



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

UTILIDAD DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA COMO MARCADOR PARA EL SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE POMPE DEL ADULTO

Tesis presentada para optar al grado de Doctor

Doctoranda:

Claudia Alejandra Nuñez Peralta

Directores:

Dr. Jordi Díaz Manera

Dr. Antonio Martínez Noguera

Tutora:

Dra. Susan Webb Youdale



Universitat Autònoma
de Barcelona

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Programa de Doctorado en Medicina
Departamento de Medicina

Barcelona, 2022

Esta tesis va dedicada en primer lugar a mi familia, por todo el amor y apoyo que siempre me ofrecieron.

A los directores, los doctores, Jordi Díaz, Antonio Martínez. A la Dra. Susan Webb como tutora del presente trabajo. Gracias por su implicación total desde el inicio, por su continuo estímulo para llegar hasta el final y apoyo en todo momento.

Mi especial agradecimiento al Dr. Jordi Díaz, al que conocí para la realización de este trabajo y se ha convertido en un amigo, por su implicación desinteresada y porqué sin cuya colaboración este trabajo no presentaría el resultado final tal y como se muestra.

A la Dra. Paula Montecinos del equipo de aplicaciones en diagnóstico, Philips-Madrid, por transmitirme su entusiasmo, por su dedicación y su asesoramiento e introducirme en el mundo de la resonancia magnética.

A mi pareja, Oscar, que me motivó desde el principio, gracias por comprenderme, saber escuchar, y brindarme lo mejor de ti.

A mis amigos y compañeros de la unidad de Radiodiagnóstico (médicos radiólogos, técnicos y enfermeros) del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona.

“Este trabajo no sólo no hubiera sido nada sin ustedes, sino con toda la gente que estuvo a mi alrededor desde el comienzo; algunos siguen hasta hoy, ¡Gracias...totales!”

Gustavo Cerati

- #** **10MWT:** Run/Walk 10 Meters Test / Test de Marcha Rápida de 10 metros
6MW: 6-Minute Walk Test / Test de la marcha de los 6 minutos
- A** **AAG:** Enzima alfa-glucosidasa ácida
ALT: Alanina aminotrasferasa
AST: Aspartato aminotrasferasa
- C** **CK:** Creatina Kinasa
CI-MPR: Cation-independent Mannose 6-Phosphate Receptor
CRIM: Cross-reactive immunological material
CTM: Contraste por Transferencia de Magnetización
CVF: Capacidad vital forzada
- E** **EP:** Enfermedad de Pompe
EPOC: European POMpe Consortium
ETL: Echo Train Length / Factor Turbo
- F** **FID:** Free induction decay
FF: Fat Fraction / Fracción de Grasa
FLAIR: Fluid-Attenuated Inversion Recovery
- G** **GRE:** Gradient Echo
- I** **IOPD:** Infantile Onset Pompe Disease / Enfermedad de Pompe de Inicio Infantil
- L** **LGMD:** Limb-Girdle Muscular Dystrophy /Distrofia Muscular de Cinturas
LOPD: Late Onset Pompe Disease / Enfermedad de Pompe de Inicio Tardío
- M** **M:** Net Magnetization
M6P: Manosa-6-fosfato
MRI: Magnetic Resonance Imaging / Imagen por Resonancia Magnética
MRC: Medical Research Council Muscle Scale
MRS: Magnetic Resonance Spectroscopy
MTR: Magnetic Transfer Ratio
- P** **PEM:** Presión Espiratoria Máxima
PIM: Presión Inspiratoria Máxima
- R** **rhAAG:** Recombinant Human Acid-alpha-Glucosidase / alfa-Glucosidasa Recombinante
RM: Resonancia Magnética
- S** **STIR:** Short-TI Inversion Recovery
SE: Spin-echo
- T** **TRE:** Terapia de Reemplazo Enzimático
TM: Transferencia de Magnetización
TSE: Fast Turbo Spin Echo
Tup4: Time To Climb 4 Stairs Test / Tiempo de subir cuatro escalones
Tdo4: Time To Down 4 Stairs Test/ Tiempo de bajar 4 escalones

RESUMEN	8
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. SOBRE LA ENFERMEDAD DE POMPE	17
1.1.1. Fisiopatología	18
1.1.3. Aspectos genéticos	20
1.1.4. Manifestaciones clínicas	22
1.1.5. Diagnóstico	23
1.1.5.1. Analítica	23
1.1.5.2. Pruebas funcionales respiratorias	24
1.1.5.3. Electromiografía	24
1.1.5.4. Biopsia muscular	25
1.1.5.5. Técnicas de imagen	25
1.1.6. Tratamiento	25
1.1.7. Seguimiento	30
1.1.7.1. Fuerza muscular	31
1.1.7.2. Función muscular	31
1.1.7.3. Función pulmonar	31
1.1.7.4. Escalas de calidad de vida	31
1.2. RESONANCIA MAGNÉTICA	32
1.2.1. Principios físicos	32
1.2.1.1. Concepto de espín nuclear	32
1.2.1.2. Campo magnético y precesión	33
1.2.1.3. Vector de magnetización neta (M)	36
1.2.1.4. Pulso de radiofrecuencia – Flip angle	37
1.2.1.5. Excitación y relajación nuclear	38
1.2.1.5.1. <i>Relajación T₁</i>	39
1.2.1.5.2. <i>Relajación T₂</i>	39
1.2.1.6. FID y T ₂ '	40
1.2.1.7. Mecanismos responsables de la relajación T ₁ -T ₂	41
1.2.1.7.1. <i>Interacción dipolar</i>	41
1.2.1.7.2. <i>Desplazamiento químico (δ)</i>	42
1.2.1.7.3. <i>Intercambio químico</i>	42
1.2.1.8. Principales fuentes de la señal en MRI	43
1.2.1.8.1. <i>Agua</i>	43
1.2.1.8.2. <i>Lípidos</i>	43
1.2.1.8.3. <i>Macromoléculas</i>	44
1.2.1.9. Transferencia de magnetización (TM)	45
1.2.1.10. <i>Gradientes de Campo Magnético</i>	46
1.2.2. Técnicas de adquisición en resonancia magnética	47
1.2.2.1. TR y TE	47
1.2.2.2. Técnicas convencionales	48
1.2.2.2.1. <i>Spin-echo (SE)</i>	48
1.2.2.2.2. <i>Fast (Turbo) Spin echo (TSE)</i>	49
1.2.2.2.3. <i>Gradient Echo- GRE</i>	49
1.2.2.2.4. <i>Inversion recovery pulse sequences: STIR-FLAIR</i>	50
1.2.2.3. Técnicas especiales	52
1.2.2.3.1. <i>Técnica Dixon</i>	52
1.2.2.3.2. <i>Contraste de Transferencia de Magnetización</i>	54
1.2.2.3.3. <i>Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS)</i>	56
1.2.2.3.4. <i>Glyco-CEST y NEoCEST</i>	56
1.2.3. Aplicaciones clínicas la RM en la enfermedad de Pompe	58

