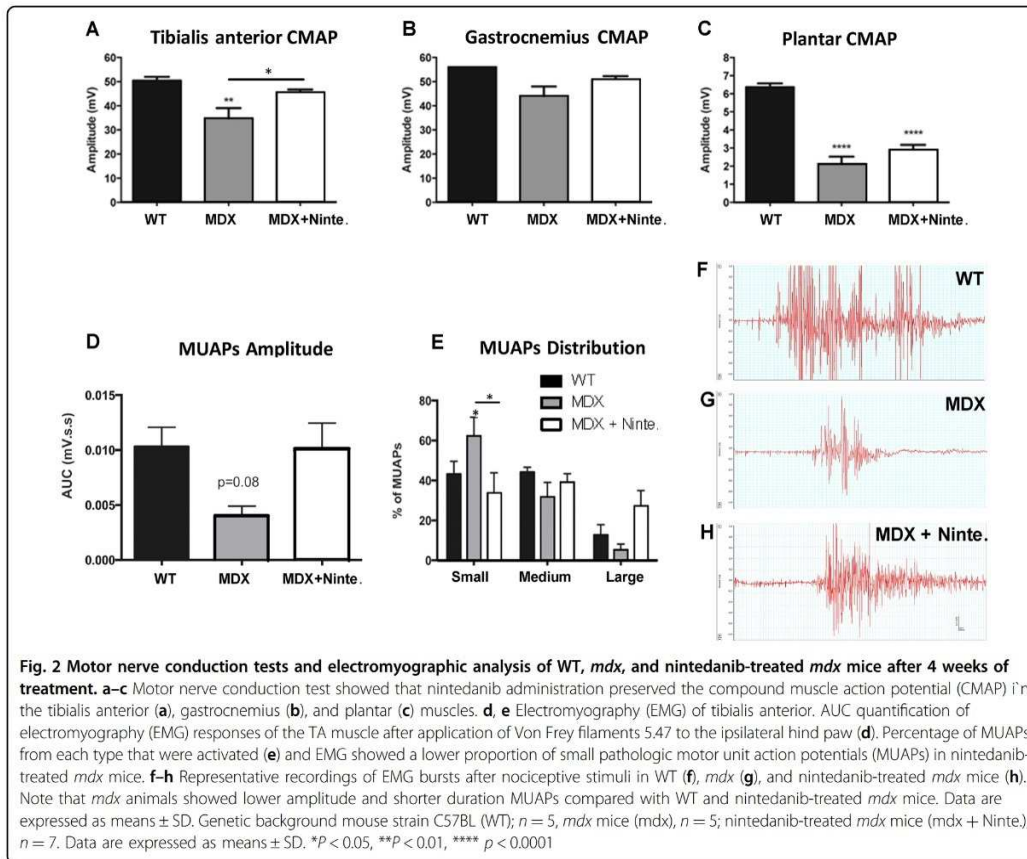


doses of nintedanib for 7 days. No differences in differentiation index between control myotubes and myotubes treated with nintedanib were observed (Fig. S3A). In addition, we did not find differences in the differentiation index of myoblasts cultured in a medium containing PDGF-AA, b-FGF, or VEGF-A with or without nintedanib (Fig. S3B, C). We also studied whether myotubes treated with nintedanib were more resistant to chemical damage

using 0.25 mM sodium dodecyl sulfate (SDS), and we did not see an effect of nintedanib on sarcolemma repair (Figure S3D).

Nintedanib treatment improves electrophysiological tests in *mdx* mice

We treated 10 months old *mdx* mice ($n = 7$) with nintedanib (from now on nintedanib-treated *mdx* mice) at a



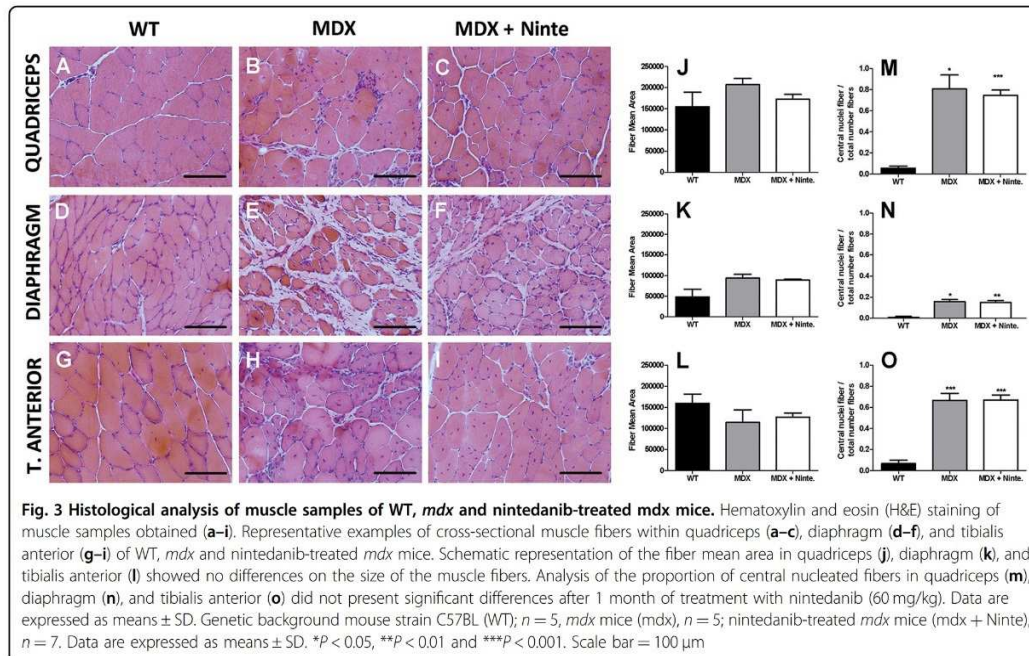
dose of 60 mg/kg/day orally for 1 month and compared muscle function tests with 10 months old non-treated *mdx* mice (from now on *mdx* mice; $n = 5$) and 10 months old C57 wild-type mice (from now on WT mice; $n = 5$). We first performed a DigiGait analysis, which allows identifying differences in the walking pattern of healthy and dystrophic mice. We did not find differences between WT mice, *mdx* mice, and nintedanib-treated *mdx* mice, suggesting that the severity of weakness involving muscles of the paws in this murine model at this age is not enough to find differences using this technique (Fig S4).

We then used electrophysiological tests to analyze compound muscle action potential (CMAP) amplitude and morphology of the motor unit action potentials (MUAPs). We detected a statistically significant increase of the CMAP of the peroneus nerve registered at the tibialis anterior muscle in nintedanib-treated *mdx* mice compared with *mdx* mice (Fig. 2a). Moreover, we also found a non-significant tendency to an increase of CMAPs recorded in gastrocnemius (GM) and plantar

interossei muscles (Fig. 2b, c). We did not identify changes in latency or conduction velocity. Electromyographic studies showed a significant change in the morphology of the MUAPs in the tibialis anterior muscle. WT muscles contained a similar proportion of small and medium MUAPs, whereas *mdx* mice had predominantly small MUAPs. The analysis of nintedanib-treated *mdx* mice revealed a significant decrease in the proportion of small MUAPs and an increase in the proportion of medium and large MUAPs, which was statistically significant compared with *mdx* mice (Fig. 2d–g).

Nintedanib treatment reduces muscle fibrosis in *mdx* mice

The analysis of muscle histology after 1 month of treatment revealed significant differences between nintedanib-treated and non-treated *mdx* mice without any effect on apoptosis in the muscle of the animals (Fig. S5). We analyzed the diaphragm, which has been reported to be the most affected muscle in *mdx* mice³¹, the quadriceps and the tibialis anterior of WT, *mdx* mice,



and nintedanib-treated *mdx* mice. Hematoxylin–eosin staining showed no differences either on the size of the muscle fibers or in the proportion of central nucleated fibers between *mdx* mice and nintedanib-treated *mdx* mice (Fig. 3). As nintedanib blocks the VEGF receptor, we also analyzed muscle vascularization. Although we did not find differences in the ratio of CD31-positive vessels per fiber among the three groups of mice, nintedanib treatment tended to reverse the increase observed in the ratio vessels/muscle fibers observed in the *mdx* mice (Fig. S6). To investigate in vivo the effect of nintedanib in the muscle, we quantified the number of eMHC-positive muscle fibers, which is an early marker of muscle regeneration. We observed a decrease in the number of muscle fibers expressing eMHC, in nintedanib-treated *mdx* mice compared with *mdx* mice (Fig. 4). We then analyzed the area of fibrotic tissue present in the skeletal muscles by quantifying collagen VI expression (Fig. 5). We observed a statistically significant reduction in the collagen VI area in the diaphragm (−5.6%), the quadriceps (−8.4%) and in the tibialis anterior muscles (−4.1%) of nintedanib-treated *mdx* mice compared with *mdx* mice (Fig. 5).

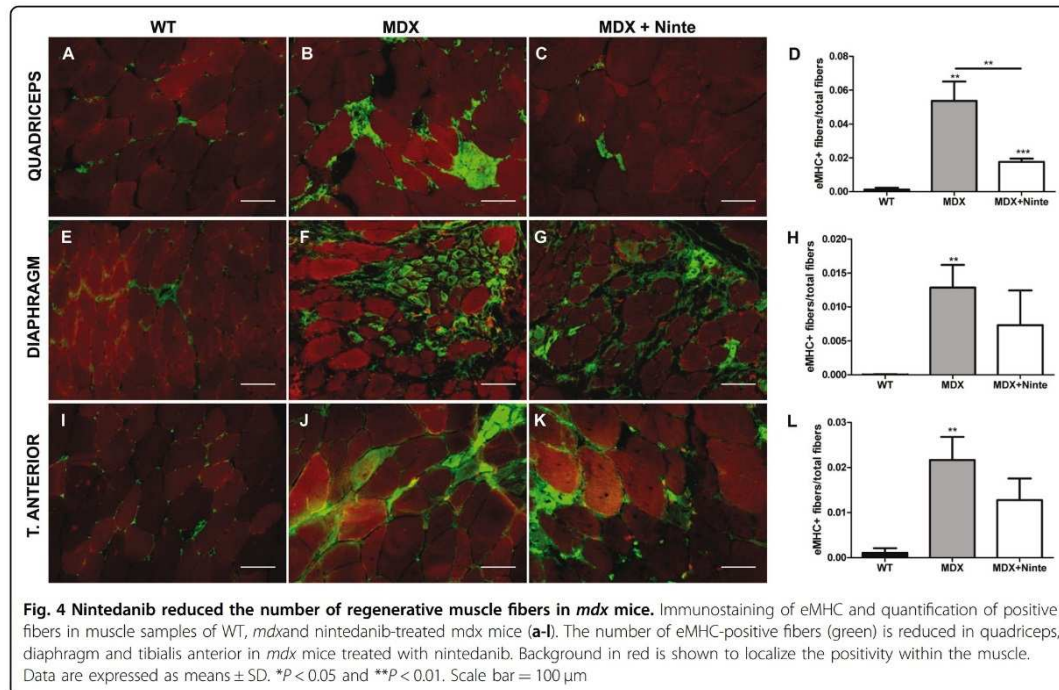
The mRNA expression of the extracellular matrix proteins *Col1a1*, *Col3a1*, and *Fn1*, of the growth factors *Pdgfa*, *Pdgfb*, *Ctgf*, and *Tgfb1*, and of *Adgre1* (Adhesion G protein-coupled receptor E1) encoding

F4/80, a protein expressed by murine macrophage populations, were significantly increased or showed a tendency to increase in *mdx* mice compared with WT mice (Fig. 6). The mRNA expression of *Col1a1*, *Col3a*, *Tgfb1*, *Pdgfa*, and *Pdgfb* in quadriceps (Fig. 6d, e), diaphragm (Fig. 6l, m), and tibialis anterior muscles (Fig. 6t, u) of nintedanib-treated *mdx* mice was reduced compared with *mdx* mice. *Adgre1* mRNA expression was decreased by nintedanib in tibialis anterior and quadriceps muscles (Fig. 6o, r, w, y) from nintedanib-treated *mdx* mice compared with *mdx* mice. Surprisingly, nintedanib significantly increased *Ctgf* in the tibialis anterior muscles of *mdx* mice (Fig. 6v). A similar trend was also detected in the other muscles.

We confirmed the reduced expression of *Col1a1* and *Col3a1* by WB, with a significant decrease of collagen-1 in the tibialis anterior ($p < 0.05$) and a trend in the diaphragm ($p = 0.08$) of nintedanib-treated *mdx* mice compared with *mdx* mice (Fig. 7).

Effect of nintedanib in heart fibrosis of the *mdx* mouse

We quantified the collagen VI and collagen III content in heart sections of WT, *mdx* mice, and nintedanib-treated *mdx* mice. We did not observe a significant difference in the area positive for collagen VI between WT and non-treated *mdx* mice (Fig. S7A–D). In contrast, collagen III was increased in *mdx* mice but it was not



modified by nintedanib (Fig. S7E–H). However, gene expression showed a significant decrease in the *Col3a1* mRNA expression in nintedanib-treated *mdx* mice compared with non-treated *mdx* (Fig. S7J). mRNA expression of the *Col1a1*, *Fnl1*, *Pdgfra*, *Pdgfb*, *Ctgf*, *Tgfb1*, and of *Adgre1* was also studied. We only observed a decrease in the expression of the *Adgre1* gene after treatment with nintedanib (Fig. S7I–P).

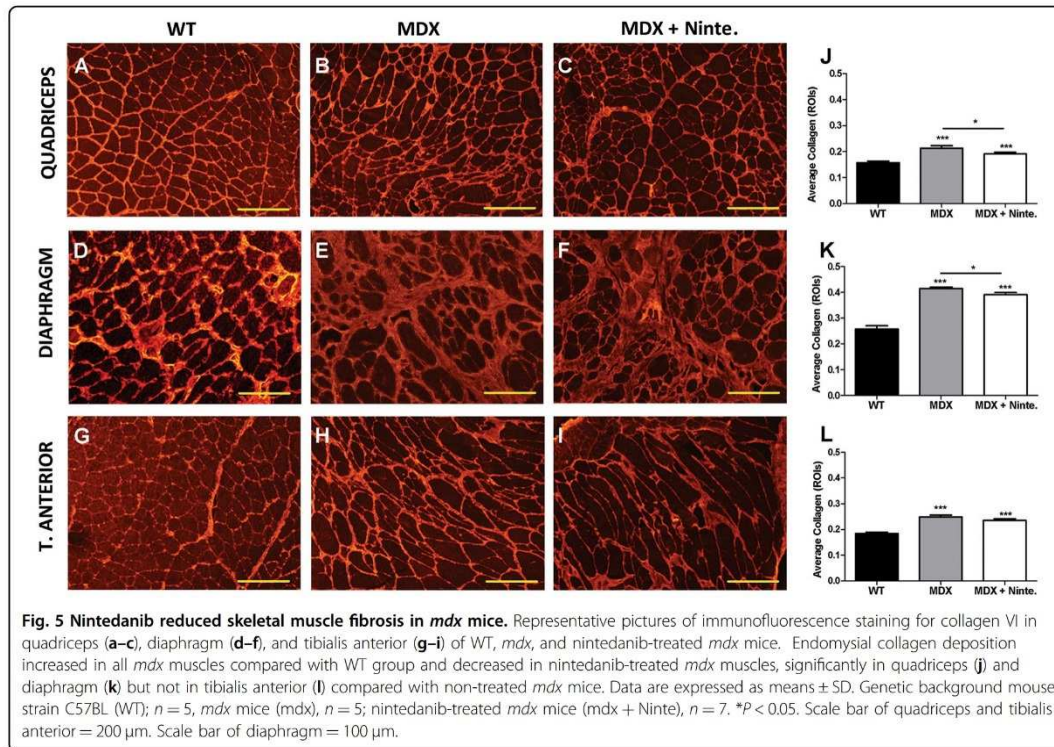
Discussion

In the present study, we show that nintedanib reduces skeletal muscle fibrosis of 10 months old *mdx* mice after 4 weeks of treatment. The decrease in fibrotic tissue was associated with an improvement of muscle function evidenced by electrophysiological tests. In vitro experiments showed that nintedanib decreased fibroblasts proliferation and migration and reduced expression of fibrotic genes, supporting an anti-fibrotic effect of the drug.

Pharmacological approaches to treat muscle dystrophies aim to target the complex mechanism of fiber necrosis and fibrotic and fatty tissue deposition by restoring the proper expression of the mutated gene or by interfering with the pathological fibrotic cascade triggered by the lack of specific proteins³². Advances in the understanding of the fibrotic process have been recently

achieved^{33,34}. Continuous muscle fiber damage is associated with chronic infiltration of skeletal muscles by inflammatory cells, mainly macrophages. These cells release cytokines that contribute to the fibrotic process by activating fibro-adipogenic progenitor cells and fibroblasts resident in the skeletal muscle^{22,35}. Among these cytokines, the growth factors of the PDGF family may have an important role. A series of evidences from the literature suggest that PDGF-AA has a profibrotic role in muscle dystrophies^{35–39}. Treatment of *mdx* mice with imatinib, a TKI inhibiting *v*-Abl, *c*-kit, and PDGFR α , decreases muscle fibrosis⁴⁰. The role of PDGF-BB is not so clearly established. Whereas it seems that PDGF-BB could have a role in the fibrosis observed in a number of tissues, several authors suggest that it can also play an important role in muscle regeneration in vivo^{41,42}.