2. HIPÓTESIS	67
3. OBJETIVOS	71
4. COMPENDIO DE PUBLICACIONES	75
4.1. ARTÍCULO 1	77
4.1.1. Publicación original	78
4.2. ARTÍCULO 2	93
4.2.1. Publicación original	94
5. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS	105
6. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN	119
7. CONCLUSIONES	127
8. LINEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN	131
9. BIBLIOGRAFÍA	135
10. ANEXO	145
10.1. PUBLICACIÓN	147

RESUMEN

En la enfermedad de Pompe, la acumulación progresiva de glucógeno en el músculo culmina con la pérdida progresiva de fibras musculares y la sustitución del tejido muscular por tejido fibro-adiposo. La terapia de reemplazo enzimático (TRE) ha mostrado que es capaz de estabilizar la sintomatología de los pacientes, a pesar de que todo parece indicar que el deterioro muscular continúa progresando lo que lleva a el empeoramiento de la fuerza muscular. Es evidente que necesitamos nuevos marcadores de seguimiento que sean capaces de identificar cambios en la estructura muscular que todavía no se traducen en un cambio en la debilidad muscular. La imagen de resonancia magnética se ha establecido en los últimos años como una herramienta útil en el seguimiento de las miopatías hereditarias, como la enfermedad de Pompe, ya que es capaz de mostrar cambios en la estructura muscular, especialmente acúmulo de grasa, antes de que se produzca un impacto en los síntomas de los pacientes.

En la presente tesis doctoral, exploramos la utilidad de dos técnicas específicas de resonancia magnética para caracterizar y cuantificar el daño en los músculos esquelético de pacientes con enfermedad de Pompe de inicio tardío.

Para evaluar la utilidad de la técnica Dixon, seguimos una cohorte de 36 pacientes durante 4 años y cuantificamos la cantidad de grasa en los músculos, conocida como "fracción grasa". Hemos observado una progresión anual de la fracción grasa muscular tanto en pacientes sintomáticos que reciben tratamiento como en pacientes pre-sintomáticos. Estos datos obtenidos en la resonancia magnética se encuentran en la misma línea que los cambios en las pruebas físicas observados en los pacientes seguidos en estudios clínicos. Por un lado, la progresión observada en la fracción grasa en pacientes tratados muestra que el proceso fisiopatológico que lleva a la degeneración de las fibras musculares sigue activa, a pesar del tratamiento, y lleva al aumento de la fracción grasa y la pérdida de función muscular.

En nuestros estudios hemos observado que la resonancia muestra cambios antes de que éstos tengan un impacto en la función muscular, por lo que se plantea como una muy buena técnica para realizar el seguimiento de la respuesta a la TRE de los pacientes en la clínica diaria, pero también en ensayos clínico que analizan la eficacia de nuevas terapias. No obstante, hemos podido mostrar que los cambios que tienen lugar en resonancia acaban, correlacionando con cambios funcionales. Este dato es importante ya que confirma el papel predictor de la resonancia, ya que, si identificamos un aumento importante de fracción grasa en un paciente determinado, ese paciente está a riesgo de desarrollar un empeoramiento muscular notable. En el caso de los pacientes pre-sintomáticos, un aumento de grasa puede indicar que la enfermedad muscular ha empezado a afectar la capacidad de los músculos de los pacientes para regenerarse y éstos están degenerando, dando paso a la pérdida de fibras musculares y aumento de fracción grasa. A largo plazo estos pacientes empezarán a perder función muscular, lo que sugiere que la resonancia podría ser útil para detectar pacientes en los que iniciar el tratamiento de forma precoz. Estos datos sugieren que la técnica de Dixon puede ser útil tanto en la clínica diaria como en los estudios de historia natural o en ensayos clínicos en pacientes con enfermedad de Pompe.

La segunda técnica de resonancia magnética utilizada en esta tesis fue la transferencia de magnetización (TM) con el fin de estudiar los cambios estructurales que podrían estar relacionados con la acumulación de glucógeno en el musculo de estos pacientes. La cantidad de transferencia de magnetización es una medida indirecta de la señal proveniente de las macromoléculas como el glucógeno. Como se trata de una técnica que aún no ha sido aplicada en la enfermedad de Pompe, decidimos comparar los resultados con controles sanos. En nuestros estudios hemos observado que existe una correlación negativa entre la fracción grasa y la TM, es decir a mayor contenido graso menor TM, lo que confirma que la masa grasa tiene un menor número de macromoléculas, a diferencia del

músculo esquelético que tiene una gran cantidad de proteínas que forman parte de la estructura sarcomérica. Estos datos sugieren que la TM es útil para detectar pérdida de masa muscular en los pacientes con enfermedad de Pompe. Consecuentemente, hemos evidenciado una correlación significativa entre la TM y los resultados de las pruebas funcionales, demostrando que esta técnica podría ser útil en el seguimiento de los pacientes con esta enfermedad. Con el objetivo de valorar si la TM aumentaba en músculos sin grasa en los que existía un acúmulo notable de glucógeno, analizamos músculos cuya fracción grasa era menor al 10%, pero no pudimos evidenciar cambios en la TM comparada con controles, sugiriendo que esta técnica no es capaz de evidenciar cambios en la concentración de glucógeno. Estos datos nos hacen pensar que necesitamos técnicas directas como la espectrometría de carbono. En este sentido, creemos que son necesarios estudios que utilicen esta técnica para confirmar que son capaces de identificar y cuantificar glucógeno en los músculos de los pacientes con enfermedad de Pompe y son útiles para mostrar cambios del mismo en el tiempo.

ABSTRACT

In Pompe disease, the progressive accumulation of glycogen in the muscle culminates in the progressive loss of muscle fibers and the replacement of muscle tissue with fibro-adipose tissue. Enzyme replacement therapy (ERT) has been shown to be able to stabilize patients' symptomatology, although it seems that muscle deterioration continues to progress leading to worsening muscle strength. We need new follow-up markers that are able to identify changes in muscle structure that do not yet translate into a change in muscle weakness. Magnetic resonance imaging has established itself in recent years as a useful tool in the follow-up of inherited myopathies, such as Pompe disease, as it is able to show changes in muscle structure, especially fat accumulation before there is an impact on patients' symptoms.

In the present dissertation, we explore the utility of two specific MRI techniques to characterize and quantify skeletal muscle damage in patients with late-onset Pompe disease.

To evaluate the utility of the Dixon technique, we followed a cohort of 36 patients for 4 years and quantified the amount of fat in the muscles, known as the "fat fraction". We observed an annual progression of muscle fat fraction in both symptomatic patients receiving treatment and pre-symptomatic patients. These data obtained on MRI are in line with the changes in physical tests observed in patients followed in clinical studies. On the one hand, the progression observed in the fat fraction in treated patients shows that the pathophysiological process leading to the degeneration of muscle fibers is still active, despite treatment, and leads to an increase in the fat fraction and loss of muscle function. In our studies we have observed that MRI shows changes before they have an impact on muscle function, making it a very good technique for monitoring patients' response to ERT in daily clinical practice, but also in clinical trials analyzing the efficacy of new therapies. However, we have been able to show that the changes that take place in resonance end up correlating

with functional changes. This is important because it confirms the predictive role of MRI, since, if we identify a significant increase in fat fraction in a given patient, that patient is at risk of developing a significant muscle deterioration. In the case of pre-symptomatic patients, an increase in fat may indicate that the muscle disease has begun to affect the ability of the patients' muscles to regenerate, and they are degenerating, giving way to loss of muscle fibers and increase in fat fraction. In the long term, these patients will begin to lose muscle function, suggesting that MRI could be useful in detecting patients in whom to initiate treatment early. These data suggest that Dixon's technique may be helpful in daily clinical practice and natural history studies or clinical trials in patients with Pompe disease.

The second MRI technique used in this thesis was magnetization transfer (MT) in order to study structural changes that might be related to glycogen accumulation in the muscle of these patients. The amount of magnetization transfer is an indirect measure of the signal coming from macromolecules such as glycogen. As this is a technique that has not yet been applied to Pompe disease, we decided to compare the results with healthy controls. In our studies, we have observed that there is a negative correlation between fat fraction and MT, the higher the fat content, the lower the MT, which confirms that fat mass has a lower number of macromolecules, unlike skeletal muscle which has a large amount of proteins that are part of the sarcomeric structure. These data suggest that MT is useful for detecting muscle mass loss in patients with Pompe disease. Consequently, we have evidenced a significant correlation between MT and functional test results, demonstrating that this technique could be useful in the follow-up of patients with this disease. To assess whether TM increased in muscles without fat in which there was a notable accumulation of glycogen, we analyzed muscles whose fat fraction was less than 10%, but we were unable to demonstrate changes in MT compared to controls, suggesting that this technique is not capable of demonstrating changes in glycogen concentration. These data make us think that we need direct techniques

such as carbon spectrometry. In this sense, we believe that studies using this technique are necessary to confirm that they are capable of identifying and quantifying glycogen in the muscles of patients with Pompe disease and are useful to show changes in glycogen over time.



INTRODUCCIÓN



1.1. SOBRE LA ENFERMEDAD DE POMPE

La glucogenosis tipo II, también conocida como enfermedad de Pompe o deficiencia de maltasa ácida, es una enfermedad rara secundaria al déficit de la enzima alfa-glucosidasa ácida (AAG), responsable de la degradación de glucógeno a glucosa. El déficit de esta enzima lleva a que el glucógeno no degradado se almacene de forma anormal en diferentes tejidos con predilección por el músculo cardíaco y esquelético¹.

La frecuencia de presentación se estima en 1 de cada 40.000 nacidos vivos, pero varía según el origen étnico y la zona geográfica,². Con la implementación del screening neonatal en países como E.E.U.U., Taiwán y Japón, se han reportado frecuencias más elevadas del orden de 1 en 17.000³⁻⁵. En el año 2013 se creó el registro de la enfermedad de Pompe en España que a día de hoy incluye unos 140 pacientes y que nos ha permitido conocer que la mayoría de ellos provienen de comunidades como Andalucía o Murcia⁶.