Nintedanib was shown to inhibit fibroblast proliferation and migration in vitro and to exert anti-fibrotic activity in different animal models of lung fibrosis^{25,26}. We observed that muscle fibrosis was reduced in *mdx* mice after 4 weeks of treatment with nintedanib. This effect is probably explained by a decreased rate of fibroblasts proliferation, migration and by a reduction of the expression of different components of the extracellular matrix. Skeletal muscle fibrosis in DMD is caused by accumulation of different types of collagens, such as

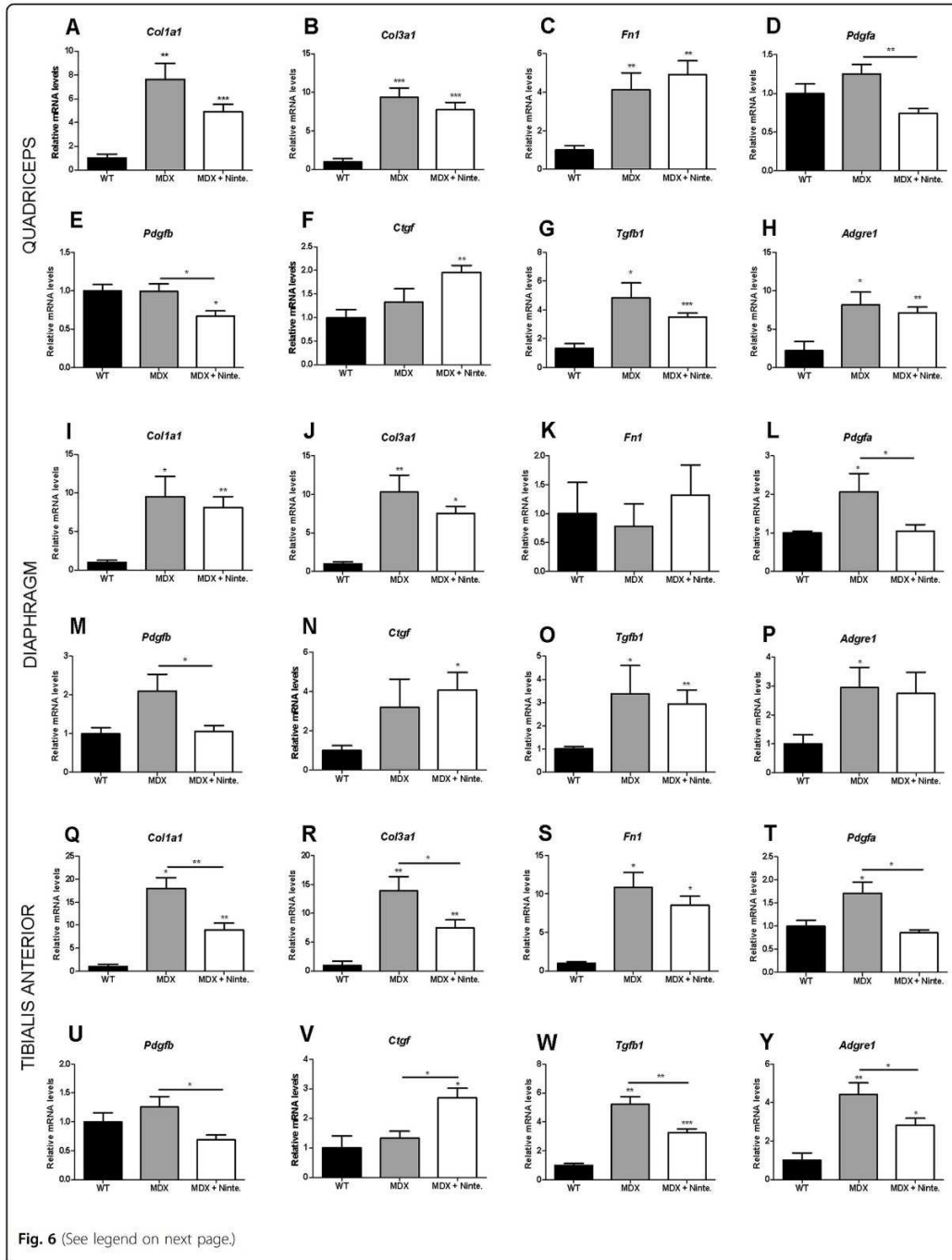


type I, III, and VI and also by fibronectin. We focused on collagen VI and III because they are the major components of the extracellular matrix and their levels correlates with muscle destruction^{31,36,43,44}. We have observed a reduction in the expression of these extracellular matrix components both in vivo and in vitro. Moreover, we also observed a decrease in the expression of profibrotic growth factors such as PDGF-AA or TGF- β , which can certainly contribute to an attenuation of the fibrotic process in the treated mice. However, we observed an increase in CTGF levels in muscles of nintedanib-treated *mdx* mice, which could be explained by an enhanced fibrotic pathway not inhibited by our drug. This effect suggests that treatment with a combination of drugs blocking different pathways could have a more powerful anti-fibrotic effect. Using cell culture conditions with only 1% FBS, fibroblast proliferation was stimulated most prominently by PDGF-AA compared with VEGF or bFGF, which had no effect in those culture conditions. Hence, drugs targeting PDGFR α , the main receptor activated by PDGF-AA may be useful in the treatment of muscle dystrophies.

The preclinical investigation of new drugs to treat DMD is hampered by the lack of an animal model, which

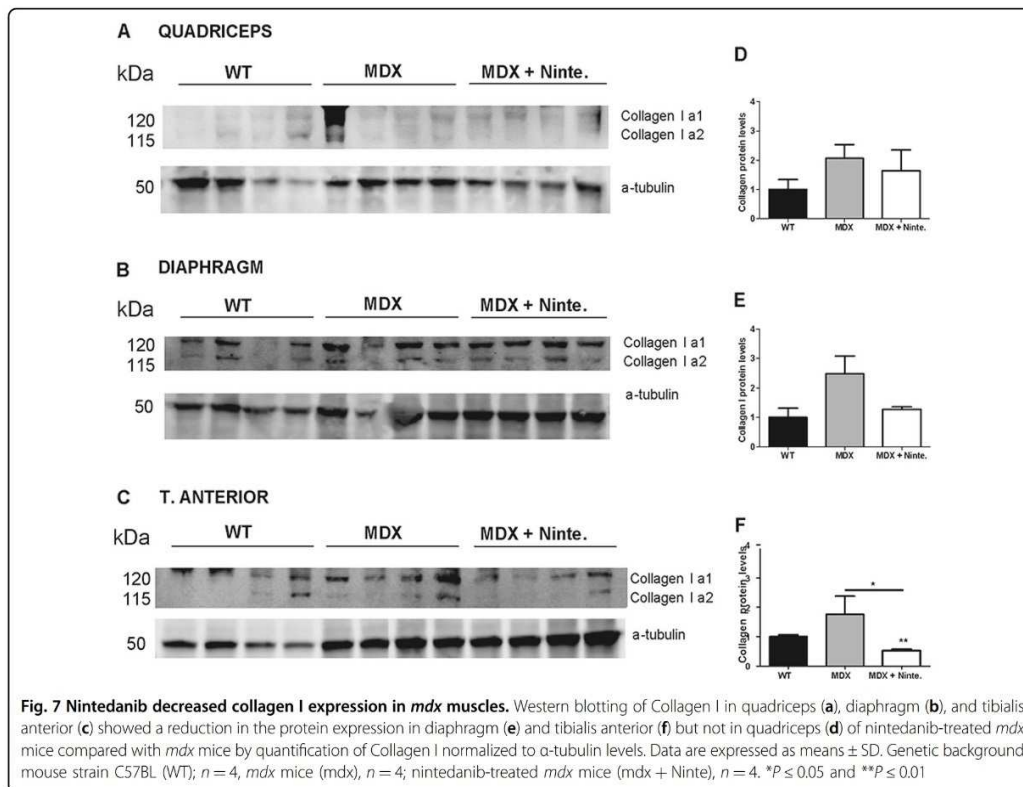
mimics the severity of muscle degeneration and natural history of the disease in patients. In the *mdx* mouse model we used, it has been shown that significant changes in muscles cannot be observed until 8–10 months of age⁴⁵. Moreover, despite the presence of clear myopathic changes, mice do not present functional impairment until later in their life. Similar findings would apply to heart involvement. This might explain the absence of differences that we have observed in the Digigait test when comparing healthy C57 mice and non-treated *mdx* mice. Electrophysiology is an objective test that does not need the collaboration of the mice, providing valuable data about muscle integrity⁴⁶. We observed significant changes in the amplitude of the CMAPs and in the morphology of the MUAPs using electrophysiological tests that were restored with treatment. These results are probably the consequence of early changes in the muscle structure produced by nintedanib that occur before clinical symptoms are observed.

The effect of specific TKIs, such as nintedanib, on the amount of fibrotic tissue present in the skeletal muscles of the patients may also improve muscle homeostasis. It is well known that muscle microenvironment is important for proper tissue regeneration⁴⁷. In the process



(see figure on previous page)

Fig. 6 RT-qPCR studying mRNA expression of fibrosis-related genes. Collagen type I alpha 1 chain (*Col1a1*), Collagen type III alpha 1 chain (*Col3a1*), Fibronectin 1 (*Fn1*), Platelet-derived growth factor A (*Pdgfa*), Platelet-derived growth factor B (*Pdgfb*), Connective tissue growth factor (*Ctgf*), Transforming growth factor beta 1 (*Tgfb1*), and Adhesion G protein-coupled receptor E1 (*Adgre1*) showed changes in relative abundance following nintedanib in quadriceps (a–h), diaphragm (i–p), and tibialis anterior (q–y). *Col1a1*, *Col3a1*, *Pdgfa*, *Pdgfb*, *Tgfb1*, and *Adgre1* gene expression was increased in *mdx* mice compared with WT. *Col1a1*, *Col3a1*, *Pdgfa*, *Pdgfb*, *Tgfb1*, and *Adgre1* expression was reduced in all muscles analyzed from nintedanib-treated *mdx* mice compared with *mdx* mice. In contrast, *Ctgf* expression was increased in muscles from nintedanib-treated *mdx* mice compared with *mdx* mice. Data are expressed as means \pm SD. Genetic background mouse strain C57BL (WT); $n = 5$, *mdx* mice (*mdx*), $n = 5$; nintedanib-treated *mdx* mice (*mdx* + Ninte), $n = 7$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$



of muscle degeneration, there is an imbalance between proregenerative and prodegenerative processes. The increase in fibro-adipous tissue and the presence of chronic inflammation seem to impinge satellite cell proliferation, differentiation, and eventually muscle regeneration^{48,49}. We hypothesize that nintedanib treatment could have a double benefit: (1) it reduces the amount of fibrotic tissue and (2) it could indirectly, restore the balance between proregenerative and prodegenerative processes. Our results support this hypothesis. We observed that nintedanib did not interfere with the differentiation ability of myoblasts in vitro or the resistance of myotubes to chemical damage. However, we did not

see an increase in the number of regenerative muscle fibers in the animals treated suggesting that a reduction of the fibrotic process preserves skeletal muscle structure. Indeed, electromyography (EMG) studies showing restoration of MUAPs morphology indicate that muscle structure is more preserved in the treated animals supporting this hypothesis. It is important to take into account that we have observed a reduction of fibrotic tissue in an old animal, in which the fibrotic process has already developed. Treatment of younger animals for longer periods of time could result in a more sustained effect, although this needs to be confirmed in further experiments.

Different TKIs have been recently tested in murine models of muscle dystrophy. Imatinib has been tested in the *mdx* model producing a reduction in fibrotic tissue and in muscle fiber necrosis^{21,40,50}. However, this drug, that is commonly used as a therapy for chronic myeloid leukemia and gastrointestinal tumors, is potentially associated with cardiac toxicity^{51–53}. Nilotinib has been shown to reduce fibrosis in the *mdx* model through a mechanism related to the activation of apoptosis of FAP cells mediated by TGF- β ⁴³. Nilotinib has been approved for the treatment of chronic myeloid leukemia and has been also tested in patients with dermal fibrosis^{54,55}. Crenolanib is a TKI that inhibits selectively PDGFR α being tested in phase II clinical trials of gastrointestinal tumors⁵⁶, melanomas⁵⁷, or even acute myeloid leukemia⁵⁸. This drug was tested in the *mdx* murine model and produced a reduction in collagen expression in the diaphragm of *mdx* mice⁵⁹. Our promising results reinforce the potential role of specific TKIs such as nintedanib in the treatment of patients with muscle dystrophies. Nintedanib seems advantageous for a clinical exploration in DMD owing to its proven anti-fibrotic activity in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, the fact that it has been approved for clinical use and its good safety profile^{24,25}. However clinical experience is only available in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, which are much older than patients with DMD. The potential impact of nintedanib as VEGFR inhibitor on bone and teeth formation during development in childhood is a safety concern that has to be carefully considered in a clinical testing scenario⁶⁰.

In summary, nintedanib attenuated the fibrosis of skeletal muscles of *mdx* mice and induced a functional muscular improvement. The reduction of fibroblast proliferation and chemotaxis and the decreased expression of profibrotic genes by nintedanib may explain the mechanism of action of this drug. The data presented in this proof of concept study should be confirmed in larger preclinical studies before supporting a future test of nintedanib in a clinical trial in DMD patients. However, because of the lack of experience in young patients with nintedanib, a clinical trial to test safety, tolerability, and efficacy of the drug is certainly challenging.

Material and methods

Muscle biopsies

Muscle biopsies were obtained from patients who underwent orthopedic surgery. All participants signed an informed consent form and all the procedures were in accordance with the Helsinki Declaration. All in vitro experiments were performed in fibroblasts (proliferation, migration, and mRNA expression studies) and myoblasts

(differentiation analysis) isolated from control muscle biopsies ($n = 3$).

Isolation and culture of myoblasts and fibroblasts from human muscle biopsies

Human myoblasts and fibroblasts were isolated from muscle biopsies of three healthy muscles from control donors. In brief, muscle biopsies were minced into 1–2 mm pieces, transferred onto collagen type I (Sigma, St. Louis, MO)-coated dishes, and incubated in proliferation medium containing Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and M-199, in a 3:1 proportion, with 15% FBS, 2 mM L-glutamine (all from Lonza, Verviers, Belgium) (Lonza), 5 ng/ml basic fibroblast growth factor (Peprotech, Rocky Hill, NJ), and 1% penicillin–streptomycin (Lonza). After 5–7 days, cells started to sprout from the muscle explants. We isolated myoblasts using anti-CD56 coated microbeads (MiltenyiBiotec, Bergisch-Gladbach, Germany) and confirmed that the purity of the samples was higher than 95% performing immunofluorescence with antibodies against CD56 and desmin. Purified human myoblasts were cultured in proliferation medium. Fibroblasts were isolated from the CD56-negative fraction. We confirmed that >95% of them were fibroblasts using anti-TE7 antibody (Millipore, Billerica, MA) by immunofluorescence. Fibroblasts were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, and 100 U/ml penicillin–streptomycin. All experiments performed with myoblasts and fibroblasts were repeated with cells isolated from all patients ($n = 3$) and were replicated in triplicate.

Differentiation and repair assay of human myotubes

Myoblasts were seeded in gelatin-coated cover slips, grown until confluence in proliferation media and then cells were switched to low serum medium (2% of FBS) to induce differentiation in the presence of increasing doses of nintedanib (0.1, 0.2, 0.3, or 0.4 μ M). In the repair assay, different doses of Nintedanib were added to untreated myotubes after 7 days of differentiation and incubated overnight and 2 h prior to the assay to ensure an effective inhibition of the TKI. After washing with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Lonza) we added the injury solution (HBSS with 0.25 mM SDS (Sigma) and 1.8 mM CaCl₂ (Sigma)) for 2 min. Control cells were treated with HBSS and 1.8 mM CaCl₂ without SDS. Then, cells were washed with HBSS + 1.8 mM CaCl₂ and incubated in recovery solution consisting of proliferation media at two time points: 90 s and 10 min. After that cells were exposed for 2 min to propidium iodide (Sigma) (20 μ g/ml in HBSS) that stains nuclear DNA only if when the cell membrane is injured. Finally cells were washed with HBSS, fixed with 4% of paraformaldehyde (Sigma) in phosphate-buffered saline (PBS) and

stained with Hoechst (100 µg/ml in PBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA). The total number of nuclei and immunoprecipitation-positive nuclei were counted using Fiji software.

Cell proliferation, viability, and cell death

To study the influence of nintedanib on cell proliferation, we seeded fibroblasts at 2000 cells/cm² and cultured in growth medium containing 15% FBS. In these culture conditions, fibroblasts were treated daily with different concentrations of nintedanib (0.1, 0.2, 0.3, and 0.4 µM) (kindly provided by Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, Biberach, Germany). To know which of the growth factors inhibited by nintedanib had a significant effect on fibroblast growth we analyzed cell proliferation on a medium that contained only 1% FBS. We added to the medium 10 ng/ml PDGF-AA (R&D Systems, Minneapolis, MN), 50 ng/ml VEGF-A (Pepro-Tech, INC, Rocky Hill, NJ) or 10 ng/ml bFGF (Pepro-Tech) with or without 0.4 µM nintedanib. Absolute cell numbers and viability, using LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit (Invitrogen), were analyzed at days 2, 4, and 6 using MACS flow cytometer analyzer 10 (Miltenyi Biotec). Basal background was established using non-stained cells. To analyze cell death we performed a terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling assay in fibroblasts treated with nintedanib and in muscle sections from the animal studies using in situ cell death detection kit (Sigma) following the manufacturer's instructions. DNase I (Invitrogen) treatment was used as a positive control.

Scratch and transwell assays

Migration of human fibroblasts was assessed using a scratch assay. In brief, human fibroblasts were seeded in proliferation medium until 90% confluence. In one set of experiments medium was changed to DMEM O/N, while in the other set, proliferation medium was maintained. The day after, cultures were scratched with a 0.2 ml pipette sterile tip to create a wound and washed in PBS and photographed. We assessed the effect of different doses of nintedanib (0.1, 0.2, 0.3, and 0.4 µM) on cell migration of proliferating fibroblasts after 24 h. In the set of experiments containing DMEM alone, nintedanib (0.4 µM) was incubated for 2 h. Then, PDGF-AA (20 ng/ml), TGFβ (5 ng/ml), CTGF (55 ng/ml), bFGF 10 mg/ml, or VEGF (20 mg/ml) were added, incubated for 24 h, and photographed. Migration was quantified using Image J software. Inhibition of migration was expressed considering 100% as the amount of migration in the conditions without nintedanib. Three pictures of each replicate ($n = 3$) and each condition were taken using an inverted microscope (Olympus).

Transwell assays were performed in fibroblasts treated with or without 0.4 µM nintedanib for 2 h in a T75 flask. Then, cells were seeded into 8-µm pore-size transwell filters (Corning Incorporated, Corning, NY) at 4×10^4 cells/well in 200 µl of OPTIMEM. In total, 600 µl of OPTIMEM with 10 ng/mL PDGF-AA or vehicle was added to the lower chamber. After 24 h of treatment at 37 °C, cells on the topside of the filter were removed by scrubbing twice with a cotton swab, and cells on the bottom side of the filter and cells in the well (migrating cells) were counted. Cells present in the insert membranes were fixed with methanol 70% for 10 min and stained for 30 min with Hoechst (Invitrogen). After three washes with PBS, filters were cut, mounted onto a slide, and observed with an Olympus fluorescence microscope. Chemotaxis toward Opti-MEM medium was considered as nonspecific chemotaxis.

Fibroblast gene expression

To study fibroblasts mRNA expression, we seeded 3000 fibroblasts per cm² and cultured them in growth medium. Fibroblasts were treated every 24 h with 0.4 µM nintedanib for 4 days and cell pellets were snap frozen with liquid nitrogen for the subsequent RNA processing.

Mouse model

All animal procedures were performed according to the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Ethical Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona. All mice used in the study were male and 10 months old at the start of the treatment period. Nintedanib was solubilized in sterile ultra-pure water (Braun, Rubi, Spain) and delivered to the animals using gavage. We treated seven C57BL/10ScSn-Dmdmdx mice with 60 mg/kg of nintedanib once daily for 4 weeks. As controls we used five untreated C57BL/10ScSn-Dmdmdx mice and five C57BL healthy mice.

After treatment, motor functional and electrophysiological studies were performed. Immediately after functional studies, the animals were euthanized and the diaphragm, tibialis anterior, quadriceps, and heart muscles were collected and frozen.

Motor functional analysis: Digigait assay

Locomotion analysis was performed using the Digigait Imaging system (Mouse Specifics, Quincy, MA). In brief, digital video images of the underside of the mouse were collected with a high-speed video camera (80 frames/s) from below the transparent belt of a motorized treadmill. Each mouse was allowed to explore the treadmill compartment, with the motor speed set to zero, for 5 min. Then, the motor speed was set to 20 cm/s to collect the videos. A minimum of 200 images was collected for each walking mouse so that five to seven strides were captured

in each run. Video images of 12.5 ms duration were digitized and the area (in pixels) of the paws was calculated with the DigiGait software.

Motor nerve conduction studies

Motor nerve conduction studies were performed at 10 months of age in all the animals used in the study as previously described⁶¹. The sciatic nerve was percutaneously stimulated through a pair of needle electrodes placed at the sciatic notch, by means of single pulses of 0.02 ms duration (Grass S88). The CMAP was recorded from the tibialis anterior, plantar interossei, and GM muscles with microneedle electrodes⁵⁰. All potentials were amplified and displayed on a digital oscilloscope (Tektronix 450 S) at settings appropriate to measure the amplitude from baseline to the maximal negative peak and the latency from stimulus to the onset of the first negative deflection, to the maximal negative peak and to the end of the wave. The recording needles were placed under microscope, guided by anatomical landmarks, to ensure reproducibility of needle location on all animals. During the tests, the mouse skin temperature was maintained between 34 and 36 °C using a thermostat heating pad. The observers were blinded to the experimental groups.