Desde el punto de vista clínico, la enfermedad de Pompe (EP) tiene dos presentaciones claramente diferenciadas⁷. La enfermedad de Pompe de inicio infantil (Infantile Onset Pompe Disease, IOPD) caracterizada por un inicio precoz de los síntomas durante los primeros meses de vida. Los pacientes desarrollan debilidad muscular generalizada, hipotonía, insuficiencia respiratoria y una cardiopatía hipertrófica que es la causa del fallecimiento si no se tratan antes del primer año de vida. La enfermedad de Pompe de inicio tardío (Late Onset Pompe Disease, LOPD) se caracteriza por un inicio de los síntomas a partir de los dos años de vida y tiene una presentación clínica más heterogénea que va desde una hiperkemia asintomática hasta una debilidad muscular progresiva que afecta musculatura esquelética y respiratoria⁸. La mayoría de los pacientes va a desarrollar una debilidad incapacitante siendo preciso el uso de ventilación no invasiva en un gran número de los mismos.

El presente trabajo de tesis doctoral está centrado en la utilización de la imagen de resonancia magnética en la LOPD. Los aspectos fisiopatológicos y genéticos desarrollados a continuación también son aplicables a la forma de inicio infantil.

1.1.2. Fisiopatología

El defecto primario en la EP radica en un déficit de la AAG responsable de la conversión de glucógeno a glucosa en el interior de los lisosomas. La enzima es sintetizada como un precursor inactivo en el retículo endoplásmico para después añadirsele una señal de direccionamiento lisosomal en el complejo de Golgi que consiste en la molécula manosa-6-fosfato (M6P). De este modo, la AAG puede ser reconocida por los receptores M6P del lisosoma⁹, siendo éste un proceso muy importante que ha permitido el desarrollo de tratamientos para esta enfermedad.

El glucógeno es una de las fuentes principales de energía en el músculo esquelético e hígado. Mientras que el objetivo de la degradación de glucógeno en el hígado es mantener niveles normales de glucosa en sangre y respaldar las necesidades energéticas de otros tejidos; en el músculo esquelético la degradación de glucógeno es crucial para a la formación de energía que será utilizada por la propia célula muscular. De este modo, las células musculares son más vulnerables a cualquier alteración en el proceso de degradación del glucógeno, lo que llevaría al desarrollo de fatiga o debilidad muscular ya que las fibras musculares no disponen del combustible adecuado para la excitación y contracción de las miofibrillas¹⁰.

La comprensión de la patogénesis del daño muscular en la EP está evolucionando rápidamente. Hasta hace poco, se consideraba que ocurría en etapas sucesivas, clásicamente descritas en 5 estadios como queda ilustrado en la **figura 1**¹¹. Estadio 1: acumulación de pequeños lisosomas cargados de glucógeno en contacto con las miofibrillas intactas. Estadio 2: aumento en número y tamaño de los lisosomas cargados de glucógeno, que se rompen y liberan glucógeno y enzimas lisosomales al

citoplasma produciendo daño miofibrilar. Estadio 3: mayor acumulación de glucógeno citoplasmático secundario a la destrucción masiva de lisosomas con daño mitocondrial asociado y extensa destrucción miofibrilar. Estadio 4 y 5: sustitución completa por glucógeno de los elementos contráctiles de la célula e influxo de agua extracelular.