Electromyography

Electromyography (EMG) recordings of MUAPs were obtained from the tibialis anterior muscle following a similar protocol to that previously described⁶². With the mice under anesthesia, EMG recordings were obtained in resting condition and following light noxious stimuli delivered to the ipsilateral paw to provoke bursts of EMG activity. Signals were digitized (Powerlab 6 T; ADInstruments) and fed into Chart software for post hoc analysis. MUAPs were then categorized into small, medium, and large amplitude as a representation of the three main types of motor units (S, FR, FF)⁶³, and the amplitude and percentage of MUAPs from each class were measured. Von Frey (VF) monofilaments applied to the hind paw were also used to evoke bursts of EMG activity in the ipsilateral muscle. Since the force imposed by the filament is fairly constant, two different VF monofilaments were used to evoke responses, one with a known force of 10 g and 5.07 size and the other with a force of 26 g and a size of 5.46. The EMG responses recorded from the tibialis anterior muscle in response to those mechanical stimuli were recorded and analyzed to measure the area under the curve of each response using Chart software. At least, three different responses for each Von Frey filament were assessed per mouse.

Immunostaining

Muscle samples were frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane and serial 7 mm sections were cut with a

Leica cryostat (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). For histological description diaphragm, tibialis anterior, quadriceps, and heart were stained with haematoxylin and eosin. Tissue sections were blocked with PBS containing 2% bovine serum albumin and fixed with acetone at room temperature for 10 min. After three washes with PBS, tissue sections were incubated with rabbit polyclonal anti-Collagen type VI (Millipore, Billerica, MA), rabbit anti-Collagen type III (Abcam, Cambridge, UK), mouse monoclonal anti-embryonic Myosin Heavy Chain (eMHC) (DSHB, Iowa City, IA), and rabbit polyclonal CD31 (Abcam). Appropriate Alexa-conjugated secondary antibodies were used. Fibroblasts from cell proliferation studies were stained with anti-Ki-67 (Abcam). In brief, cells were fixed in methanol, washed in PBS, and blocked with 5% goat serum for 1 h. Anti-Ki-67 (1/1000) was incubated for 1 h at room temperature (RT) and after washing steps with PBS, cells were incubated with goat anti-mouse Alexa594 for 1 h at RT. Positive cells were quantified compared with the total number of present cells. Pictures were taken with Olympus BX51 coupled to a DP72 camera. Five random pictures were taken per condition per triplicate.

Collagen content quantification and muscle fibers geometric features extraction

Collagen content was labeled and was used to identify the contours of muscle fibers (darker regions). Aiming to avoid possible artefacts from the samples we took regions of interest (ROIs) with circular shape from each image. The ROIs were selected in regions where the tissue was not altered or broken. To calculate the collagen content in the images we took a maximum of three circular ROIs per image with a diameter of 700 pixels. An adaptive threshold was used to differentiate collagen and muscle fibers, binarizing each image depending of their levels of intensity.

To calculate geometric characteristics from the muscle fibers, we used an unique circular ROI with 2200 pixels of diameter. For this procedure, we selected 10 circular ROIs from each type of muscle for each category of mouse. The segmentation procedure and geometric features extraction was similar to the used in previous publications⁶⁴. In this case, we only extracted eight geometrical features from the muscle fibers: mean area, standard deviation area, mean minor axis, mean major axis, mean relation between axis, standard deviation relation between axis, mean convex hull, and standard deviation convex hull. A manual correction step process was introduced to perfectly complete the identification of the fibers outlines. This was done using Adobe Photoshop CS6, followed by the final segmentation process. This final image was used to extract the eight geometric characteristics from all the cells into the ROI of each image.

RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was extracted from snap frozen fibroblast pellets and muscle samples of treated, non-treated *mdx* and control mice using RNeasy® Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and TRIzol (Invitrogen) respectively, following manufacturer's instructions and stored at -80°C . Contaminating DNA was digested with DNase I (Invitrogen). RNA was quantified using a nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) and integrity was checked by 1% agarose gel electrophoresis. In all, 1 μg of total RNA was reverse-transcribed to complementary DNA (cDNA) using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Real-time quantitative PCR (TaqMan) analysis

Real-Time PCR (qPCR) of cDNA obtained from cells and mouse tissues was performed using the TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). All mRNA-specific FAM-labeled primers/probe were purchased from Applied Biosystems and detected cDNA from the following genes: *Ctgf* (Mm01192933_g1), *Pdgfa* (Mm01205760_m1), *Pdgfb* (Mm00440677_m1), *Tgfb1* (Mm01178820_m1), *Col1a1* (Mm00801666_g1), *Col3a1* (Mm01254476_m1), *Fnl1* (Mm01256744_m1), *Adgre1* (Mm00802529_m1), *PDGFA* (Hs00964426_m1), *CTGF* (Hs01026927_g1), *PDGFB* (Hs00966522_m1), *TGFBI* (Hs00998133_m1), *COL1A1* (Hs00164004_m1), *COL3A1* (Hs00943809_m1), *FNI* (Hs01549976_m1), *ACTA* (Hs00426835_g1), *MMP9* (Hs00957562_m1), *MMP2* (Hs01548727_m1), *MMP1* (Hs00899658_m1), *TIMP-1* (Hs99999139_m1), *TIMP-2* (Hs00234278_m1), *ADAM-12* (Hs01106101_m1), *ADAM-17* (Hs01041915_m1), *TP53* (Hs01034249_m1). All the experiments were performed in triplicate. Relative quantification was performed using the comparative Ct method and all results were compared with the control samples for each treatment after normalizing to an endogenous control (GAPDH (Hs99999905_m1) in the case of human fibroblasts and Tuba4a (Mm00849767_s1) in the case of mice using the Relative Quantification Manager software (Applied Biosystems, Foster City, CA). Data in bar graphs are presented as mean \pm standard deviation of three independent samples in the case of fibroblasts, five in the case of C57 and *mdx* and seven in the case of treated *mdx* mice.

Western blot

Total proteins from diaphragm, tibialis anterior, and quadriceps muscles were extracted in radio-immunoprecipitation assay lysis buffer (Sigma, St. Louis, MO) supplemented with 1% protease inhibitor cocktail

(Roche, Indianapolis, IN) and 1% phosphatase inhibitor cocktail (Roche). The protein levels were measured using the bicinchoninic acid protein assay (Thermo-scientific, Rockford, IL). Protein samples (50 μg) were denatured and separated on 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis before transfer onto a polyvinylidene difluoride membrane and blocked with casein (ThermoFisher, Rockford, IL). The blots were probed using different rabbit polyclonal anti-Collagen I antibodies (Abcam, Cambridge, UK). The blots were further incubated with secondary antibodies conjugated to fluorophores (LI-COR, Lincoln, Nebraska) and visualized using an Odyssey Imaging System (LI-COR). Protein levels were expressed relative to α -tubulin. Mouse monoclonal anti- α -tubulin antibody was purchased from Sigma (St. Louis, MO).

Statistics

We used Student's *t* test to compare quantitative measures between samples and analysis of variance to study repeated measures. Statistical significance was obtained at $p < 0.05$. Statistical studies were performed with SPSS® Statistics software version 21 from IBM® and graphics were developed using GraphPad Prism 5.01 software (La Jolla, CA).

Acknowledgements

We thank the people of the Neuromuscular Disorders Unit laboratory and the animal room staff at Sant Pau Hospital. We thank Anna Molins for the technical support to the experiments. We also thank Marisol Montolio, from DPPE, for her comments and continuous support. This study has been funded by Duchenne Parent Project Spain, Fundación Isabel Gemio and Boehringer-Ingelheim and a grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) PI15/01822 (J.D.-M.). L.M.E., and P.G.-G. are supported by the Ramón y Cajal program (PI13/01347); L.M.E., and P.G.-G. are supported by the Ramón y Cajal program (PI13/01347); L.M.E., and P.G.-G. work is funded by the Ministry of Economy, Industry and Competitiveness grant BFU2016-74975-P co-funded by FEDER funds.

Author details

¹Neuromuscular disorders Unit, Neurology department, Universitat Autònoma de Barcelona, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain. ²Centro de Investigación Básica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain. ³Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Institute of Neurosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain. ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Valencia, Spain. ⁵Departamento de Biología Celular, Universidad de Sevilla and Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, 41013 Sevilla, Spain. ⁶Immunology & Respiratory Diseases Research, Boehringer-Ingelheim, Biberach, Germany

Conflict of interest

Patricia Piñol-Jurado, Xavier Suárez-Calvet, Esther Fernández, Eduard Gallardo, Natalia de la Oliva, Anna Martínez-Muriana, Pedro Gómez-Gálvez, Luis M. Escudero, María Pérez-Peiró, Noemí de Luna, Xavier Navarro, and Isabel Illa have not any relevant conflict of interest. Lutz Wollin is an employee of Boehringer-Ingelheim the inventor of nintedanib used in this study. Jordi Díaz-Manera has received a research grant from Boehringer-Ingelheim.

Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary Information accompanies this paper at (<https://doi.org/10.1038/s41419-018-0792-6>).

Received: 10 December 2017 Revised: 24 May 2018 Accepted: 14 June 2018

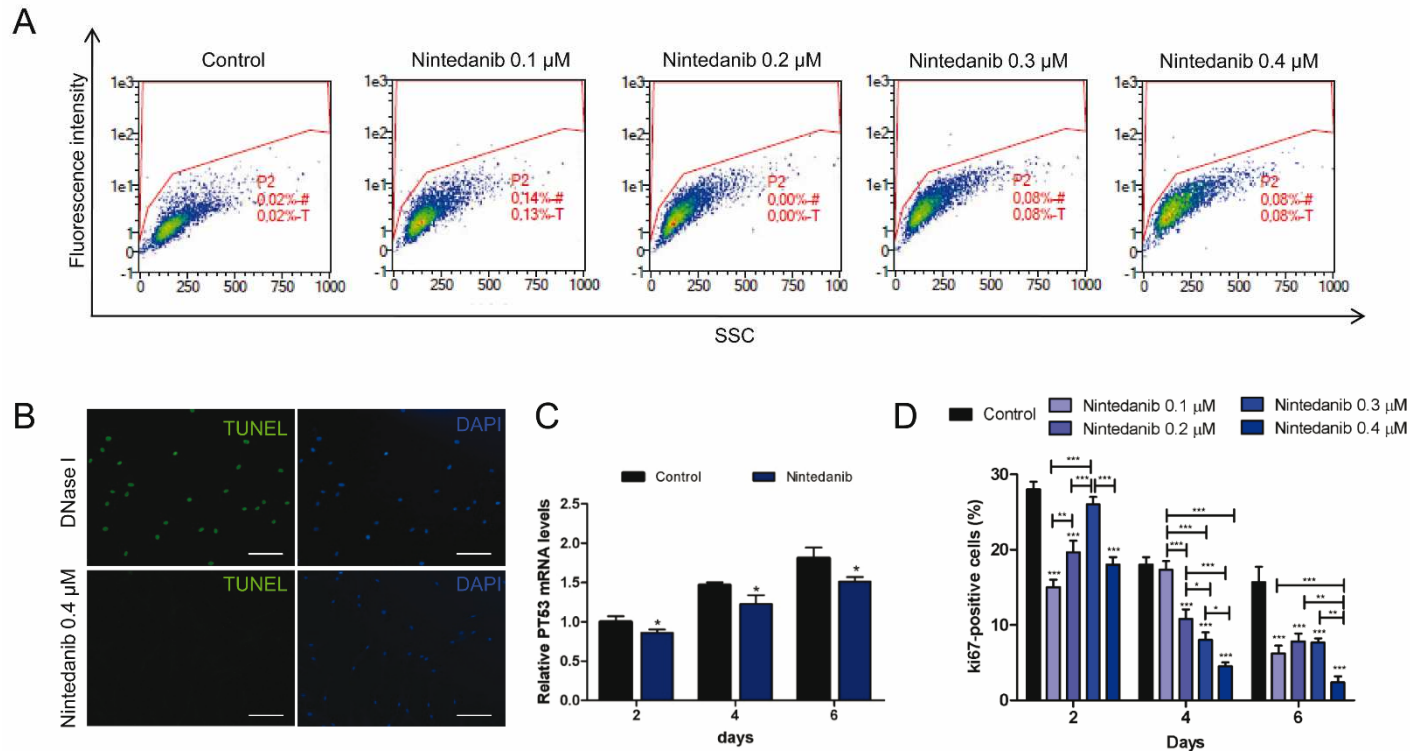
Published online: 10 July 2018

References

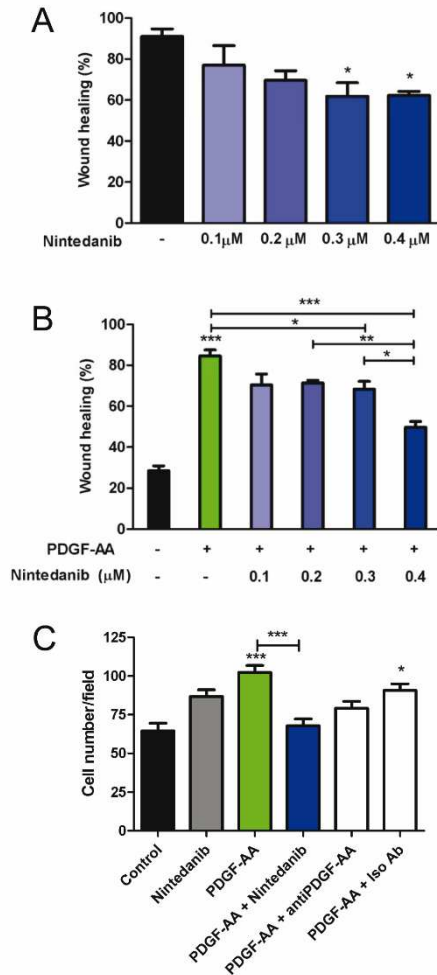
- Bushby, K. et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* **9**, 77–93 (2010).
- Moxley, R. T. 3rd, Pandya, S., Ciafaloni, E., Fox, D. J. & Campbell, K. Change in natural history of Duchenne muscular dystrophy with long-term corticosteroid treatment: implications for management. *J. Child Neurol.* **25**, 1116–1129 (2010).
- Guiraud, S. & Davies, K. E. Pharmacological advances for treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Curr. Opin. Pharmacol.* **34**, 36–48 (2017).
- Tedesco, F. S., Dellavalle, A., Diaz-Manera, J., Messina, G. & Cossu, G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J. Clin. Invest.* **120**, 11–19 (2010).
- Cossu, G. et al. Intra-arterial transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol. Med.* **7**, 1513–1528 (2015).
- Skuk, D. & Tremblay, J. P. Cell therapy in muscular dystrophies: many promises in mice and dogs, few facts in patients. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **15**, 1307–1319 (2015).
- Kayali, R. et al. Read-through compound 13 restores dystrophin expression and improves muscle function in the mdx mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 4007–4020 (2012).
- Malerba, A. et al. Chronic systemic therapy with low-dose morpholino oligomers ameliorates the pathology and normalizes locomotor behavior in mdx mice. *Mol. Ther.* **19**, 345–354 (2011).
- McDonald, C. M. et al. Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACT DMD): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* **390**, 1489–1498 (2017).
- Charleston, J. S. et al. Eteplirsen treatment for Duchenne muscular dystrophy: exon skipping and dystrophin production. *Neurology* **90**, e2146–e2154 (2018).
- Bengtsson, N. E. et al. Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Commun.* **8**, 14454 (2017).
- Koo, T. et al. Functional rescue of dystrophin deficiency in mice caused by frameshift mutations using campylobacter jejuni Cas9. *Mol. Ther.* **26**, 1529–1538 (2018).
- Wallace, G. Q. & McNally, E. M. Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annu. Rev. Physiol.* **71**, 37–57 (2009).
- Klingler, W., Jurkat-Rott, K., Lehmann-Horn, F. & Schleip, R. The role of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol.* **31**, 184–195 (2012).
- Bernasconi, P. et al. Transforming growth factor-beta1 and fibrosis in congenital muscular dystrophies. *Neuromuscul. Disord.* **9**, 28–33 (1999).
- Gosselin, L. E. et al. Localization and early time course of TGF-beta 1 mRNA expression in dystrophic muscle. *Muscle Nerve* **30**, 645–653 (2004).
- Ishitobi, M. et al. Elevated plasma levels of transforming growth factor beta1 in patients with muscular dystrophy. *Neuroreport* **11**, 4033–4035 (2000).
- Zhou, L. & Lu, H. Targeting fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **69**, 771–776 (2010).
- McGeary, R. P., Bennett, A. J., Tran, Q. B., Cosgrove, K. L. & Ross, B. P. Suramin: clinical uses and structure-activity relationships. *Mini Rev. Med. Chem.* **8**, 1384–1394 (2008).
- Andrae, J., Gallini, R. & Betsholtz, C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* **22**, 1276–1312 (2008).
- Ito, T. et al. Imatinib attenuates severe mouse dystrophy and inhibits proliferation and fibrosis-marker expression in muscle mesenchymal progenitors. *Neuromuscul. Disord.* **23**, 349–356 (2013).
- Joe, A. W. et al. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat. Cell Biol.* **12**, 153–163 (2010).
- Hilberg, F. et al. BIBF 1120: triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. *Cancer Res.* **68**, 4774–4782 (2008).
- Richeldi, L. et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **370**, 2071–2082 (2014).
- Huang, J. et al. Nintedanib inhibits fibroblast activation and ameliorates fibrosis in preclinical models of systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 883–890 (2016).
- Hostettler, K. E. et al. Anti-fibrotic effects of nintedanib in lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Res.* **15**, 157 (2014).
- Chapman, M. A., Meza, R. & Lieber, R. L. Skeletal muscle fibroblasts in health and disease. *Differentiation* **92**, 108–115 (2016).
- Mann, C. J. et al. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skelet. Muscle* **1**, 21 (2011).
- Schneider, L. et al. Directional cell migration and chemotaxis in wound healing response to PDGF-AA are coordinated by the primary cilium in fibroblasts. *Cell Physiol. Biochem.* **25**, 279–292 (2010).
- Pines, M. et al. Elevated expression of moesin in muscular dystrophies. *Am. J. Pathol.* **187**, 654–664 (2017).
- Pessina, P. et al. Fibrogenic cell plasticity blunts tissue regeneration and aggravates muscular dystrophy. *Stem Cell Rep.* **4**, 1046–1060 (2015).
- Cossu, G. & Sampaolesi, M. New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials. *Trends Mol. Med.* **13**, 520–526 (2007).
- Serrano, A. L. & Munoz-Canoves, P. Fibrosis development in early-onset muscular dystrophies: mechanisms and translational implications. *Sem. Cell Dev. Biol.* **64**, 181–190 (2017).
- Kuno, A. & Horio, Y. SIRT1: a novel target for the treatment of muscular dystrophies. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016**, 6714686 (2016).
- Uezumi, A. et al. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J. Cell Sci.* **124**, 3654–3664 (2011).
- Zhao, Y. et al. Platelet-derived growth factor and its receptors are related to the progression of human muscular dystrophy: an immunohistochemical study. *J. Pathol.* **201**, 149–159 (2003).
- Uezumi, A. et al. Identification and characterization of PDGFRalpha+ mesenchymal progenitors in human skeletal muscle. *Cell Death Dis.* **5**, e1186 (2014).
- Ieronimakis, N. et al. Coronary adventitial cells are linked to perivascular cardiac fibrosis via TGFbeta1 signaling in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *J. Mol. Cell Cardiol.* **63**, 122–134 (2013).
- Olson, L. E. & Soriano, P. Increased PDGFRalpha activation disrupts connective tissue development and drives systemic fibrosis. *Dev. Cell* **16**, 303–313 (2009).
- Huang, P., Zhao, X. S., Fields, M., Ransohoff, R. M. & Zhou, L. Imatinib attenuates skeletal muscle dystrophy in mdx mice. *FASEB J.* **23**, 2539–2548 (2009).
- van Roeyen, C. R., Ostendorf, T. & Floege, J. The platelet-derived growth factor system in renal disease: an emerging role of endogenous inhibitors. *Eur. J. Cell Biol.* **91**, 542–551 (2012).
- Pinol-Jurado, P. et al. Platelet-derived growth factor BB influences muscle regeneration in duchenne muscle dystrophy. *Am. J. Pathol.* **187**, 1814–1827 (2017).
- Lemos, D. R. et al. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat. Med.* **21**, 786–794 (2015).
- Murphy, M. M., Lawson, J. A., Mathew, S. J., Hutcheson, D. A. & Kardon, G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development* **138**, 3625–3637 (2011).
- Chamberlain, J. S., Metzger, J., Reyes, M., Townsend, D. & Faulkner, J. A. Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. *FASEB J.* **21**, 2195–2204 (2007).
- Han, J. J. et al. Electromyographic studies in mdx and wild-type C57 mice. *Muscle Nerve* **33**, 208–214 (2006).
- Boldrin, L., Zammit, P. S. & Morgan, J. E. Satellite cells from dystrophic muscle retain regenerative capacity. *Stem Cell Res.* **14**, 20–29 (2015).
- Sacco, A. et al. Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell* **143**, 1059–1071 (2010).
- Meng, J., Benze, M., Afshani, R., Muntoni, F. & Morgan, J. E. The effect of the muscle environment on the regenerative capacity of human skeletal muscle stem cells. *Skelet. Muscle* **5**, 11 (2015).