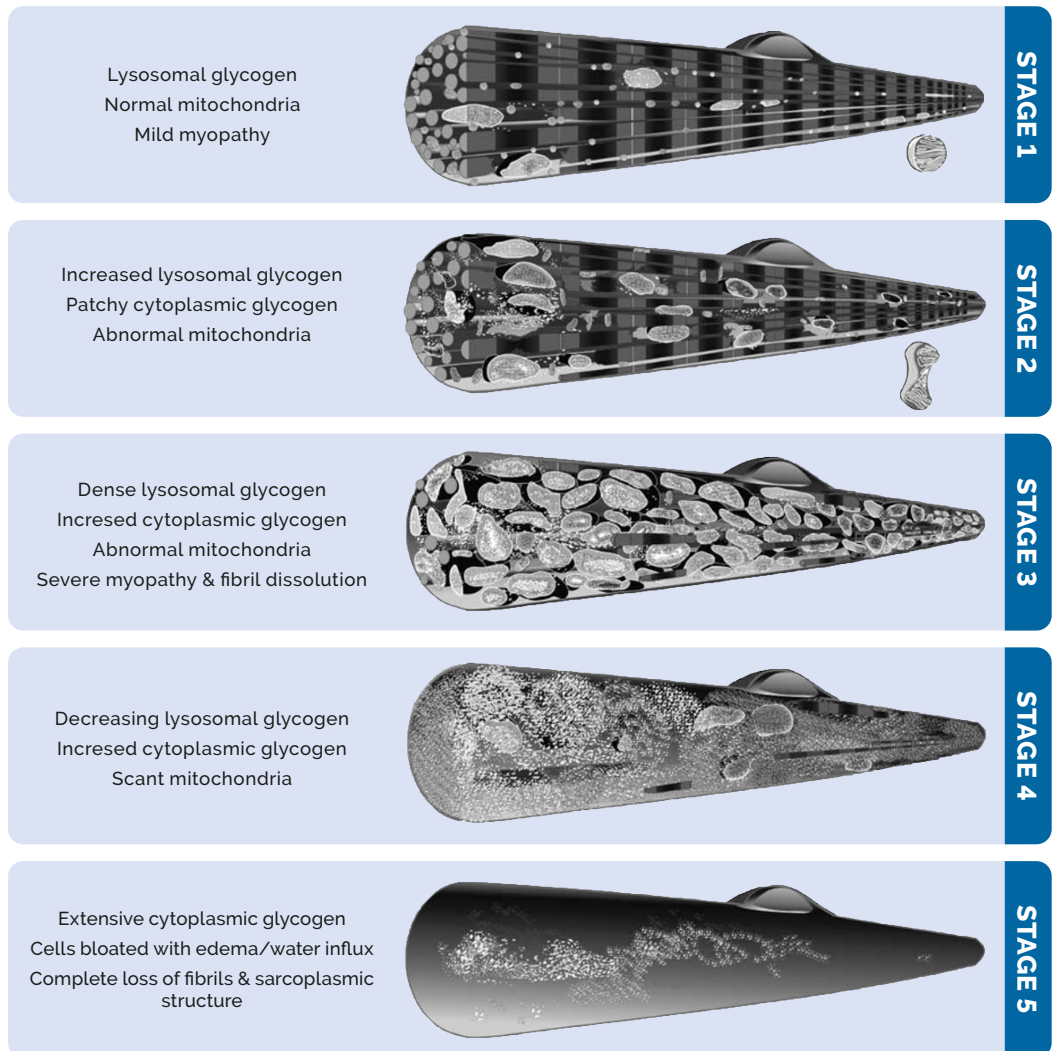


Figura 1: Estadios en la patogénesis de la la enfermedad de Pompe.

*Imagen adaptada de Thurberg, et al*¹¹

De forma concomitante a este proceso y gracias a las observaciones apreciadas en los ratones knock-out (KO) del gen *GAA*, se observó que las células musculares tenían

una excesiva acumulación de vesículas autofágicas, sugiriendo un rol preponderante de la autofagia en la patogénesis de la EP^{12, 13}. Como se observa en la **figura 2**, la "autofagia" es el proceso por el cual se forma una vesícula de doble membrana en el interior del citoplasma que secuestra organelas dañadas, agregados proteicos y otros productos de desecho destinados a su degradación. Dicha vesícula se fusiona con los lisosomas donde el material introducido se descompone y los componentes resultantes (aminoácidos, glucosa, ácidos grasos) se exportan de nuevo al citosol para la generación de energía y renovación celular^{14, 15}. Adicionalmente existe una disfunción del metabolismo del calcio, del funcionamiento mitocondrial y un aumento del estrés oxidativo como resultado de la acumulación de sustratos no metabolizados por los lisosomas que acentúan aún más el daño celular¹⁶.

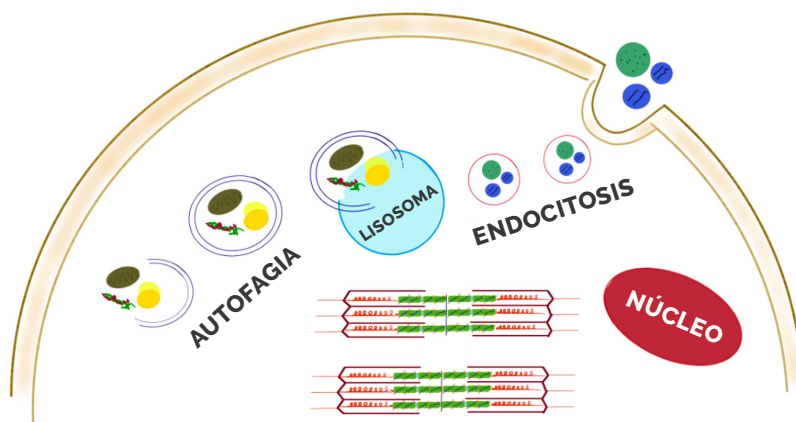


Figura 2: Representación gráfica de la autofagia.

Se forma una vesícula de novo en el citosol, a diferencia de la endocitosis que introduce material extracelular a través de la invaginación de la propia membrana plasmática.

1.1.3. Aspectos genéticos

La EP es un trastorno autosómico recesivo producido por mutaciones en el gen *GAA* que codifica la enzima AAG. El gen *GAA* se localiza en el brazo largo del cromosoma 17q25.3¹⁷. Se han descrito más de 900 mutaciones diferentes, incluyendo mutaciones puntuales o mutaciones que afectan al splicing del gen¹⁸. Aproximadamente dos terceras partes de estas variantes se clasifican como patogénicas o probablemente patogénicas y el resto se clasifican como variantes de significado incierto. En la LOPD

la mutación más frecuente es la inversión c.-32-13T>G (IVS1-13T>G) que produce un "splicing" del primer exón del gen, siendo la mayoría de los pacientes heterocigotos para esta mutación. Recientemente, el grupo holandés liderado por la Dra. Van der Ploeg ha desarrollado una página web que contiene información de todas las mutaciones reportadas, incluyendo datos sobre su posible patogenicidad, su localización en el gen y su efecto esperado. Este registro es de uso gratuito y puede encontrarse en la siguiente dirección web: <http://www.pompevariantdatabase.nl>¹⁹.

Aunque la correlación entre la actividad enzimática y el fenotipo no es estricta, la mayoría de los pacientes con fenotipos lentamente progresivos tienen un nivel medible de la actividad de la AAG. En las formas de presentación del adulto la actividad enzimática puede variar en rangos entre 1% y el 30% a diferencia de las formas infantiles donde la actividad enzimática es menor del 1%, lo que relaciona con una presentación clínica más severa^{19,20}.