50. Bizarío, J. C. et al. Imatinib mesylate ameliorates the dystrophic phenotype in exercised mdx mice. *J. Neuroimmunol.* **212**, 93–101 (2009).
51. Kerela, R. et al. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat. Med.* **12**, 908–916 (2006).
52. Cervantes, F. et al. Imatinib dose reduction in patients with chronic myeloid leukemia in sustained deep molecular response. *Ann. Hematol.* **96**, 81–85 (2017).
53. Heinrich, M. et al. Correlation of long-term results of imatinib in advanced gastrointestinal stromal tumors with next-generation sequencing results: analysis of Phase 3 SWOG Intergroup Trial 50033. *JAMA Oncol.* **3**, 944–952 (2017).
54. Akhmetshina, A. et al. Dual inhibition of c-abl and PDGF receptor signaling by dasatinib and nilotinib for the treatment of dermal fibrosis. *FASEB J.* **22**, 2214–2222 (2008).
55. Hochhaus, A. et al. Frontline nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from the European ENEST1st study. *Leukemia* **30**, 57–64 (2016).
56. Heinrich, M. C. et al. Crenolanib inhibits the drug-resistant PDGFRA D842V mutation associated with imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Clin. Cancer Res.* **18**, 4375–4384 (2012).
57. Dai, J. et al. Large-scale analysis of PDGFRA mutations in melanomas and evaluation of their sensitivity to tyrosine kinase inhibitors imatinib and crenolanib. *Clin. Cancer Res.* **19**, 6935–6942 (2013).
58. Hassanein, M., Almahayni, M. H., Ahmed, S. O., Gaballa, S. & El Fakih, R. FLT3 Inhibitors for Treating Acute Myeloid Leukemia. *Clin. Lymphoma, Myeloma & Leuk.* **16**, 543–549 (2016).
59. Ieronimakis, N. et al. PDGFRalpha signalling promotes fibrogenic responses in collagen-producing cells in Duchenne muscular dystrophy. *J. Pathol.* **240**, 410–424 (2016).
60. Hall, A. P., Westwood, F. R. & Wadsworth, P. F. Review of the effects of anti-angiogenic compounds on the epiphyseal growth plate. *Toxicol. Pathol.* **34**, 131–147 (2006).
61. Mancuso, R., Santos-Nogueira, E., Osta, R. & Navarro, X. Electrophysiological analysis of a murine model of motoneuron disease. *Clin. Neurophysiol.* **122**, 1660–1670 (2011).
62. Flix, B. et al. Bone marrow transplantation in dysferlin-deficient mice results in a mild functional improvement. *Stem. Cells Dev.* **22**, 2885–2894 (2013).
63. Gordon, T., Thomas, C. K., Munson, J. B. & Stein, R. B. The resilience of the size principle in the organization of motor unit properties in normal and reinnervated adult skeletal muscles. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **82**, 645–661 (2004).
64. Sanchez-Gutierrez, D., Saez, A., Gomez-Galvez, P., Paradas, C. & Escudero, L. M. Rules of tissue packing involving different cell types: human muscle organization. *Sci. Rep.* **7**, 40444 (2017).

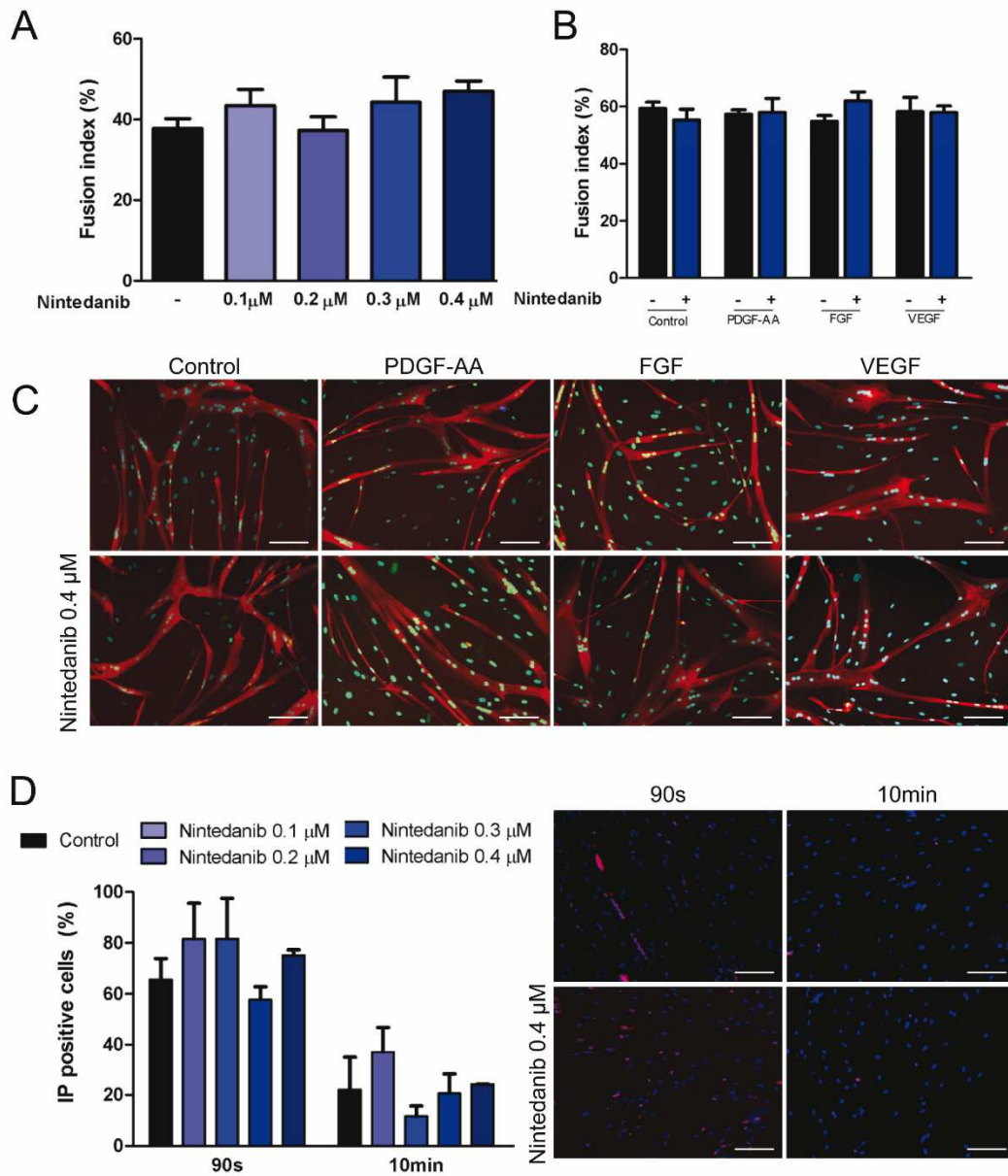
4.2.1 MATERIAL SUPLEMENTARIO



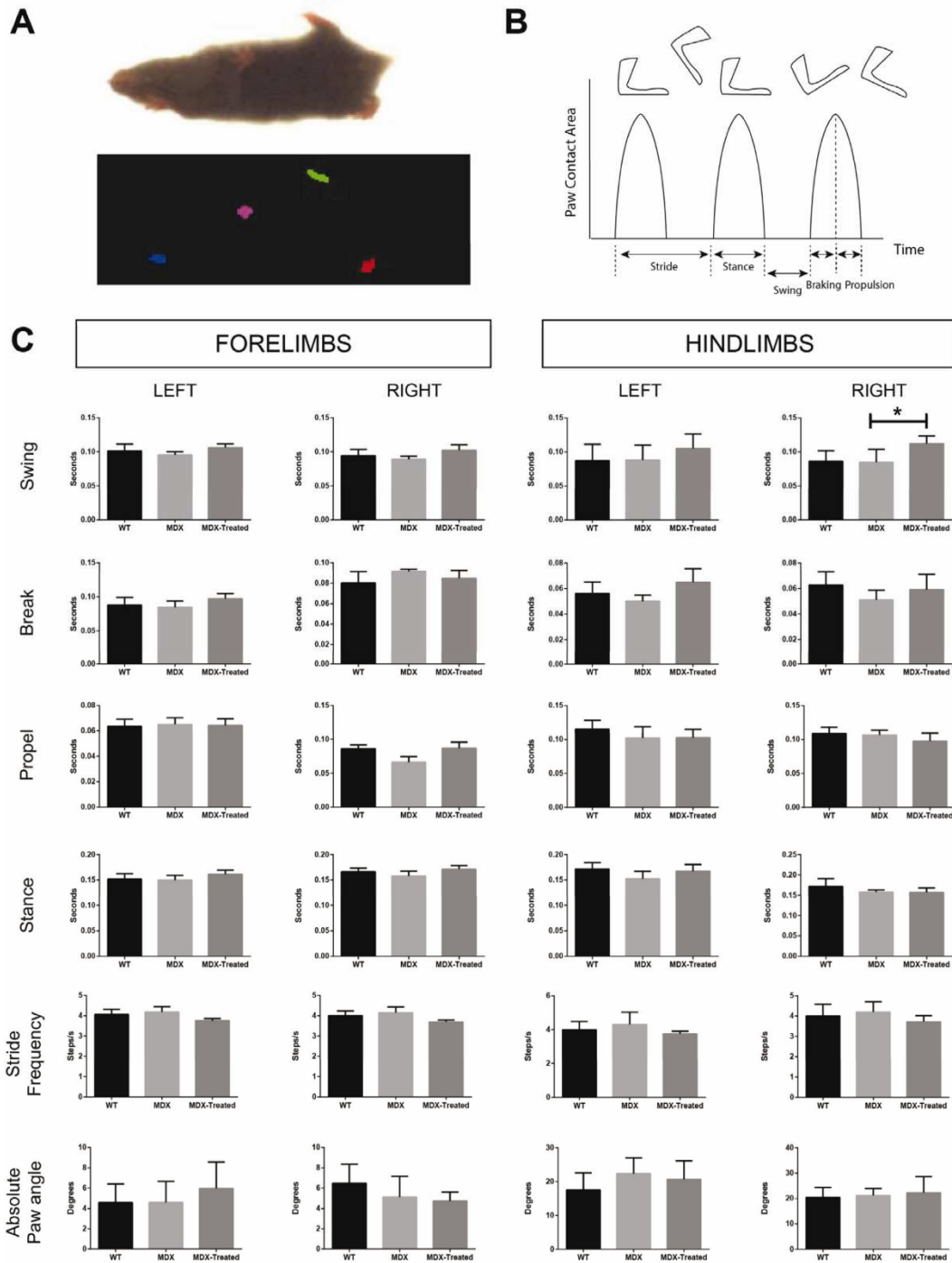
Supplemental Figure S1. *In vitro* effects of nintedanid on proliferation and viability of fibroblasts. Treatment with nintedanib at increasing doses did not influence cell viability as analyzed using LIVE/DEATH viability kit with flow cytometry (**A**). Nintedanib did not induced apoptosis of fibroblasts treated at 0.4 μ M as analyzed using TUNEL assay (**B**). Nintedanib at 0.4 μ M significantly reduced PT53 expression by fibroblasts (**C**). The proportion of Ki67+ cells significantly decreased in a dose dependent manner (**D**). *P < 0.05, **P < 0.01, **** p<0.0001



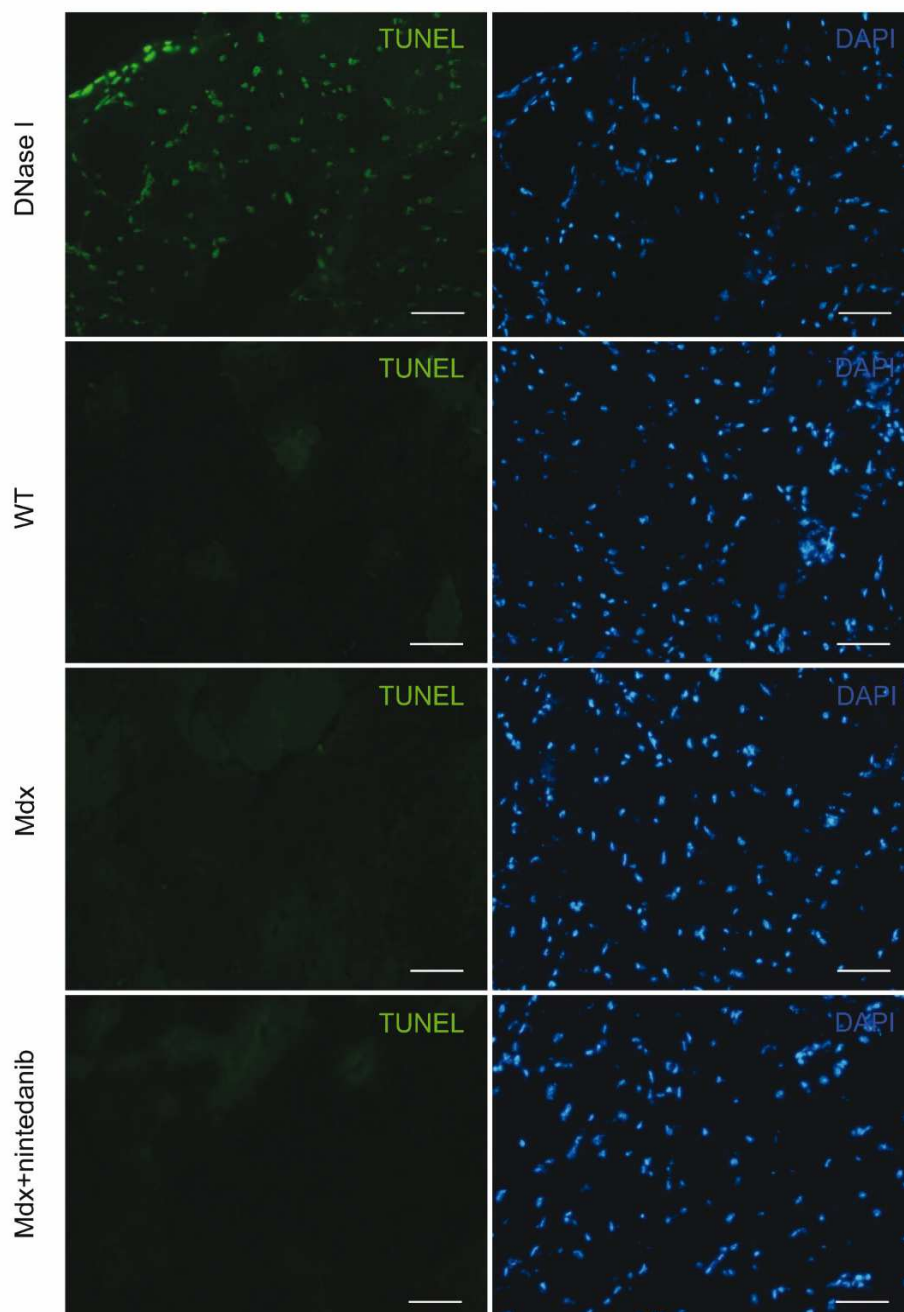
Supplemental Figure S2. Effect of nintedanib on fibroblast migration and chemotaxis. Fibroblast migration was analyzed using scratch assay. Nintedanid treatment significantly decreased constitutive fibroblasts migration in a dose dependent manner **(A)** and reverted the promigratory effect of PDGF-AA on fibroblasts in a dose dependent manner **(B)**. Transwell migration assays to study chemotaxis showed that PDGF-AA at 10 ng/mL increased fibroblast migration, an effect reversed by nintedanib at 0.4 μ M **(C)**. *P < 0.05, **P < 0.01, **** p<0.0001.



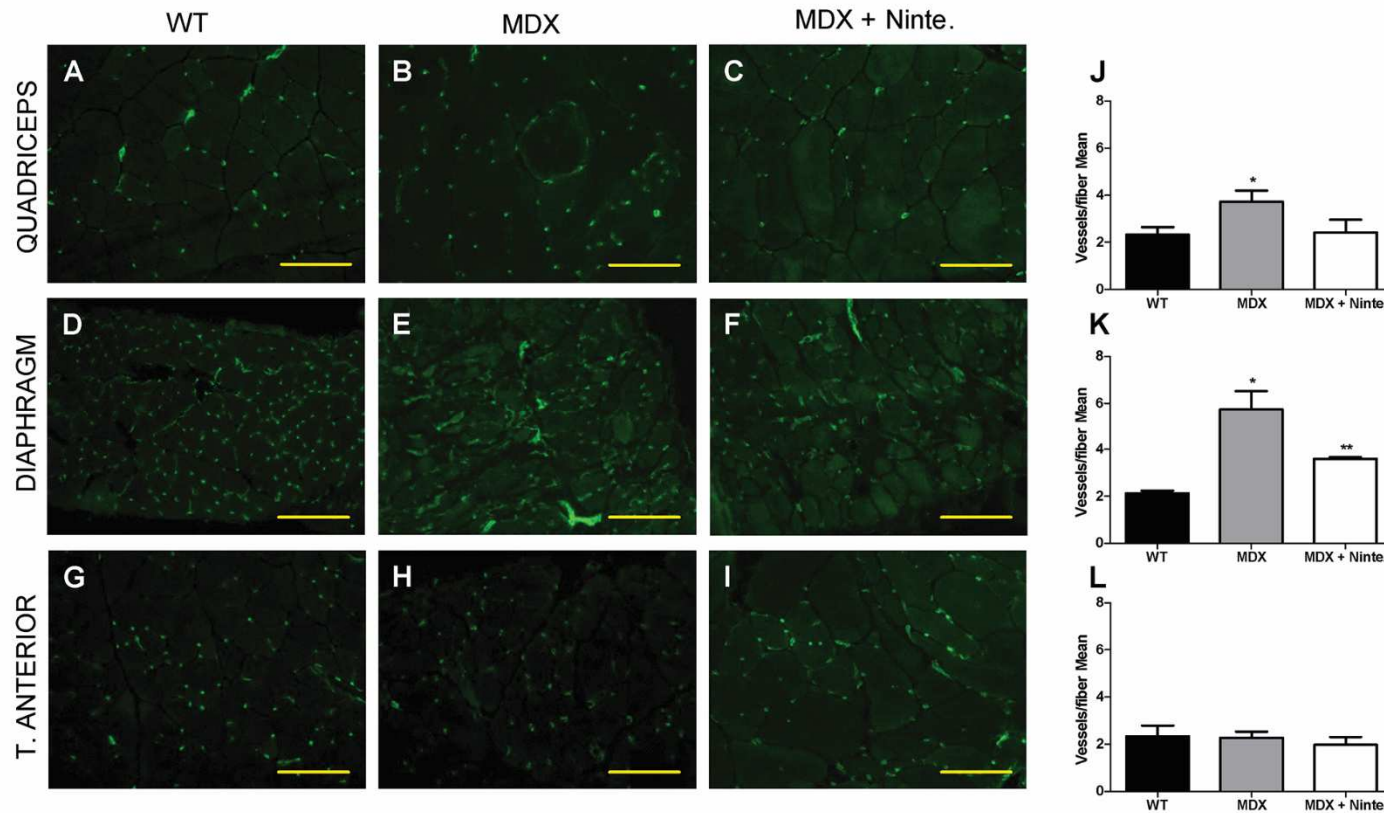
Supplemental Figure S3. Effect of nintedanib on differentiation of myoblasts and repair of myotubes. Increasing doses of nintedanib did not influence differentiation of myoblasts *in vitro* measured by fusion index (**A**). We did not observe any effect of PDGF-AA, FGFb and VEGF-A on myoblasts differentiation (**B**). Representative pictures of myotubes cultured with PDGF-AA, FGF or VEGF with nintedanib are shown (**C**), Scale bar= 200 μ m. Repair assay after chemical damage induced by SDS at 0.25mM in myotubes cultured with increasing doses of nintedanib. The number of propidium iodide (IP) cells did not differ compared to control (**D**), Scale bar= 100 μ m.