El estatus CRIM (Cross-reactive immunological material) permite clasificar a los pacientes en función de si producen o no enzima de forma residual. Los pacientes que no producen AAG son llamados CRIM negativos, desarrollando siempre una forma infantil clásica. Los pacientes CRIM positivos, expresan algo de proteína residual pudiendo presentarse fenotípicamente tanto como Pompe infantil o como formas del adulto^{21, 22}. La mayoría de los pacientes CRIM negativos van a tener dos mutaciones non-sense que se asocian a la ausencia de expresión proteica. En general las mutaciones misense se asocian a producción de proteína y por tanto a un estadio CRIM positivo. De todos modos, existen mutaciones misense donde los mecanismos traslacionales celulares identifican anomalías estructurales en la enzima y llevan a su destrucción, produciendo una ausencia de producción de proteína o lo que es lo mismo un estadio CRIM negativo. Información detallada sobre la predicción del estatus CRIM de cada mutación puede encontrarse en el registro descrito previamente en <http://www.pompevariantdatabase.nl>.

1.1.4. Manifestaciones clínicas

En la LOPD la debilidad progresiva de los músculos esqueléticos constituye uno de los síntomas predominantes. Habitualmente los primeros grupos musculares en afectarse suelen ser los *músculos paravertebrales*, de la cintura pélvica como los *glúteos* (medio y menor) y de los muslos (compartimiento aductor e isquiotibial), seguido de las extremidades superiores y músculos respiratorios. Los músculos de los antebrazos y piernas se afectan mínimamente y si lo hacen, es en estadios avanzados de la enfermedad²³. El compromiso de los músculos de la cintura escapular (*trapecio, serrato anterior, romboides, subescapular*) y del tronco, puede llevar a la aparición de escoliosis, hiperlordosis lumbar y escápula alada en un número considerable de pacientes²⁴.

Los síntomas de hipoventilación nocturna como por ejemplo alteración de la calidad del sueño, somnolencia diurna y cefalea, son descritos por un grupo numeroso de pacientes. La debilidad progresiva del diafragma y de la pared abdominal anterior lleva a un deterioro del intercambio gaseoso en el pulmón, asociándose a una disminución de la fuerza muscular necesaria para la expectoración y favoreciendo la aparición de infecciones respiratorias. La espirometría suele mostrar un compromiso tanto de la función inspiratoria como espiratoria, siendo muy habitual la detección de una caída mayor al 10% de la capacidad vital forzada (CVF) al pasar de la posición sentado o acostado a supino lo que es un reflejo de debilidad diafragmática²⁵. Desafortunadamente el fallo respiratorio sigue siendo la principal causa de muerte en estos pacientes²⁶⁻²⁸.

Otras manifestaciones clínicas descritas, pero mucho menos frecuentes son: aneurismas cerebrales, dolicoectasia y microhemorragias con un predominio por la circulación posterior del cerebro^{29,30}. Finalmente, la combinación de miopatía degenerativa, pérdida de capacidad de carga y reducción de la fuerza puede conducir al desarrollo de osteoporosis³¹.

1.1.5. Diagnóstico

Muchos de los síntomas que presentan los pacientes con LOPD son superponibles a otras enfermedades neuromusculares incluyendo miopatías hereditarias, adquiridas o trastornos neurógenos, lo que hace que el diagnóstico de la enfermedad pueda ser complejo, esto lleva a un retraso medio en el diagnóstico de entre 7 y 10 años^{6, 32}.

Disponemos de varias pruebas complementarias para llegar al diagnóstico, sin embargo, una correcta anamnesis y exploración física aún son fundamentales.

1.1.5.1. Analítica

Uno de los parámetros de uso frecuente en el diagnóstico de la EP, es la determinación de creatina kinasa (CK), una enzima sensible al daño del músculo estriado tanto esquelético como cardiaco. Niveles altos en sangre si bien no son específicos, son sospechosos de miopatía. Los niveles de CK en la EP varían desde la normalidad hasta 15 veces superior a lo normal. Los pacientes más jóvenes pueden presentar niveles más altos comparados con los pacientes en fases más avanzadas de la enfermedad³³. Otras enzimas inespecíficas que pueden estar elevadas son las enzimas hepáticas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), ya que también se expresan en el músculo de los pacientes.

La prueba de screening de la EP más habitualmente utilizada en la clínica diaria es la determinación de la actividad de AAG en gota de sangre seca. En esta prueba se impregna con sangre un papel de filtro y se mide la actividad de AAG. La actividad enzimática se mantiene estable a temperatura ambiente, lo que permite el transporte a laboratorios especializados para su diagnóstico^{34,35}. También se puede medir la actividad de AAG en fibroblastos, leucocitos y células musculares.

Una vez que se determina que la actividad enzimática residual está reducida, es necesario confirmar el diagnóstico con un estudio genético que identifique mutaciones

patogénicas en el gen *GAA*. Este estudio genético puede hacerse mediante técnica de Sanger que permite la secuenciación directa del gen *GAA* o bien a través de técnicas de secuenciación masiva como son paneles, exomas y/o genomas. Las guías de diagnóstico publicadas por el European POMpe Consortium (EPOC) recomiendan, que para confirmar el diagnóstico deben evidenciarse dos mutaciones patogénicas en el gen *GAA* ³⁶. En caso de que se identifique una única mutación ó que no se encuentre ninguna, es necesario demostrar una actividad enzimática reducida en muestras de al menos dos tejidos diferentes como por ejemplo sangre, fibroblastos o músculo.