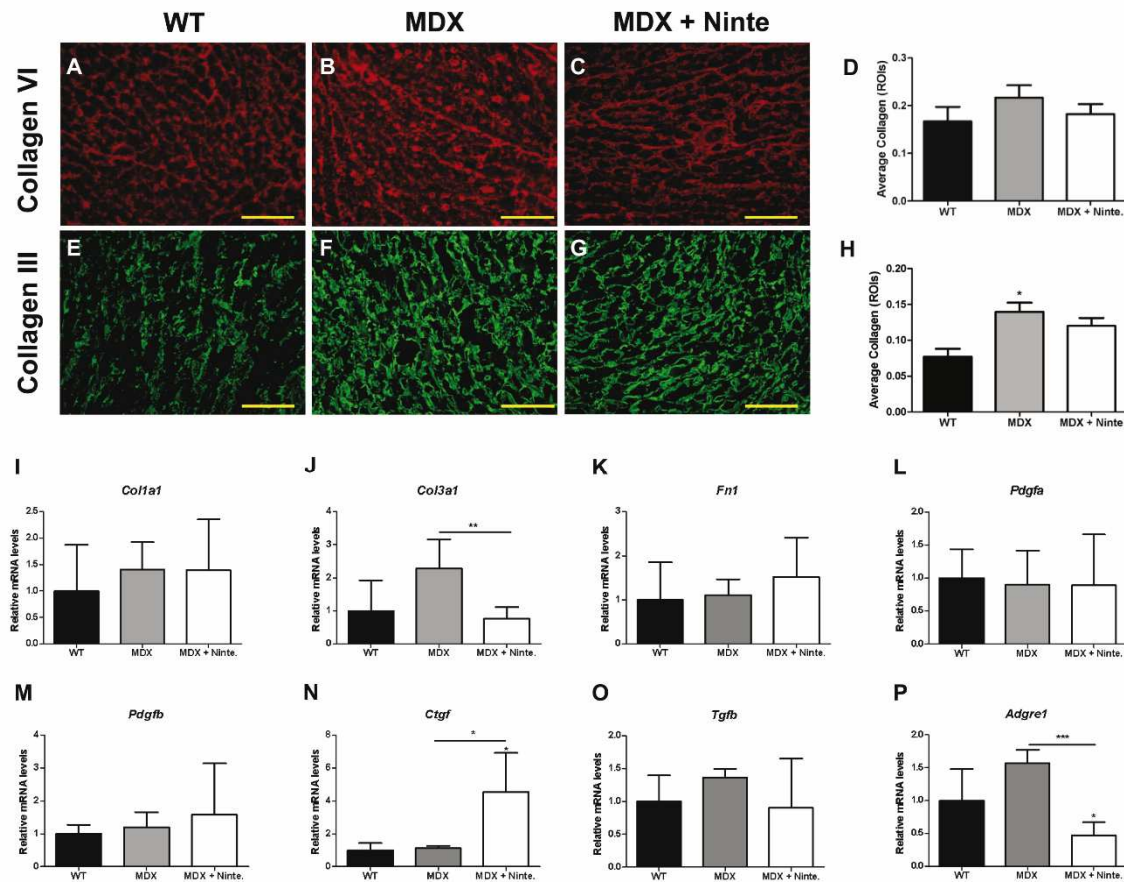
Supplemental Figure S4. Results of locomotion analysis (digigait). Digigait allows to study mouse locomotion analyzing digital video images of the underside (**A**). Different parameters can be studied such as stride, stance, swing, braking and propulsion (**B**). We did not observe significant differences in any of the parameters studied between wild type, *mdx* mice and nintedanib treated *mdx* mice. *P < 0.05.



Supplemental Figure S5. Analysis of apoptosis on muscle biopsies from wild type, *mdx* mice and nintedanib treated *mdx* mice. Nintedanib treatment did not induced apoptosis in skeletal muscles of the treated mice analyzed using TUNEL assay. DNase I incubation of tissues were used as positive control. Scale bar= 100 μ m.



Supplemental Figure S6. Nintedanib did not influence muscle vascularization. **A-I:** Representative pictures of immunofluorescence staining with cluster of differentiation 31(CD31) antibodies in *quadriceps* (**A-C**), diaphragm (**D-F**) and *tibialis anterior* (**G-I**) of WT, *mdx* and nintedanib treated-*mdx* mice. **J-L:** quantification of vessels per fiber mean in *quadriceps* (**J**), diaphragm (**K**) and *tibialis anterior* (**L**). Data are expressed as means \pm SD. Genetic background mouse strain C57BL (WT); n = 5, *mdx* mice (*mdx*), n = 5; nintedanib treated *mdx* mice (*mdx* + Ninte), n = 7. *P < 0.05, **P < 0.01. Scale bar = 100 μ m.



Supplemental Figure S7. Representative pictures and quantification of immunofluorescence staining for collagen VI (**A-D**) and collagen III in heart (**E-H**) of WT, *mdx* and nintedanib treated *mdx* mice. Data are expressed as means \pm SD. Scale bar = 100 μ m. RT-qPCR studying mRNA expression of fibrosis related genes in heart: *Col1a1* (**I**), *Col3a1* (**J**), *Fn1* (**K**), *Pdgfa* (**L**), *Pdgfb* (**M**), *Ctgf* (**N**), *Tgfb* (**O**), and *Adgre1* (**P**). Data are expressed as means \pm SD. Genetic background mouse strain C57BL (WT); n = 5, *mdx* mice (*mdx*), n = 5; nintedanib treated *mdx* mice (*mdx* + Ninte), n = 7. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

5. SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS

5.1. RESUMEN DE LOS RESULTADOS ARTÍCULO I

Los estudios de inmunofluorescencia realizados en biopsias controles detectó la presencia de PDGF-BB en las paredes de los capilares en el grupo control. Sin embargo, en biopsias de pacientes DMD, detectamos PDGF-BB no sólo en los vasos sanguíneos sino también en las fibras regenerativas (positivas para el marcador de la cadena pesada de la miosina embrionaria (eMHC)) y necróticas (fibras observadas más pálidas en una tinción eosina-hematoxilina), así como en los infiltrados inflamatorios (macrófagos, células T CD4+ y CD8+). Las células con capacidad de regenerar el músculo, las SCs, las cuales se identificaron con un anticuerpo contra el marcador pax7, no fueron positivas para PDGF-BB en ninguno de los grupos. Respecto al receptor PDGF β , identificamos su presencia en pericitos adyacentes a los vasos sanguíneos de los controles, mientras que en los pacientes DMD, este receptor estaba expresado además de en los vasos sanguíneos, en el sarcolema y sarcoplasma de fibras musculares. Las SCs también expresaban el receptor, tanto en controles como en pacientes DMD. Para confirmar estos resultados *in vitro*, mioblastos (SCs en cultivo) de controles y pacientes se diferenciaron a miotubo, el modelo *in vitro* de una fibra muscular. Lo que se observó mediante inmunofluorescencia fue un incremento de la expresión de PDGF-BB muy significativa en los miotubos, confirmado también a nivel de mRNA. El receptor PDGF β también fue observado en mioblastos en cultivo.

Para investigar si un daño agudo en el músculo esquelético que conlleva a una regeneración muscular fisiológica podía incrementar la expresión de PDGF-BB, se indujo un daño tanto en un modelo *in vitro* como *in vivo*. *In vitro*, se trataron miotubos de pacientes control y DMD en 3 condiciones diferentes: con dos agentes químicos (dodecilsulfato sódico (SDS) e ionomicina), y con bolas de cristal produciendo un daño físico, a diferentes tiempos (10, 20 y 30 minutos). Se observó un incremento de la concentración de PDGF-BB en el sobrenadante de las células dañadas mediante la

técnica ELISA, en todas las condiciones respecto al basal (células no dañadas). Este incremento sólo se observó a los 30 minutos del daño celular en los miotubos control, mientras que en los miotubos DMD este aumento era mayor y ocurrió también antes, a los 10 y 20 minutos de producirse el daño. Además, tratamos ratones WT y *mdx* de 5 meses de edad con inyecciones intramusculares de notexina en el tibial anterior en diferentes tiempos, mientras que un grupo control para cada cepa se trató con vehículo. Al igual que en el modelo *in vitro*, se detectó un aumento de PDGF-BB tras el tratamiento con notexina a nivel de expresión génica (mRNA) y a nivel proteico mediante la técnica qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) y WB, respectivamente, tanto en el ratón WT como en el *mdx*. Las fibras musculares, tanto necróticas como regenerativas, junto al infiltrado inflamatorio produjeron PDGF-BB, que tuvo su pico de expresión al tercer día del daño muscular en el ratón WT y a las 24 horas en el ratón *mdx*, coincidiendo con el pico máximo del infiltrado inflamatorio y el inicio del proceso de regeneración, hasta volver a los niveles basales al completarse la regeneración (día 21).

La evaluación de la influencia de PDGF-BB en el proceso de regeneración también se estudió *in vitro* e *in vivo*. En el primer caso se trataron mioblastos en cultivo con 10 ng/ml de PDGF-BB y se estudió su efecto en la proliferación, migración y diferenciación, mediante curvas de crecimiento tras 6 días de tratamiento, ensayos de migración *Transwell* y diferenciación a miotubo en cultivo, respectivamente. PDGF-BB incrementó la proliferación de mioblastos a partir del cuarto día de tratamiento e indujo su migración de un modo dosis-dependiente. Sin embargo, PDGF-BB no produjo ningún efecto en la diferenciación de mioblasto a miotubos. La vía de señalización activada tras inducir los mioblastos con PDGF-BB fue PI3K/Akt. Para estudiar el papel de PDGF-BB en el modelo distrófico *mdx* se trataron 4 ratones *mdx* de 8 meses de edad con inyecciones intramusculares de PDGF-BB en el tibial anterior, 2 veces por semana durante un mes. Después del análisis histológico se detectó una reducción de infiltrados inflamatorios y un aumento de células satélite y células regenerativas en el grupo de animales tratados con

PDGF-BB respecto al grupo tratado con vehículo, indicando una contribución de PDGF-BB en la expansión del *pool* de las principales células implicadas en la regeneración muscular, como un *proof of principle*. El tratamiento con PDGF-BB tampoco aumentó el colágeno I del intersticio.

5.2. RESUMEN DE LOS RESULTADOS ARTÍCULO II

Los experimentos *in vitro* se realizaron para conocer mejor los mecanismos moleculares por los que nintedanib podría actuar como agente anti-fibrótico. Para ello, se diseñaron experimentos para estudiar la proliferación, migración y diferenciación de fibroblastos humanos control mediante curvas de proliferación, ensayos de herida o de rasguño (*wound healing assay* o *scratch assay* en inglés) y análisis de la expresión de genes pro-fibróticos, respectivamente. Nintedanib fue testado en fibroblastos creciendo en un medio de cultivo rico en suero fetal bovino (FBS) durante 6 días lo que generó la proliferación de estas células. Nintedanib disminuyó la proliferación de una forma dosis-dependiente alcanzado su máximo potencial de inhibición a una concentración de 0,4 μM , y por lo tanto se utilizó esta concentración en los experimentos posteriores. También se evaluó qué factor de crecimiento cuyo receptor es diana de nintedanib podía ser responsable de la proliferación. Para ello se realizaron curvas de crecimiento en un medio de cultivo pobre en FBS pero rico en PDGF-AA, FGFb o VEGF-A. Sólo PDGF-AA produjo un aumento en la proliferación y nintedanib fue capaz de inhibir este efecto. El ensayo de rasguño se realizó en un medio rico en diferentes factores de crecimiento, como PDGF-AA, FGFb, VEGF-A, TGF β y CTGF. Todos estos factores promovieron la migración de los fibroblastos a las 24 horas de cultivo. Nintedanib bloqueó la migración de los fibroblastos tratados con FGFb, VEGF-A, CTGF y PDGF-AA, siendo este último el más bloqueado hasta niveles basales. Este resultado con PDGF-AA también fue confirmado por un ensayo de migración *Transwell*. Además, se analizaron diferentes genes relacionados con

la migración en fibroblastos tratados con PDGF-AA y PDGF-AA y nintedanib durante 24 horas. Los niveles de expresión de los genes ADAM17, TIMP1 y TIMP2 decrecieron con el tratamiento de PDGF-AA, pero se restablecieron tras el tratamiento de nintedanib/PDGF-AA. La expresión de genes pro-fibróticos analizados en el ratón *mdx* - COL1A1, COL1A3, FN1, PDGF-AA, CTGF y TGFB1 - también fueron disminuidos con el tratamiento de nintedanib durante 4 días en un medio de cultivo rico en FBS.

Además, se estudió el posible efecto tóxico de nintedanib en la diferenciación de mioblastos a miotubo y en la reparación del sarcolema. Después de tratar los mioblastos en confluencia con nintedanib durante 7 días, éstos no mostraron diferencias en cuanto al índice de diferenciación en comparación al experimento control. Tras un daño químico a los miotubos con SDS, éstos se repararon igual con o sin la presencia de nintedanib. Para testar el efecto de nintedanib *in vivo* se trataron siete ratones macho *mdx* de 10 meses de edad con 60 mg/kg/día de nintedanib durante un mes mediante la técnica de alimentación forzada utilizando una cánula gástrica, los cuales fueron comparados con cinco ratones *mdx* y cinco ratones WT de la cepa C57 no tratados. Tras este tiempo se realizaron estudios de la marcha sobre la plataforma DigiGait y estudios electrofisiológicos. Los resultados del DigiGait no mostraron ninguna diferencia entre las 3 poblaciones de estudio, por lo que esta técnica no fue informativa para sacar conclusiones. Las pruebas electrofisiológicas consistieron en estudios de conducción motora y de electromiografía (EMG). La conducción motora fue estudiada en el gastrocnemio, músculo plantar y tibial anterior. El ratón *mdx* mostró una disminución de la amplitud del potencial de acción muscular compuesto (CMAP) en comparación al animal WT. En el ratón *mdx* tratado la amplitud del CMAP aumentó en todos los músculos, hasta niveles normales y de forma significativa en el músculo tibial anterior. Por otro lado, el EMG en el tibial anterior mostró una normalización de la amplitud y morfología de los potenciales de acción de la unidad motora (MUAPs), encontrando una proporción similar de MUAPs pequeños y medianos entre el ratón WT y el ratón tratado, mientras que el *mdx* no tratado tenía un mayor

porcentaje de MUAPs pequeños. La disminución del porcentaje de MUAPs pequeños tras el tratamiento con nintedanib fue estadísticamente significativo. A continuación, sacrificamos a los animales y obtuvimos el diafragma, cuádriceps y tibial anterior, que son los músculos de estudio en adelante. El análisis histológico mediante la tinción con hematoxilina-eosina no mostró diferencias en el tamaño de las fibras ni en la proporción de núcleos centrales. Mediante el método de inmunohistoquímica se analizó el número de vasos por fibra (al ser VEGFR inhibido por nintedanib), el número de fibras regenerativas y la cantidad de colágeno VI por área analizada. El número de vasos marcados con el anticuerpo anti-CD31 por fibra mostró una tendencia a revertir el aumento observado en el ratón *mdx* tras el tratamiento con nintedanib en el cuádriceps y diafragma. Se observó que el número de fibras regenerativas, marcadas con el anticuerpo contra el marcador temprano de la regeneración eMHC, aumentó considerablemente en los músculos del ratón *mdx*, sin embargo, en el ratón *mdx* tratado el número de estas fibras disminuyó en comparación al ratón *mdx* no tratado, más marcadamente en el cuádriceps, donde esta disminución fue significativa. El colágeno VI presente en el espacio intersticial se encontró disminuido en el ratón tratado con nintedanib, de forma significativa en cuádriceps y diafragma y con una tendencia en el tibial anterior, indicando una reducción del área del tejido fibroso. A nivel de expresión génica, numerosos genes de proteínas de la ECM (*Col1a1*, *Col3a1* y *Fn1*) y factores de crecimiento pro-fibróticos (*Pdgf*, *Tgfb1* y *Ctgf*), así como el gen *Adgre1*, marcador de macrófagos, se encuentran sobre-regulados en los músculos del ratón *mdx*. El tratamiento con nintedanib provocó una disminución de la expresión de la mayoría de estos genes -de una forma más contundente y estadísticamente significativa en el tibial anterior- excepto de *Ctgf* en los tres músculos y de *Fn1* en cuádriceps y diafragma. Cabe destacar que en todos los casos nintedanib causó una disminución de *Pdgfa* y *Pdgfb* estadísticamente significativa y que *Col1a1* fue marcadamente reducido de forma significativa en el tibial anterior y con una $p < 0.1$ en el caso del cuádriceps. La disminución en la expresión génica de colágeno I fue confirmada

a nivel proteico por WB. Los tres músculos de estudio mostraron un aumento visible del colágeno I en el ratón *mdx*, mientras que en el ratón tratado se observó una disminución significativa en el tibial anterior y una tendencia en el diafragma. También se estudió la fibrosis en el corazón mediante el análisis del mRNA de los genes mencionados anteriormente y estudios de inmunohistoquímica del colágeno III y VI. En la inmunohistoquímica los niveles de colágeno III y colágeno VI disminuyeron levemente en el ratón *mdx* tratado con nintedanib pero sin cambios significativos, sin embargo, en los estudios de expresión génica, el colágeno III, junto al gen *Adgre1*, se encontró disminuido patentemente de forma significativa en dicha población en comparación al corazón del ratón *mdx*.

6. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN

En esta tesis hemos analizado el papel de las moléculas PDGF en el proceso de regeneración y degeneración muscular en diversos modelos *in vitro* e *in vivo* de distrofia muscular. Con anterioridad a nuestros estudios, otros trabajos ya habían relacionado PDGF-BB y el receptor PDGF β tanto con el proceso de miogénesis como con el proceso de fibrosis en distrofias musculares¹⁵² y en otras enfermedades de otros órganos¹⁴⁷. En el presente estudio se realizó por primera vez una evaluación de la expresión de PDGF-B en miotubos humanos control y ensayos del tipo daño-reparación *in vitro* en miotubos de pacientes y de personas sanas e *in vivo* en ratones *mdx* y WT. Otra innovación que aporta este estudio es el tratamiento con PDGF-BB en el modelo murino *mdx*, así como en mioblastos obtenidos de pacientes control - a diferencia de investigaciones anteriores, basadas en la utilización de mioblastos de rata o ratón^{153, 276} - de forma que con este estudio obtenemos un mejor conocimiento del papel de PDGF-BB en el músculo humano.

Nuestros resultados sostienen que PDGF-BB promueve la proliferación y migración de mioblastos humanos aunque no la diferenciación a miotubo. Basamos esta conclusión tanto en los resultados *in vitro* como en los resultados *in vivo* en ratón, donde la administración de PDGF-BB causó un aumento de las células satélite, las células madre protagonistas de la regeneración muscular, precursoras de los mioblastos. El hecho de que PDGF-BB no aumente la diferenciación a miotubo – resultado también observado en otro estudio sobre mioblastos de rata¹⁵⁴ - no significa que éste no tenga un papel pro-regenerativo, ya que la proliferación y la migración de las SCs forman parte de las primeras fases de la regeneración muscular, antes de que se dé lugar la fusión de estas células con las fibras musculares dañadas o se diferencien a miocito. Además, el número de fibras regenerativas en el ratón *mdx* aumenta tras el tratamiento con PDGF-BB, por lo que es posible que PDGF-BB al aumentar el número de SCs tenga una influencia positiva en el proceso de regeneración muscular.

En resumen, y en concordancia con los resultados obtenidos, en la DMD, PDGF-BB sería liberado por las fibras regenerativas, necróticas e infiltrados inflamatorios en el inicio de la fase de la regeneración al coincidir su pico de máxima expresión con la aparición de los infiltrados inflamatorios. PDGF-BB actuaría de forma paracrina sobre las células satélite provocando su proliferación y migración, lo que llevaría a una regeneración muscular más efectiva.

Respecto a la evaluación de un inhibidor tirosina cinasa como agente anti-fibrótico en un modelo murino de distrofia muscular, este estudio representa el primer estudio del agente anti-fibrótico aprobado para la IPF, nintedanib, en un modelo animal de distrofia muscular. El proceso de fibrosis suele ser similar entre diferentes órganos, y tal como esperábamos, el tratamiento del ratón *mdx* con nintedanib mostró una disminución de la fibrosis y una mejora en los patrones electrofisiológicos. Sin embargo, la prueba del DigiGate no fue informativa al no encontrar diferencias en el patrón de la marcha entre el ratón *mdx* y WT. Estos efectos en la electrofisiología podrían ser explicados por una reducción de la proliferación, migración y cambio del patrón de la expresión génica en los fibroblastos residentes del músculo esquelético, que llevarían a cambios tempranos en la estructura del músculo antes de que se observen los síntomas clínicos e incluso antes de que se observe un alto grado de fibrosis en los estudios histológicos.

Otros inhibidores tirosina cinasa, tal como imatinib¹⁶¹, crenolanib¹⁵⁶ y nilotinib⁵⁶ bloquean varias proteínas con actividad tirosina cinasa, entre ellas los receptores PDGFs, pero ninguno de ellos bloquea FGFR o VEGFR. Estas drogas han mostrado ser eficaces en reducir la fibrosis y en mejorar la función muscular en el modelo *mdx*, sin embargo, ninguno de ellos ha sido probado para una enfermedad fibrótica en humanos, a excepción de imatinib que fue testado en pacientes con IPF sin obtener los resultados esperados en un ensayo clínico en fase II²⁷⁷. Además, los efectos secundarios de estas moléculas en humanos como tratamiento contra distintos tipos de cáncer son mayores respecto a los

efectos secundarios de nintedanib tanto en su aplicación contra el cáncer de pulmón como en el tratamiento contra la IPF, según los datos recogidos por la EMA, a excepción de crenolanib que, aunque todavía está bajo diferentes estudios clínicos, parece ser bien tolerado.

El mecanismo por el cual nintedanib reduce la fibrosis no es completamente conocido, ya que cualquiera de los tres receptores que bloquea podría estar involucrado. Nuestros resultados muestran que PDGF-AA es el responsable de la proliferación *in vitro* y tiene un mayor peso en la migración, además de todos los estudios citados previamente en la introducción que indican que una sobreexpresión de PDGF-A o del receptor PDGF tipo α está relacionada directamente con la fibrosis muscular y de otros tejidos. Sin embargo, los cambios en la expresión de genes pro-fibróticos en nuestro estudio *in vitro* en fibroblastos no fueron evaluados en presencia de PDGF-AA específicamente, por lo tanto, estos cambios *in vitro* e *in vivo* podrían ser debido a la inhibición de los otros receptores que bloquean nintedanib, como por ejemplo los receptores FGF, que también están asociados al proceso de fibrosis muscular. Además, FGFb regula la expresión positivamente de PDGFR α en VSMCs¹²⁵, un indicativo de que podría ocurrir tal evento en fibroblastos. La inhibición de los receptores FGF, por lo tanto, sería doblemente ventajosa para el tratamiento contra la fibrosis.

Src (*Stored Response Chain*) es una proteína tirosina cinasa citosólica que también es inhibida por nintedanib y que participa en la señalización de PDGF y TGF β (mediante el receptor TGF β tipo II (T β RII)) actuando como efector. Respecto a la señalización de TGF β , la activación de esta vía está asociada a la activación del T β RII y a la posterior activación de las proteínas cinasas activadas por mitógeno p38 (p38 MAPK)²³⁹, las cuales regulan la biosíntesis de citocinas pro-inflamatorias y también están involucradas en la supervivencia, proliferación, migración y diferenciación en distintos tipos celulares²⁷². En un estudio en IPF, se estudió la influencia de nintedanib en la señalización de TGF β en

fibroblastos de pulmón y como resultado se obtuvo que nintedanib inhibió la diferenciación de fibroblastos inducida por TGF β , a nivel molecular inhibió la fosforilación de T β RII y, en consecuencia, de p38 MAK²⁷³. La vía Src es alternativa a la vía clásica que involucra la activación de Smad en la señalización de TGF β , por lo que esto podría explicar los mínimos efectos secundarios de nintedanib en comparación a los inhibidores de los receptores de TGF β , que podrían asociarse a un aumento de los infiltrados inflamatorios, según un estudio de 2006²⁷⁴.

El bloqueo de una o varias de estas tirosinas cinasas, provoca una disminución de la expresión de diferentes genes en nuestro estudio, entre los que se encuentra TGF β . Es sabido que TGF β regula la expresión positivamente de PDGFR α en fibroblastos de diferente origen²⁷⁵, por lo que este acontecimiento (la disminución de TGF β por nintedanib) tendría un efecto sinérgico, además del beneficio de disminuir uno de los principales factores de crecimiento en inducir fibrosis.

El receptor VEGF1, el cual es activado por VEGF-A y VEGF-B, está altamente expresado en macrófagos, además de en células endoteliales, promoviendo la migración de estas células²⁷⁰, en el caso de los macrófagos, de los vasos sanguíneos al tejido conjuntivo del músculo. Esto podría explicar la disminución del marcador de macrófagos F4/80 (gen *Adgre1* en ratón) en nuestros resultados y, en consecuencia, la disminución de la inflamación, lo cual a su vez favorece la disminución de la fibrosis. Además, los PDGFRs también se expresan en macrófagos (ver sección 1.3.), y su inhibición también podría explicar la disminución de la migración de macrófagos hacia el músculo. Otro factor en este sentido, puede ser una mejor homeostasis del músculo con el tratamiento: nintedanib reduce el proceso fibrótico, por lo que el proceso de regeneración muscular puede ser más efectivo mejorando la situación estructural del músculo, lo que lleva a una menor inflamación.

Cabe mencionar también que en nuestro estudio la proteína de la ECM fibronectina no se ve disminuida en dos de los músculos de estudio. Teniendo en cuenta que el colágeno es la proteína más representativa de la ECM en las tres capas de tejido conjuntivo³, la observación de que el colágeno I, uno de los principales subtipos de colágeno expresado en la ECM, se encuentra disminuido en el músculo tratado del *mdx* tanto a nivel proteico como a nivel de mRNA es un resultado positivo.

En resumen, las vías PDGF-AA/PDGFR α y PDGF-BB/PDGFR β actuarían sobre células mesenquimales -predominantemente fibroblastos y mioblastos/SCs del músculo esquelético, respectivamente- influyendo en su proliferación, migración y/o diferenciación y participando de esta forma en diferentes procesos como son la fibrosis y regeneración muscular en DMD y en otras condiciones patológicas. Nintedanib también bloquea el receptor PDGF β y podría provocar la inhibición de la proliferación de las SCs observada en nuestro estudio, pero es conocido que otras moléculas, como IL-6, IL-1, IGF y HGF, cuyos receptores no son diana de nintedanib, contribuyen a la proliferación de estas células y, por lo tanto, nintedanib no alteraría la proliferación de las SCs y la consiguiente regeneración muscular¹².

A pesar del efecto positivo en la reducción de la expresión de algunos genes pro-fibróticos tras el tratamiento con nintedanib *in vivo*, estos resultados deben tomarse con cautela ya que se aprecia sólo un porcentaje de reducción del colágeno del 4-5% a nivel proteico. Existen diversas explicaciones para este resultado. Por un lado, puede ser debido a que la fibrosis ya está establecida (sobre todo en diafragma) y, por otro, a que el tiempo de tratamiento ha sido demasiado corto. Por este motivo sería interesante en un futuro: 1) tratar animales más jóvenes que aún no hayan desarrollado fibrosis o que tengan poca fibrosis, 2) realizar un tratamiento más prolongado, donde el momento final de tratamiento sobrepase el inicio de la aparición de la fibrosis en ratones controles *mdx* no tratados para asegurar que la fibrosis debería estar ya establecida y 3) tratar una población de ratones

mayor para obtener un mayor poder estadístico. Si estos resultados fueran más contundentes en cuanto al porcentaje de reducción de fibrosis que correlacione con pruebas funcionales, entonces se podría plantear probar nintedanib en niños con DMD en fases iniciales de la enfermedad en un ensayo clínico. Creemos que, en todo caso, nintedanib debería servir como co-tratamiento junto a la terapia génica o terapia celular (con el fin de restaurar la distrofina), ya que es conocido que la fibrosis reduce la eficacia de estos tratamientos, actuando de barrera para las partículas víricas o células. Por lo tanto, tratar la fibrosis podría mejorar la efectividad de los tratamientos que como objetivo tienen restaurar de la distrofina. En los últimos tiempos diversos estudios pre-clínicos se mueven en esta línea: terapia génica/celular combinada con un tratamiento contra alguno de los eventos patológicos causados por la ausencia de distrofina con resultados favorables²⁷⁶. Otro potencial rol de nintedanib como tratamiento de la enfermedad de Duchenne puede ser el de preservar al máximo la estructura muscular, una vez el paciente ha sido tratado con terapia génica. Los primeros resultados obtenidos con terapia génica han mostrado que hasta el 80% de las fibras expresan distrofina (Comunicación Dr. Mendel, WMS 2018). Si bien este es un resultado excelente, implica que un 20% de las fibras no expresan distrofina y son susceptibles de degenerar, por lo que la distrofia muscular como tal no está curada. Tratamientos como nintedanib puede tener un papel en mantener el músculo en las mejores condiciones, incluso en estos pacientes. Además, pacientes con otro tipo de distrofia muscular también se podrían beneficiar de los efectos de nintedanib ya que el mecanismo de fibrosis producido en diferentes distrofias musculares debe ser muy similar. Para ello también se podrían realizar previamente ensayos pre-clínicos en el modelo animal adecuado.

En el caso de la fibrosis cardíaca observamos cambios significativos en la reducción de expresión génica del colágeno III y del receptor F4/80 presente en los macrófagos. Sin embargo, no se observó una disminución significativa de la fibrosis en los estudios histológicos, aunque sí hay una tendencia a la reducción tanto del colágeno VI como del

III, en un porcentaje similar al observado en el músculo esquelético. Una vez más, se debería aumentar el número de animales y tratarlos antes y durante más tiempo ya que, diferentes estudios señalan que la fibrosis en el corazón *mdx* se establece hacia los 6 meses de edad¹⁶⁶. Serían necesarios ensayos funcionales para estudiar más a fondo la respuesta del corazón a nintedanib. Como dato, este fármaco se probó en un estudio en un modelo murino de hipertensión pulmonar, que lleva a la hipertrofia del ventrículo derecho del corazón asociada a fibrosis de la pared miocárdica. El estudio no demostró un efecto beneficioso sobre la hipertensión pulmonar, pero sí tuvo efectos favorables en la remodelación del ventrículo derecho²⁷⁷.

7. CONCLUSIONES

- PDGF-BB contribuye de forma positiva en el proceso de regeneración muscular al observarse un incremento de su expresión *in vitro* e *in vivo*: en miotubos humanos, biopsias de pacientes Duchenne, así como en un modelo murino de daño agudo. Además, el tratamiento con PDGF-BB en mioblastos y en el modelo murino de distrofia muscular, el ratón *mdx*, genera un aumento de la proliferación y migración de mioblastos y del número de las principales células encargadas de la regeneración muscular, las células satélite.

- Nintedanib ralentiza la progresión de la fibrosis en diferentes músculos del ratón *mdx* al disminuir la proliferación, la migración de fibroblastos y la expresión de genes profibróticos mediante el bloqueo, principalmente, del receptor PDGF α . Además, nintedanib reduce los infiltrados inflamatorios presentes en los músculos distróficos.

8. LÍNEAS DE FUTURO

Los resultados de la tesis representan el inicio de varias vías de trabajo que están en marcha en el laboratorio de Enfermedades Neuromusculares del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau:

1. Por un lado, el estudio de las vías de señalización y mecanismos moleculares de los factores de crecimiento de la familia PDGF, con aproximaciones *in vitro* que incluyen técnicas de cultivo celular y proteómica.
2. Aislamiento de precursores fibroadipogénicos (FAPs) desde biopsias de músculo de controles sanos y de pacientes con distrofias musculares para caracterizar su función biológica y estudiar el potencial adipogénico *in vitro*.
3. En vista de los resultados obtenidos sobre la fibrosis muscular en el modelo murino de DMD utilizando el fármaco nintedanib, se están tratando otros modelos murinos de distrofias musculares que cursan con fibrosis, como son el modelo de déficit de la proteína α -sarcoglicano y el modelo de déficit de la proteína disferlina. De obtener resultados positivos en la línea de los que se presentan en esta tesis, se podría plantear en un futuro el diseño de ensayos clínicos en pacientes con distrofias musculares, ya que nintedanib ya está aprobado en la IPF, y por la tanto ya ha pasado los requerimientos de seguridad para su utilización en humanos.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Hughes JT. Pathology of muscle. London: W.B. Saunders Co; 1974.
2. Mukund K, Subramaniam S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2019:e1462.
3. Mahdy MAA. Skeletal muscle fibrosis: an overview. *Cell Tissue Res*. 2019;375(3):575-88.
4. Engel AG, Franzini-Armstrong C. Myology. 3rd ed: McGraw-Hill; 2003.
5. Sierra JL, Alvarado H, Boshell J. Enfermedades musculares: aspectos histopatológicos y histoquímicos. *Acta Médica Colombiana* 1980;5(2):285-303.
6. Capitanio D, Moriggi M, Gelfi C. Mapping the human skeletal muscle proteome: progress and potential. *Expert Rev Proteomics*. 2017;14(9):825-39.
7. Tortora GJ, Derrickson B. Principles of Anatomy and Physiology 14th ed: John Wiley & Sons; 2016.
8. Lieber RL. Skeletal muscle structure, function, and plasticity. 2nd ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
9. Dunn A, Marcinczyk M, Talovic M, et al. Role of Stem Cells and Extracellular Matrix in the Regeneration of Skeletal Muscle: In book: Muscle Cell and Tissue - Current Status of Research Field 2018.
10. Grzelkowska-Kowalczyk K. The importance of extracellular matrix in skeletal muscle development and function. : IntechOpen; 2006 [updated 23 July 2019]. Available from: <https://www.intechopen.com/books/composition-and-function-of-the-extracellular-matrix-in-the-human-body/the-importance-of-extracellular-matrix-in-skeletal-muscle-development-and-function>.
11. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55(12):1531-46.

12. Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev.* 2013;93(1):23-67.
13. Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol.* 2015;44-46:247-54.
14. Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: still young and fascinating at 50. *J Histochem Cytochem.* 2011;59(12):1041-59.
15. Buckingham M. Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev.* 2006;16(5):525-32.
16. Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, et al. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest.* 2010;120(1):11-9.
17. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961;9:493-5.
18. Bischoff R. Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Dev Dyn.* 1997;208(4):505-15.
19. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288(2):R345-53.
20. Bersini S, Gilardi M, Mora M, et al. Tackling muscle fibrosis: From molecular mechanisms to next generation engineered models to predict drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018;129:64-77.
21. Arnold L, Henry A, Poron F, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med.* 2007;204(5):1057-69.

22. Chapman MA, Mukund K, Subramaniam S, et al. Three distinct cell populations express extracellular matrix proteins and increase in number during skeletal muscle fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017;312(2):C131-C43.
23. Osses N, Brandan E. ECM is required for skeletal muscle differentiation independently of muscle regulatory factor expression. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282(2):C383-94.
24. Mann CJ, Perdiguero E, Kharraz Y, et al. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skelet Muscle*. 2011;1(1):21.
25. Saclier M, Yacoub-Youssef H, Mackey AL, et al. Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. *Stem Cells*. 2013;31(2):384-96.
26. Joe AW, Yi L, Natarajan A, et al. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol*. 2010;12(2):153-63.
27. Laumonier T, Menetrey J. Muscle injuries and strategies for improving their repair. *J Exp Orthop*. 2016;3(1):15.
28. Serrano AL, Mann CJ, Vidal B, et al. Cellular and molecular mechanisms regulating fibrosis in skeletal muscle repair and disease. *Curr Top Dev Biol*. 2011;96:167-201.
29. Yang W, Hu P. Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. *J Orthop Translat*. 2018;13:25-32.
30. Boland BJ, Silbert PL, Groover RV, et al. Skeletal, cardiac, and smooth muscle failure in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Neurol*. 1996;14(1):7-12.
31. Van Erp C, Irwin NG, Hoey AJ. Long-term administration of pirfenidone improves cardiac function in mdx mice. *Muscle Nerve*. 2006;34(3):327-34.

32. Malfatti E, Romero NB. Diseases of the skeletal muscle. *Handb Clin Neurol*. 2017;145:429-51.
33. Mercuri E, Muntoni F. Muscular dystrophies. *Lancet*. 2013;381(9869):845-60.
34. Dubowitz V, Sewry CA, Oldfors A. *Muscle Biopsy: A Practical Approach*. 4th ed: Saunders Elsevier; 2011.
35. Bradley D, Parsons E. Newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. . *Semin Neonatol* 1998;3:27-34.
36. Rowland LP, Layzer RB. X-linked muscular dystrophies. In: *Diseases of muscle, part I. Handbook of Clinical Neurology*. 1979. 349-414 p.
37. Worton R. Muscular dystrophies: diseases of the dystrophin-glycoprotein complex. *Science*. 1995;270(5237):755-6.
38. den Dunnen JT, Bakker E, Breteler EG, et al. Direct detection of more than 50% of the Duchenne muscular dystrophy mutations by field inversion gels. *Nature*. 1987;329(6140):640-2.
39. Love DR, Forrest SM, Smith TJ, et al. Molecular analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Br Med Bull*. 1989;45(3):659-80.
40. Nichols B, Takeda S, Yokota T. Nonmechanical Roles of Dystrophin and Associated Proteins in Exercise, Neuromuscular Junctions, and Brains. *Brain Sci*. 2015;5(3):275-98.
41. Chelly J, Hamard G, Koulakoff A, et al. Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells. *Nature*. 1990;344(6261):64-5.
42. Gao QQ, McNally EM. The Dystrophin Complex: Structure, Function, and Implications for Therapy. *Compr Physiol*. 2015;5(3):1223-39.