1.1.5.2. Pruebas funcionales respiratorias

Si bien las pruebas funcionales respiratorias no son diagnósticas per se, aportan información importante para los cuidados de los pacientes y además, si se identifica una disfunción diafragmática, pueden ser sugestivas de EP. La función pulmonar debe estudiarse en todo paciente con EP. Debe medirse la CVF en sedestación y en decúbito supino. Si existe disfunción diafragmática, evidenciaremos un descenso de un 10% en la CVF al pasar de la posición de sentado a acostado. Otras medidas que pueden aportar información son la presión espiratoria máxima (PEM) y la presión inspiratoria máxima (PIM) ya que aportan información importante sobre la función de la musculatura espiratoria e inspiratoria respectivamente.

1.1.5.3. Electromiografía

La electromiografía (EMG) puede ser útil en el diagnóstico de los pacientes. Los estudios de conducción nerviosa, tanto motora como sensitiva, son normales. Los estudios de aguja pueden mostrar unidades miopáticas en músculos débiles y, como dato característico se ha descrito como característico, la presencia de descargas miotónicas, especialmente en musculatura axial. Estos hallazgos, aunque sugestivos, no son patognomónicos de la enfermedad ya que pueden encontrarse en otras enfermedades neuromusculares, como la distrofia miotónica tipo 1 o 2

o otras glucogenosis. No obstante, si no se estudian los músculos específicamente afectados, el estudio puede ser normal.

1.1.5.4. Biopsia muscular

El estudio microscópico de biopsia muscular en la EP ha quedado relegado gracias a la popularización de los estudios genéticos. Las técnicas histoquímicas convencionales pueden poner de manifiesto la presencia de vacuolas de tamaño variable en el interior de las fibras que contienen glucógeno. El número de fibras afectas varía notablemente de un paciente a otro. En pacientes con IOPD es frecuente hallar numerosas fibras con vacuolas, mientras que en los adultos podemos encontrar desde unas pocas fibras afectas a un gran número de ellas. No es infrecuente que la biopsia en el adulto sea normal o casi normal. La técnica de PAS nos permite identificar el glucógeno en las fibras musculares. La actividad de fosfatasa ácida, marcador de actividad lisosomal, suele estar aumentada en las fibras musculares que contienen vacuolas y puede apoyar el diagnóstico. Es posible así mismo identificar aumento de otros marcadores lisosomales, como LC3.

1.1.5.5. Técnicas de imagen

Los estudios de imagen como la resonancia magnética son utilizados en el proceso diagnóstico de las enfermedades neuromusculares con resultados prometedores y profundizaran más adelante (apartado 1.2 de la introducción).

1.1.6. Tratamiento

El tratamiento de la EP se basa en la terapia de reemplazo enzimático (TRE) con la enzima alfa-glucosidasa recombinante humana-rhAAG, (alglucosidasa-alfa, Myozyme®, Lumizyme®). Esta terapia fue aprobada el año 2006 por la Agencia Europea de Medicamentos como tratamiento específico de la enfermedad de Pompe variante infantil y en el año 2010 para la forma de inicio tardío ³⁷.

Se administra mediante perfusiones por vía intravenosa de 20 mg por kg de peso corporal cada dos semanas.

Los resultados obtenidos en los ensayos clínicos realizados en IOPD mostraron que el tratamiento alargaba de forma muy significativa la expectativa de vida de los pacientes, gracias a una mejoría de la cardiopatía ³⁸. Los pacientes mejoraron su función motora, si bien la respuesta en este sentido era muy heterogénea, desde pacientes que eran capaces de caminar de forma autónoma a pacientes que no alcanzaban casi ningún hito motor del desarrollo. Con el tiempo se observó que existían dos factores clave en la respuesta clínica de los pacientes. El primero era la velocidad en el inicio del tratamiento. Los pacientes en los que se iniciaba el tratamiento de forma precoz, a los pocos días de vida, mejoraron más que aquellos en los que el tratamiento se iniciaba de forma retrasada. El segundo factor era la expresión residual de AAG. Aquellos pacientes CRIM negativos tenían una respuesta menor al tratamiento debido al desarrollo de una respuesta inmunitaria contra la enzima, mientras que los pacientes CRIM positivos tenían una respuesta más beneficiosa, con una respuesta inmunitaria menos marcada.

En los últimos años se han implementado regímenes de fármacos inmunosupresores que se administran a los pacientes CRIM negativos antes de que se inicie la TRE, mejorando de forma significativa la respuesta clínica obtenida. A pesar de estos esfuerzos, la respuesta de estos pacientes sigue siendo menor que la de los pacientes CRIM positivos. Quedan muchos interrogantes abiertos en la respuesta a largo plazo de los pacientes con IOPD entre las que se incluye identificar la dosis más efectiva, conocer los factores genéticos que influyen en la respuesta al medicamento, identificar los mecanismos por los que un grupo destacable de pacientes desarrolla alteración del sistema nervioso central y conocer con precisión la respuesta clínica a largo o muy largo plazo de estos pacientes.

En las formas del adulto las guías recomiendan iniciar el tratamiento si existen síntomas o signos exploratorios claros de debilidad muscular. El consorcio EPOC no recomienda iniciar el tratamiento en ausencia de debilidad muscular y compromiso respiratorio (CVF < 80%), además la monitorización de la respuesta al tratamiento deberá hacerse mediante pruebas de seguimiento que evalúen la función y fuerza muscular, la función pulmonar y escalas de calidad de vida diaria. En pacientes pre-sintomáticos aún no existe suficiente evidencia que respalde el uso de la TRE, las guías recomiendan un seguimiento clínico estricto.