43. Ervasti JM. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772(2):108-17.
44. Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, et al. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(8):3710-4.
45. Lynch GS. Role of contraction-induced injury in the mechanisms of muscle damage in muscular dystrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004;31(8):557-61.
46. Robert V, Massimino ML, Tosello V, et al. Alteration in calcium handling at the subcellular level in mdx myotubes. *J Biol Chem*. 2001;276(7):4647-51.
47. Banks GB, Chamberlain JS. The value of mammalian models for duchenne muscular dystrophy in developing therapeutic strategies. *Curr Top Dev Biol*. 2008;84:431-53.
48. Suchyna TM, Sachs F. Mechanosensitive channel properties and membrane mechanics in mouse dystrophic myotubes. *J Physiol*. 2007;581(Pt 1):369-87.
49. Malik V, Rodino-Klapac LR, Mendell JR. Emerging drugs for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2012;17(2):261-77.
50. Spinazzola JM, Kunkel LM. Pharmacological therapeutics targeting the secondary defects and downstream pathology of Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2016;4(11):1179-94.
51. Serrano AL, Munoz-Canoves P. Fibrosis development in early-onset muscular dystrophies: Mechanisms and translational implications. *Semin Cell Dev Biol*. 2017;64:181-90.

52. Porter JD, Khanna S, Kaminski HJ, et al. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum Mol Genet.* 2002;11(3):263-72.
53. Morrison J, Lu QL, Pastoret C, et al. T-cell-dependent fibrosis in the mdx dystrophic mouse. *Lab Invest.* 2000;80(6):881-91.
54. Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004;84(1):209-38.
55. Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Tsuchida K. Roles of nonmyogenic mesenchymal progenitors in pathogenesis and regeneration of skeletal muscle. *Front Physiol.* 2014;5:68.
56. Klimczak A, Kozłowska U, Kurpisz M. Muscle Stem/Progenitor Cells and Mesenchymal Stem Cells of Bone Marrow Origin for Skeletal Muscle Regeneration in Muscular Dystrophies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2018;66(5):341-54.
57. Lemos DR, Babaeijandaghi F, Low M, et al. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat Med.* 2015;21(7):786-94.
58. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003;113(6):685-700.
59. Li Y, Foster W, Deasy BM, et al. Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am J Pathol.* 2004;164(3):1007-19.
60. Kharraz Y, Guerra J, Pessina P, et al. Understanding the process of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Biomed Res Int.* 2014;2014:965631.

61. Villalta SA, Nguyen HX, Deng B, et al. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2009;18(3):482-96.
62. Vidal B, Serrano AL, Tjwa M, et al. Fibrinogen drives dystrophic muscle fibrosis via a TGFbeta/alternative macrophage activation pathway. *Genes Dev.* 2008;22(13):1747-52.
63. Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, et al. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell.* 1993;4(6):637-45.
64. Leask A. Trial by CCN2: a standardized test for fibroproliferative disease? *J Cell Commun Signal.* 2009;3(1):87-8.
65. Gutpell KM, Hoffman LM. VEGF induces stress fiber formation in fibroblasts isolated from dystrophic muscle. *J Cell Commun Signal.* 2015;9(4):353-60.
66. Yu A, Matsuda Y, Takeda A, et al. Effect of EGF and bFGF on fibroblast proliferation and angiogenic cytokine production from cultured dermal substitutes. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2012;23(10):1315-24.
67. Chaudhary NI, Roth GJ, Hilberg F, et al. Inhibition of PDGF, VEGF and FGF signalling attenuates fibrosis. *Eur Respir J.* 2007;29(5):976-85.
68. Martínez C, Villa Asensi JR, Luna Paredes MC, et al. Enfermedad neuromuscular: evaluación clínica y seguimiento desde el punto de vista neumológico. . *An Pediatr* 2014;81(4):258.e1-.e17.
69. Tangsrud S, Petersen IL, Lodrup Carlsen KC, et al. Lung function in children with Duchenne's muscular dystrophy. *Respir Med.* 2001;95(11):898-903.

70. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2006;113(14):1807-16.
71. Nigro G, Comi LI, Politano L, et al. The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Int J Cardiol*. 1990;26(3):271-7.
72. Farah MG, Evans EB, Vignos PJ, Jr. Echocardiographic evaluation of left ventricular function in Duchenne's muscular dystrophy. *Am J Med*. 1980;69(2):248-54.
73. van Westering TL, Betts CA, Wood MJ. Current understanding of molecular pathology and treatment of cardiomyopathy in duchenne muscular dystrophy. *Molecules*. 2015;20(5):8823-55.
74. D'Orsogna L, O'Shea JP, Miller G. Cardiomyopathy of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Cardiol*. 1988;9(4):205-13.
75. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol*. 2010;9(1):77-93.
76. Flanigan KM, von Niederhausern A, Dunn DM, et al. Rapid direct sequence analysis of the dystrophin gene. *Am J Hum Genet*. 2003;72(4):931-9.
77. Nicholson LV, Johnson MA, Bushby KM, et al. Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. Part 3. Differential diagnosis and prognosis. *J Med Genet*. 1993;30(9):745-51.

78. Mendell JR, Moxley RT, Griggs RC, et al. Randomized, double-blind six-month trial of prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *N Engl J Med* 1989;320(24):1592-7.
79. Biggar WD, Harris VA, Eliasoph L, et al. Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade. *Neuromuscul Disord*. 2006;16(4):249-55.
80. King WM, Ruttencutter R, Nagaraja HN, et al. Orthopedic outcomes of long-term daily corticosteroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*. 2007;68(19):1607-13.
81. Balk SD, Whitfield JF, Youdale T, et al. Roles of calcium, serum, plasma, and folic acid in the control of proliferation of normal and Rous sarcoma virus-infected chicken fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973;70(3):675-9.
82. American Academy of Pediatrics Section on Cardiology and Cardiac Surgery. Cardiovascular health supervision for individuals affected by Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Pediatrics*. 2005;116(6):1569-73.
83. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurol*. 2010;9(2):177-89.
84. Coote DJ, Davis MR, Cabrera M, et al. CUGC for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Eur J Hum Genet*. 2018;26(5):749-57.
85. Kohler N, Lipton A. Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Exp Cell Res*. 1974;87(2):297-301.
86. Ross R, Glomset J, Kariya B, et al. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974;71(4):1207-10.

87. Westermark B, Wasteson A. A platelet factor stimulating human normal glial cells. *Exp Cell Res.* 1976;98(1):170-4.
88. Kaplan DR, Chao FC, Stiles CD, et al. Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts. *Blood.* 1979;53(6):1043-52.
89. Bergsten E, Uutela M, Li X, et al. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat Cell Biol.* 2001;3(5):512-6.
90. Li X, Ponten A, Aase K, et al. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat Cell Biol.* 2000;2(5):302-9.
91. Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(4):197-204.
92. Antoniades HN, Scher CD, Stiles CD. Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(4):1809-13.
93. Junqueira de Azevedo IL, Farsky SH, Oliveira ML, et al. Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the Bothrops insularis pit viper. A new member of the VEGF family of proteins. *J Biol Chem.* 2001;276(43):39836-42.
94. Lewandowski SA, Fredriksson L, Lawrence DA, et al. Pharmacological targeting of the PDGF-CC signaling pathway for blood-brain barrier restoration in neurological disorders. *Pharmacol Ther.* 2016;167:108-19.
95. Hoch RV, Soriano P. Roles of PDGF in animal development. *Development.* 2003;130(20):4769-84.
96. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 2008;22(10):1276-312.

97. Somasundaram R, Schuppan D. Type I, II, III, IV, V, and VI collagens serve as extracellular ligands for the isoforms of platelet-derived growth factor (AA, BB, and AB). *J Biol Chem*. 1996;271(43):26884-91.
98. Hogg PJ, Hotchkiss KA, Jimenez BM, et al. Interaction of platelet-derived growth factor with thrombospondin 1. *Biochem J*. 1997;326 (Pt 3):709-16.
99. Raines EW, Lane TF, Iruela-Arispe ML, et al. The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(4):1281-5.
100. Lustig F, Hoebeke J, Ostergren-Lunden G, et al. Alternative splicing determines the binding of platelet-derived growth factor (PDGF-AA) to glycosaminoglycans. *Biochemistry*. 1996;35(37):12077-85.
101. LaMarre J, Hayes MA, Wollenberg GK, et al. An alpha 2-macroglobulin receptor-dependent mechanism for the plasma clearance of transforming growth factor-beta 1 in mice. *J Clin Invest*. 1991;87(1):39-44.
102. Bonner JC, Osornio-Vargas AR. Differential binding and regulation of platelet-derived growth factor A and B chain isoforms by alpha 2-macroglobulin. *J Biol Chem*. 1995;270(27):16236-42.
103. Claesson-Welsh L, Eriksson A, Westermark B, et al. cDNA cloning and expression of the human A-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptor establishes structural similarity to the B-type PDGF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(13):4917-21.
104. Matsui T, Heidaran M, Miki T, et al. Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. *Science*. 1989;243(4892):800-4.

105. Yarden Y, Escobedo JA, Kuang WJ, et al. Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature*. 1986;323(6085):226-32.
106. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*. 1999;79(4):1283-316.
107. Kazlauskas A, Bowen-Pope D, Seifert R, et al. Different effects of homo- and heterodimers of platelet-derived growth factor A and B chains on human and mouse fibroblasts. *EMBO J*. 1988;7(12):3727-35.
108. Kazlauskas A. PDGFs and their receptors. *Gene*. 2017;614:1-7.
109. Pennock S, Haddock LJ, Elliott D, et al. Is neutralizing vitreal growth factors a viable strategy to prevent proliferative vitreoretinopathy? *Prog Retin Eye Res*. 2014;40:16-34.
110. Lei H, Kazlauskas A. A reactive oxygen species-mediated, self-perpetuating loop persistently activates platelet-derived growth factor receptor alpha. *Mol Cell Biol*. 2014;34(1):110-22.
111. Lei H, Qian CX, Lei J, et al. RasGAP Promotes Autophagy and Thereby Suppresses Platelet-Derived Growth Factor Receptor-Mediated Signaling Events, Cellular Responses, and Pathology. *Mol Cell Biol*. 2015;35(10):1673-85.
112. Lei H, Velez G, Kazlauskas A. Pathological signaling via platelet-derived growth factor receptor {alpha} involves chronic activation of Akt and suppression of p53. *Mol Cell Biol*. 2011;31(9):1788-99.
113. Pennock S, Kazlauskas A. Vascular endothelial growth factor A competitively inhibits platelet-derived growth factor (PDGF)-dependent activation of PDGF receptor and subsequent signaling events and cellular responses. *Mol Cell Biol*. 2012;32(10):1955-66.

114. LaRoche WJ, Jeffers M, McDonald WF, et al. PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nat Cell Biol.* 2001;3(5):517-21.
115. Karlsson L, Bondjers C, Betsholtz C. Roles for PDGF-A and sonic hedgehog in development of mesenchymal components of the hair follicle. *Development.* 1999;126(12):2611-21.
116. Lindahl P, Karlsson L, Hellstrom M, et al. Alveogenesis failure in PDGF-A-deficient mice is coupled to lack of distal spreading of alveolar smooth muscle cell progenitors during lung development. *Development.* 1997;124(20):3943-53.
117. Orr-Urtreger A, Lonai P. Platelet-derived growth factor-A and its receptor are expressed in separate, but adjacent cell layers of the mouse embryo. *Development.* 1992;115(4):1045-58.
118. Karlsson L, Lindahl P, Heath JK, et al. Abnormal gastrointestinal development in PDGF-A and PDGFR-(alpha) deficient mice implicates a novel mesenchymal structure with putative instructive properties in villus morphogenesis. *Development.* 2000;127(16):3457-66.
119. Stroobant P, Waterfield MD. Purification and properties of porcine platelet-derived growth factor. *EMBO J.* 1984;3(12):2963-7.
120. Ekman S, Thuresson ER, Heldin CH, et al. Increased mitogenicity of an alphabeta heterodimeric PDGF receptor complex correlates with lack of RasGAP binding. *Oncogene.* 1999;18(15):2481-8.
121. Kourembanas S, Morita T, Liu Y, et al. Mechanisms by which oxygen regulates gene expression and cell-cell interaction in the vasculature. *Kidney Int.* 1997;51(2):438-43.
122. Daniel TO, Gibbs VC, Milfay DF, et al. Thrombin stimulates c-sis gene expression in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1986;261(21):9579-82.

123. Betsholtz C. The PDGF Genes and Their Regulation, edited by Westermark B and Sorg C. *Basel: Karger* 1993;5:11-30.
124. Rubin K, Tingstrom A, Hansson GK, et al. Induction of B-type receptors for platelet-derived growth factor in vascular inflammation: possible implications for development of vascular proliferative lesions. *Lancet*. 1988;1(8599):1353-6.
125. Terracio L, Ronnstrand L, Tingstrom A, et al. Induction of platelet-derived growth factor receptor expression in smooth muscle cells and fibroblasts upon tissue culturing. *J Cell Biol*. 1988;107(5):1947-57.
126. Schollmann C, Grugel R, Tatje D, et al. Basic fibroblast growth factor modulates the mitogenic potency of the platelet-derived growth factor (PDGF) isoforms by specific upregulation of the PDGF alpha receptor in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1992;267(25):18032-9.
127. Coin PG, Lindroos PM, Bird GS, et al. Lipopolysaccharide up-regulates platelet-derived growth factor (PDGF) alpha-receptor expression in rat lung myofibroblasts and enhances response to all PDGF isoforms. *J Immunol*. 1996;156(12):4797-806.
128. Centrella M, McCarthy TL, Kusmik WF, et al. Isoform-specific regulation of platelet-derived growth factor activity and binding in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *J Clin Invest*. 1992;89(4):1076-84.
129. Tsukamoto T, Matsui T, Nakata H, et al. Interleukin-1 enhances the response of osteoblasts to platelet-derived growth factor through the alpha receptor-specific up-regulation. *J Biol Chem*. 1991;266(16):10143-7.
130. Demoulin JB, Essaghir A. PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25(3):273-83.
131. Vanhaesebroeck B, Leervers SJ, Panayotou G, et al. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci*. 1997;22(7):267-72.

132. Dudek H, Datta SR, Franke TF, et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*. 1997;275(5300):661-5.
133. Kundra V, Escobedo JA, Kazlauskas A, et al. Regulation of chemotaxis by the platelet-derived growth factor receptor-beta. *Nature*. 1994;367(6462):474-6.
134. Patel BK, Wang LM, Lee CC, et al. Stat6 and Jak1 are common elements in platelet-derived growth factor and interleukin-4 signal transduction pathways in NIH 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*. 1996;271(36):22175-82.
135. Eriksson A, Siegbahn A, Westermark B, et al. PDGF alpha- and beta-receptors activate unique and common signal transduction pathways. *EMBO J*. 1992;11(2):543-50.
136. Yao R, Cooper GM. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science*. 1995;267(5206):2003-6.
137. Hossain MZ, Ao P, Boynton AL. Rapid disruption of gap junctional communication and phosphorylation of connexin43 by platelet-derived growth factor in T51B rat liver epithelial cells expressing platelet-derived growth factor receptor. *J Cell Physiol*. 1998;174(1):66-77.
138. Fambrough D, McClure K, Kazlauskas A, et al. Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes. *Cell*. 1999;97(6):727-41.
139. Lubinus M, Meier KE, Smith EA, et al. Independent effects of platelet-derived growth factor isoforms on mitogen-activated protein kinase activation and mitogenesis in human dermal fibroblasts. *J Biol Chem*. 1994;269(13):9822-5.
140. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*. 1995;268(5208):233-9.

141. Sorkin A, Westermark B, Heldin CH, et al. Effect of receptor kinase inactivation on the rate of internalization and degradation of PDGF and the PDGF beta-receptor. *J Cell Biol.* 1991;112(3):469-78.
142. Mori S, Heldin CH, Claesson-Welsh L. Ligand-induced ubiquitination of the platelet-derived growth factor beta-receptor plays a negative regulatory role in its mitogenic signaling. *J Biol Chem.* 1993;268(1):577-83.
143. Pluskey S, Wandless TJ, Walsh CT, et al. Potent stimulation of SH-PTP2 phosphatase activity by simultaneous occupancy of both SH2 domains. *J Biol Chem.* 1995;270(7):2897-900.
144. Donovan J, Abraham D, Norman J. Platelet-derived growth factor signaling in mesenchymal cells. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2013;18:106-19.
145. Mendoza AE, Young R, Orkin SH, et al. Increased platelet-derived growth factor A-chain expression in human uterine smooth muscle cells during the physiologic hypertrophy of pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(6):2177-81.
146. Hellstrom M, Kalen M, Lindahl P, et al. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development.* 1999;126(14):3047-55.
147. Ding H, Wu X, Kim I, et al. The mouse *Pdgfc* gene: dynamic expression in embryonic tissues during organogenesis. *Mech Dev.* 2000;96(2):209-13.
148. Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(4):255-73.
149. Ramos C, Becerril C, Cisneros JG. El miofibroblasto, una célula multifuncional en la patología pulmonar. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2004;17(3):215-31.

150. Bonner JC, Brody AR. Cytokine-binding proteins in the lung. *Am J Physiol.* 1995;268(6 Pt 1):L869-78.
151. Klinkhammer BM, Floege J, Boor P. PDGF in organ fibrosis. *Mol Aspects Med.* 2018;62:44-62.
152. Del Valle ME, Maestro A, García-Suárez O. Distribution of the platelet-derived growth factor receptors (PDGFR α y PDGFR β) in the muscle-skeletal system. . *Patología del Aparato Locomotor* 2006;4(1):3-11.
153. Zhao Y, Haginoya K, Sun G, et al. Platelet-derived growth factor and its receptors are related to the progression of human muscular dystrophy: an immunohistochemical study. *J Pathol.* 2003;201(1):149-59.
154. Yablonka-Reuveni Z, Balestreri TM, Bowen-Pope DF. Regulation of proliferation and differentiation of myoblasts derived from adult mouse skeletal muscle by specific isoforms of PDGF. *J Cell Biol.* 1990;111(4):1623-9.
155. Jin P, Rahm M, Claesson-Welsh L, et al. Expression of PDGF A-chain and beta-receptor genes during rat myoblast differentiation. *J Cell Biol.* 1990;110(5):1665-72.
156. Armulik A, Genove G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell.* 2011;21(2):193-215.
157. Ieronimakis N, Hays A, Prasad A, et al. PDGFRalpha signalling promotes fibrogenic responses in collagen-producing cells in Duchenne muscular dystrophy. *J Pathol.* 2016;240(4):410-24.
158. Olson LE, Soriano P. Increased PDGFRalpha activation disrupts connective tissue development and drives systemic fibrosis. *Dev Cell.* 2009;16(2):303-13.
159. Ryder-Cook AS, Sicinski P, Thomas K, et al. Localization of the mdx mutation within the mouse dystrophin gene. *EMBO J.* 1988;7(10):3017-21.

160. Brinkmeyer-Langford C, Chu C, Balog-Alvarez C, et al. Expression profiling of disease progression in canine model of Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One*. 2018;13(3):e0194485.
161. Bulfield G, Siller WG, Wight PA, et al. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(4):1189-92.
162. Huang P, Zhao XS, Fields M, et al. Imatinib attenuates skeletal muscle dystrophy in mdx mice. *FASEB J*. 2009;23(8):2539-48.
163. Pessina P, Cabrera D, Morales MG, et al. Novel and optimized strategies for inducing fibrosis in vivo: focus on Duchenne Muscular Dystrophy. *Skelet Muscle*. 2014;4:7.
164. Bostick B, Yue Y, Long C, et al. Prevention of dystrophin-deficient cardiomyopathy in twenty-one-month-old carrier mice by mosaic dystrophin expression or complementary dystrophin/utrophin expression. *Circ Res*. 2008;102(1):121-30.
165. Bell CD, Conen PE. Histopathological changes in Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci*. 1968;7(3):529-44.
166. Verhaart IE, van Duijn RJ, den Adel B, et al. Assessment of cardiac function in three mouse dystrophinopathies by magnetic resonance imaging. *Neuromuscul Disord*. 2012;22(5):418-26.
167. Boldrin L, Zammit PS, Morgan JE. Satellite cells from dystrophic muscle retain regenerative capacity. *Stem Cell Res*. 2015;14(1):20-9.
168. Deconinck AE, Potter AC, Tinsley JM, et al. Postsynaptic abnormalities at the neuromuscular junctions of utrophin-deficient mice. *J Cell Biol*. 1997;136(4):883-94.

169. Grady RM, Teng H, Nichol MC, et al. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*. 1997;90(4):729-38.
170. Love DR, Hill DF, Dickson G, et al. An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature*. 1989;339(6219):55-8.
171. Xiao X, Li J, Samulski RJ. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol*. 1996;70(11):8098-108.
172. Hotta A. Genome Editing Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *J Neuromuscul Dis*. 2015;2(4):343-55.
173. Chamberlain JS. Gene therapy of muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2002;11(20):2355-62.
174. Judge LM, Arnett AL, Banks GB, et al. Expression of the dystrophin isoform Dp116 preserves functional muscle mass and extends lifespan without preventing dystrophy in severely dystrophic mice. *Hum Mol Genet*. 2011;20(24):4978-90.
175. McGreevy JW, Hakim CH, McIntosh MA, et al. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis Model Mech*. 2015;8(3):195-213.
176. van Putten M, Hulsker M, Young C, et al. Low dystrophin levels increase survival and improve muscle pathology and function in dystrophin/utrophin double-knockout mice. *FASEB J*. 2013;27(6):2484-95.
177. Wang Z, Kuhr CS, Allen JM, et al. Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression. *Mol Ther*. 2007;15(6):1160-6.

178. Mendell JR, Campbell K, Rodino-Klapac L, et al. Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med.* 2010;363(15):1429-37.
179. Koo T, Popplewell L, Athanasopoulos T, et al. Triple trans-splicing adeno-associated virus vectors capable of transferring the coding sequence for full-length dystrophin protein into dystrophic mice. *Hum Gene Ther.* 2014;25(2):98-108.
180. Gregorevic P, Blankinship MJ, Allen JM, et al. Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat Med.* 2004;10(8):828-34.
181. Koo T, Okada T, Athanasopoulos T, et al. Long-term functional adeno-associated virus-microdystrophin expression in the dystrophic CXMDj dog. *J Gene Med.* 2011;13(9):497-506.
182. Duan D. Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther.* 2018;26(10):2337-56.
183. Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013;339(6121):819-23.
184. Cai A, Kong X. Development of CRISPR-Mediated Systems in the Study of Duchenne Muscular Dystrophy. *Hum Gene Ther Methods.* 2019;30(3):71-80.
185. Long C, Amoasii L, Mireault AA, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science.* 2016;351(6271):400-3.
186. Yin H, Moulton HM, Betts C, et al. Functional rescue of dystrophin-deficient mdx mice by a chimeric peptide-PMO. *Mol Ther.* 2010;18(10):1822-9.
187. Mendell JR, Rodino-Klapac LR, Sahenk Z, et al. Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2013;74(5):637-47.

188. Lim KR, Maruyama R, Yokota T. Eteplirsén in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:533-45.
189. Yu X, Bao B, Echigoya Y, et al. Dystrophin-deficient large animal models: translational research and exon skipping. *Am J Transl Res.* 2015;7(8):1314-31.
190. Hodgkinson L. Biosimilar Medicines Group - 14th Annual Medicines for Europe Conference (April 28-29, 2016 - London, UK). *Drugs Today (Barc).* 2016;52(5):309-12.
191. Goyenvallé A, Griffith G, Babbs A, et al. Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nat Med.* 2015;21(3):270-5.
192. Wu B, Li Y, Morcos PA, et al. Octa-guanidine morpholino restores dystrophin expression in cardiac and skeletal muscles and ameliorates pathology in dystrophic mdx mice. *Mol Ther.* 2009;17(5):864-71.
193. Cirak S, Arechavala-Gomez V, Guglieri M, et al. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet.* 2011;378(9791):595-605.
194. Finkel RS, Flanigan KM, Wong B, et al. Phase 2a study of ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One.* 2013;8(12):e81302.
195. Haas M, Vlcek V, Balabanov P, et al. European Medicines Agency review of ataluren for the treatment of ambulant patients aged 5 years and older with Duchenne muscular dystrophy resulting from a nonsense mutation in the dystrophin gene. *Neuromuscul Disord.* 2015;25(1):5-13.

196. Seto JT, Bengtsson NE, Chamberlain JS. Therapy of Genetic Disorders-Novel Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy. *Curr Pediatr Rep.* 2014;2(2):102-12.
197. Partridge T. Disciplining the stem cell into myogenesis. *N Engl J Med.* 2006;354(17):1844-5.
198. Montarras D, Morgan J, Collins C, et al. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science.* 2005;309(5743):2064-7.
199. Morgan JE, Pagel CN, Sherratt T, et al. Long-term persistence and migration of myogenic cells injected into pre-irradiated muscles of mdx mice. *J Neurol Sci.* 1993;115(2):191-200.
200. Beauchamp JR, Morgan JE, Pagel CN, et al. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol.* 1999;144(6):1113-22.
201. Darabi R, Gehlbach K, Bachoo RM, et al. Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat Med.* 2008;14(2):134-43.
202. Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, et al. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science.* 2005;309(5732):314-7.
203. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998;279(5356):1528-30.
204. Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, et al. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(3):255-67.
205. Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature.* 2006;444(7119):574-9.

206. Cossu G, Previtali SC, Napolitano S, et al. Intra-arterial transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol Med*. 2015;7(12):1513-28.
207. Briggs D, Morgan JE. Recent progress in satellite cell/myoblast engraftment -- relevance for therapy. *FEBS J*. 2013;280(17):4281-93.
208. Blake DJ, Weir A, Newey SE, et al. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev*. 2002;82(2):291-329.
209. Ohlendieck K, Ervasti JM, Matsumura K, et al. Dystrophin-related protein is localized to neuromuscular junctions of adult skeletal muscle. *Neuron*. 1991;7(3):499-508.
210. Khurana TS, Watkins SC, Chafey P, et al. Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromuscul Disord*. 1991;1(3):185-94.
211. Kleopa KA, Drousiotou A, Mavrikiou E, et al. Naturally occurring utrophin correlates with disease severity in Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2006;15(10):1623-8.
212. Ebihara S, Guibinga GH, Gilbert R, et al. Differential effects of dystrophin and utrophin gene transfer in immunocompetent muscular dystrophy (mdx) mice. *Physiol Genomics*. 2000;3(3):133-44.
213. Miura P, Jasmin BJ. Utrophin upregulation for treating Duchenne or Becker muscular dystrophy: how close are we? *Trends Mol Med*. 2006;12(3):122-9.
214. Inacio P. Summit Therapeutics Ends Development of Ezutromid Therapy for DMD After Trial Failure. Philadelphia: Muscular dystrophy news today; 2018 [updated 23 july 2019]. Available from:

- <<https://musculardystrophynews.com/2018/06/29/summit-therapeutics-ends-ezutromid-development-trail-failure/>>
215. Heier CR, Damsker JM, Yu Q, et al. VBP15, a novel anti-inflammatory and membrane-stabilizer, improves muscular dystrophy without side effects. *EMBO Mol Med.* 2013;5(10):1569-85.
 216. Conklin LS, Damsker JM, Hoffman EP, et al. Phase IIa trial in Duchenne muscular dystrophy shows vamorolone is a first-in-class dissociative steroidal anti-inflammatory drug. *Pharmacol Res.* 2018;136:140-50.
 217. Hoffman EP, Riddle V, Siegler MA, et al. Phase 1 trial of vamorolone, a first-in-class steroid, shows improvements in side effects via biomarkers bridged to clinical outcomes. *Steroids.* 2018;134:43-52.
 218. Phillips MF, Quinlivan R. Antagonistas del calcio para la distrofia muscular de Duchenne. London (UK): Cochrane.org 2008 [updated 23 July 2019]. Available from: <https://www.cochrane.org/es/CD004571/antagonistas-del-calcio-para-la-distrofia-muscular-de-duchenne>.
 219. Porte-Thomé F. Rimeporide in Duchenne muscular dystrophy. Geneva: EspeRare Foundation; 2019 [updated 23 July 2019]. Available from: <https://esperare.org/en/rimeporide-duchenne-muscular-dystrophy>
 220. Weber MA, Nagel AM, Wolf MB, et al. Permanent muscular sodium overload and persistent muscle edema in Duchenne muscular dystrophy: a possible contributor of progressive muscle degeneration. *J Neurol.* 2012;259(11):2385-92.
 221. EspeRare Foundation. ClinicalTrials.gov [Internet]. National Library of Medicine (US); Bethesda (MD): 2018. Rimeporide in patients with Duchenne muscular dystrophy (RIM4DMD). Available from:

- <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02710591?term=rimeporide&rank=1> [Last accessed 23 July 2019]
222. Hauser E, Hoger H, Bittner R, et al. Oxyradical damage and mitochondrial enzyme activities in the mdx mouse. *Neuropediatrics*. 1995;26(5):260-2.
223. Buyse GM, Van der Mieren G, Erb M, et al. Long-term blinded placebo-controlled study of SNT-MC17/idebenone in the dystrophin deficient mdx mouse: cardiac protection and improved exercise performance. *Eur Heart J*. 2009;30(1):116-24.
224. Buyse GM, Goemans N, van den Hauwe M, et al. Idebenone as a novel, therapeutic approach for Duchenne muscular dystrophy: results from a 12 month, double-blind, randomized placebo-controlled trial. *Neuromuscul Disord*. 2011;21(6):396-405.
225. Santhera Pharmaceuticals. ClinicalTrials.gov [Internet]. National Library of Medicine (US); Bethesda (MD): 2018. Phase III study with idebenone in patients with Duchenne muscular dystrophy (SIDEROS-E) (SIDEROS-E). Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03603288> [Last accessed 23 July 2019]
226. Crone M, Mah JK. Current and Emerging Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy. *Curr Treat Options Neurol*. 2018;20(8):31.
227. University Hospital. ClinicalTrials.gov [Internet]. National Library of Medicine (US); Bethesda (MD): 2018. Improved muscle function in Duchenne muscular dystrophy trough L-Arginine and Metformin. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02516085> [Last accessed 23 July 2019]
228. University Hospital. ClinicalTrials.gov [Internet]. National Library of Medicine (US); Bethesda (MD): 2018. L-citrulline and metformin in Duchenne's muscular dystrophy. Available from:

- <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01995032?term=duchenne> [Last accessed 23 July 2019].
229. Donovan JM, Zimmer M, Offman E, et al. A Novel NF-kappaB Inhibitor, Edasalonexent (CAT-1004), in Development as a Disease-Modifying Treatment for Patients With Duchenne Muscular Dystrophy: Phase 1 Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics in Adult Subjects. *J Clin Pharmacol*. 2017;57(5):627-39.
230. Messina S, Bitto A, Aguenouz M, et al. Flavocoxid counteracts muscle necrosis and improves functional properties in mdx mice: a comparison study with methylprednisolone. *Exp Neurol*. 2009;220(2):349-58.
231. Manning J, O'Malley D. What has the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy contributed to our understanding of this disease? *J Muscle Res Cell Motil*. 2015;36(2):155-67.
232. Huebner KD, Jassal DS, Halevy O, et al. Functional resolution of fibrosis in mdx mouse dystrophic heart and skeletal muscle by halofuginone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294(4):H1550-61.
233. Akashi Therapeutics. ClinicalTrials.gov [Internet]. National Library of Medicine (US); Bethesda (MD): 2018. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of single and multiple doses of HT-100 in Duchenne muscular dystrophy. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01847573> [Last accessed 23 July 2019]
234. Judge DP, Kass DA, Thompson WR, et al. Pathophysiology and therapy of cardiac dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2011;11(5):287-94.
235. Spurney CF, Sali A, Guerron AD, et al. Losartan decreases cardiac muscle fibrosis and improves cardiac function in dystrophin-deficient mdx mice. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2011;16(1):87-95.

236. Bish LT, Yarchoan M, Sleeper MM, et al. Chronic losartan administration reduces mortality and preserves cardiac but not skeletal muscle function in dystrophic mice. *PLoS One*. 2011;6(6):e20856.
237. Wang S, Li X, Yan L, et al. Tamoxifen inhibits fibroblast proliferation and prevents epidural fibrosis by regulating the AKT pathway in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;497(4):937-42.
238. Dorchies OM, Reutenauer-Patte J, Dahmane E, et al. The anticancer drug tamoxifen counteracts the pathology in a mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Am J Pathol*. 2013;182(2):485-504.
239. Nakerakanti S, Trojanowska M. The Role of TGF-beta Receptors in Fibrosis. *Open Rheumatol J*. 2012;6:156-62.
240. Morales MG, Gutierrez J, Cabello-Verrugio C, et al. Reducing CTGF/CCN2 slows down mdx muscle dystrophy and improves cell therapy. *Hum Mol Genet*. 2013;22(24):4938-51.
241. Sander M, Chavoshan B, Harris SA, et al. Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13818-23.
242. Chao DS, Silvagno F, Bredt DS. Muscular dystrophy in mdx mice despite lack of neuronal nitric oxide synthase. *J Neurochem*. 1998;71(2):784-9.
243. Percival JM, Whitehead NP, Adams ME, et al. Sildenafil reduces respiratory muscle weakness and fibrosis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *J Pathol*. 2012;228(1):77-87.
244. Asai A, Sahani N, Kaneki M, et al. Primary role of functional ischemia, quantitative evidence for the two-hit mechanism, and phosphodiesterase-5 inhibitor therapy in mouse muscular dystrophy. *PLoS One*. 2007;2(8):e806.

245. Leung DG, Herzka DA, Thompson WR, et al. Sildenafil does not improve cardiomyopathy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 2014;76(4):541-9.
246. Victor RG, Sweeney HL, Finkel R, et al. A phase 3 randomized placebo-controlled trial of tadalafil for Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*. 2017;89(17):1811-20.
247. Elkina Y, von Haehling S, Anker SD, et al. The role of myostatin in muscle wasting: an overview. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2011;2(3):143-51.
248. Acceleron Pharma Inc. ClinicalTrials.gov [Internet]. National Library of Medicine (US); Bethesda (MD): 2018. Study of ACE-031 in subjects with Duchenne muscular dystrophy. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01099761> [Last accessed 23 July 2019]
249. Wagner KR, Fleckenstein JL, Amato AA, et al. A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 2008;63(5):561-71.
250. St Andre M, Johnson M, Bansal PN, et al. A mouse anti-myostatin antibody increases muscle mass and improves muscle strength and contractility in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy and its humanized equivalent, domagrozumab (PF-06252616), increases muscle volume in cynomolgus monkeys. *Skelet Muscle*. 2017;7(1):25.
251. Bhattacharya I, Pawlak S, Marraffino S, et al. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Domagrozumab (PF-06252616), an Antimyostatin Monoclonal Antibody, in Healthy Subjects. *Clin Pharmacol Drug Dev*. 2018;7(5):484-97.
252. Hoffmann-La Roche. ClinicalTrials.gov [Internet]. National Library of Medicine (US); Bethesda (MD): 2018. Clinical trial to evaluate the efficacy, safety, and tolerability

- of RO7239361 in ambulatory boys with Duchenne muscular dystrophy. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03039686> [Last accessed 23 July 2019]
253. Bristol-Meyers Squibb. ClinicalTrials.gov [Internet]. National Library of Medicine (US); Bethesda (MD): 2018. Study of an investigational drug, BMS-986089, in ambulatory boys with DMD. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02515669> [Last accessed 23 July 2019]
254. Haidet AM, Rizo L, Handy C, et al. Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(11):4318-22.
255. Zhu J, Li Y, Lu A, et al. Follistatin improves skeletal muscle healing after injury and disease through an interaction with muscle regeneration, angiogenesis, and fibrosis. *Am J Pathol*. 2011;179(2):915-30.
256. Jerry R. Mendell. ClinicalTrials.gov [Internet]. National Library of Medicine (US); Bethesda (MD): 2018. Clinical intramuscular gene transfer of rAAV1.CMV.huFollistatin344 trial to patients with Duchenne muscular dystrophy. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02354781> [Last accessed 23 July 2019]
257. Bajanca F, Vandell L. Epigenetic Regulators Modulate Muscle Damage in Duchenne Muscular Dystrophy Model. *PLoS Curr*. 2017;9.
258. Consalvi S, Mozzetta C, Bettica P, et al. Preclinical studies in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy with the histone deacetylase inhibitor givinostat. *Mol Med*. 2013;19:79-87.
259. Bettica P, Petrini S, D'Oria V, et al. Histological effects of givinostat in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2016;26(10):643-9.

260. Hayashiji N, Yuasa S, Miyagoe-Suzuki Y, et al. Erratum: G-CSF supports long-term muscle regeneration in mouse models of muscular dystrophy. *Nat Commun.* 2015;6:7295.
261. Sienkiewicz D, Kulak W, Okurowska-Zawada B, et al. Efficacy and the Safety of Granulocyte Colony-Stimulating Factor Treatment in Patients with Muscular Dystrophy: A Non-Randomized Clinical Trial. *Front Neurol.* 2017;8:566.
262. Fryburg DA. Insulin-like growth factor I exerts growth hormone- and insulin-like actions on human muscle protein metabolism. *Am J Physiol.* 1994;267(2 Pt 1):E331-6.
263. Barton ER, Morris L, Musaro A, et al. Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol.* 2002;157(1):137-48.
264. Gehrig SM, Ryall JG, Schertzer JD, et al. Insulin-like growth factor-I analogue protects muscles of dystrophic mdx mice from contraction-mediated damage. *Exp Physiol.* 2008;93(11):1190-8.
265. Children's Hospital Medical Center Cincinnati. ClinicalTrials.gov [Internet]. National Library of Medicine (US); Bethesda (MD): 2018. Safety and efficacy study of IGF-1 in Duchenne muscular dystrophy. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01207908?term=NCT01207908&rank=1> [Last accessed 23 July 2019]
266. Amthor H, Macharia R, Navarrete R, et al. Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(6):1835-40.
267. Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2014;370(22):2071-82.

268. Distler O, Highland KB, Gahlemann M, et al. Nintedanib for Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease. *N Engl J Med*. 2019;380(26):2518-28.
269. Miyazaki K, Collins DJ, Walker-Samuel S, et al. Quantitative mapping of hepatic perfusion index using MR imaging: a potential reproducible tool for assessing tumour response to treatment with the antiangiogenic compound BIBF 1120, a potent triple angiokinase inhibitor. *Eur Radiol*. 2008;18(7):1414-21.
270. Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22(4):201-7.
271. Awasthi N, Schwarz RE. Profile of nintedanib in the treatment of solid tumors: the evidence to date. *Onco Targets Ther*. 2015;8:3691-701.
272. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1358-75.
273. Rangarajan S, Kurundkar A, Kurundkar D, et al. Novel Mechanisms for the Antifibrotic Action of Nintedanib. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;54(1):51-9.
274. Andretta F, Bernasconi P, Baggi F, et al. Immunomodulation of TGF-beta 1 in mdx mouse inhibits connective tissue proliferation in diaphragm but increases inflammatory response: implications for antifibrotic therapy. *J Neuroimmunol*. 2006;175(1-2):77-86.
275. Ichiki Y, Smith E, LeRoy EC, et al. Different effects of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta on the two platelet-derived growth factor receptors' expression in scleroderma and healthy human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 1995;104(1):124-7.
276. Cordova G, Negroni E, Cabello-Verrugio C, et al. Combined therapies for duchenne muscular dystrophy to optimize treatment efficacy. *Font Genet*. 2018;9(114):1-8

277. Rol N, de Raaf MA, Sun XQ, et al. Nintedanib improves cardiac fibrosis but leaves pulmonary vascular remodeling unaltered in experimental pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res.* 2019;115(2):432-9.