Los estudios de seguimiento realizados tras la comercialización de la TRE han mostrado que la mayoría de los pacientes mejoran durante los primeros seis meses de tratamiento, se estabilizan a posteriori durante dos o tres años y a partir de ese momento pueden empeorar funcionalmente de forma lenta³⁹. Un estudio reciente que ha seguido a pacientes durante 10 años analizaba los resultados de la TRE en los últimos 10 años de experiencia, a pesar del tratamiento, la enfermedad sigue progresando y la respuesta varía entre los diferentes pacientes sin llegar a dilucidar por qué existe tanta variabilidad, en todo caso un inicio temprano del tratamiento es beneficioso y además, si se extrapolan los resultados obtenidos de estos dos estudios el resultado siempre era mejor a lo esperado si no hubieran recibido tratamiento^{40,41}.

Se ha analizado qué factores podrían estar relacionados con la estabilización o caída de la respuesta al tratamiento en pacientes con LOPD. Si bien no se conocen con exactitud los mecanismos, se ha apuntado la posibilidad de que la situación basal de la musculatura de los pacientes condicione la respuesta al medicamento. Se sugiere que grandes acúmulos de material autofágico en la fibra muscular podría limitar tanto el tráfico normal como el procesamiento de la rhAAG exógena, ya que parte de la enzima administrada quedaría atrapada en estas vacuolas y no podría llegar al lisosoma⁴². Otro factor importante en el músculo esquelético es

que la captación de rhAAG exógena está mediada principalmente por los receptores CI-MPR (Receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes), un tipo de receptor situado en la membrana de las fibras musculares que juega un papel importante en la internalización de las enzimas del medio extracelular a través de endocitosis. El músculo esquelético tiene menor número de CI-MPR en su superficie celular respecto a otros tejidos como el hígado, de modo que es más refractario al tratamiento, quedando la mayor parte de la rhAAG exógena retenida por el hígado ^{43,44}. Adicionalmente se ha observado que los preparados disponibles de alglucosidasa-alfa albergan niveles bajos de ligando M6P, disminuyendo más la efectividad de la TRE ⁴⁵.

De lo anteriormente expuesto se están investigando nuevas líneas de tratamiento. Un grupo importante de las mismas se centra en mejorar la captación y actividad de la rhAAG exógena a través de diferentes estrategias ⁴³. Por ejemplo, se ha intentado aportar mayor estabilidad a la molécula mediante chaperonas que retrasan la eliminación del enzima de la sangre periférica (Miglustat), probar nuevas vías de internalización de la rhAAG a través de receptores no dependientes de la vía M6P como la utilización del transportador de nucleósidos ENT-2 para acceder al citosol (fármaco VAL-1221) o incrementar los residuos M6P en la superficie de la molécula para que se una de forma más eficiente a los receptores de la membrana de las fibras musculares. Dentro de este marco dos terapias de nueva generación merecen ser comentadas con detalle: la nueva molécula de alfa-glucosidasa (avalglucosidasa, Nexvazyme®) y la nueva enzima conocida como cipaglicósida que ha sido desarrollada por la casa comercial Amicus y se administra con una chaperona (Miglustat).

La avalglucosidasa-alfa es una enzima rhAAG diseñada basándose en la estructura de alglucosidasa-alfa pero con una mayor número de residuos M6P en su superficie ⁴⁶. Los ensayos en modelos murinos mostraron mejoría de su unión con

CI-MPR y posterior captación por las fibras musculares esqueléticas y cardíacas, con una consiguiente mayor eliminación del glucógeno lisosomal, asociándose a una mejoría significativa en la función motora de los ratones de Pompe. Recientemente se publicaron los resultados del ensayo clínico fase tres multicéntrico e internacional COMET (NCT02782741) en pacientes con la forma de inicio tardío donde se comparó la efectividad y seguridad de la avalglucosidasa-alfa respecto a la alglucosidasa-alfa. Los resultados demostraron una mejoría leve de la función respiratoria y motora, así como menores efectos adversos, lo que podría sustentar la utilización de la nueva molécula en la clínica diaria, si bien son necesarios más datos de efectividad a largo plazo ⁴⁷.

Las chaperonas farmacológicas son moléculas de pequeño tamaño que interactúan con la proteína AAG estabilizando su estructura tridimensional, alargando su vida media. Estos fármacos pueden administrarse a pacientes con mutaciones misense que expresan una proteína mutada menos funcional evitando su degradación intracelular por lo que es posible que tengan alguna funcionalidad residual, pero al mismo tiempo pueden asociarse con una terapia enzimática convencional alargando la vida media de la enzima administrada ⁴⁸. Las dos chaperonas más conocidas son la 1-deoxinojirimicina (DNJ, AT2220) y la N-butildeoxinojirimicina (NB-DNJ, Miglustat). En el ensayo clínico fase tres multicéntrico e internacional en pacientes LOPD, PROPEL ⁴⁹ (NCT03729362) se comparó la efectividad y seguridad de la nueva enzima Cipaglucosidasa junto con el Miglustat con el tratamiento estándar alglucosidasa-alfa durante 52 semanas. Este estudio ha mostrado una mejoría de la función pulmonar y muscular en los pacientes que recibían la terapia combinada, si bien también son necesarios más datos de efectividad a largo plazo.

Finalmente, aparte de la terapia enzimática, se están probando nuevas terapias génicas. En la actualidad están en marcha al menos tres ensayos clínicos en pacientes LOPD, todos ellos utilizan adenovirus asociados como vectores virales.

El objetivo del tratamiento varía en función del órgano diana. En el músculo esquelético y cardíaco, el objetivo es que ambos tejidos expresen de nuevo una enzima funcionante. Por el contrario, en el hígado se pretende que libere de forma continua la enzima al torrente sanguíneo para así poder ser captada por él músculo. En la **tabla 1** se recogen los ensayos preclínicos y clínicos que están en marcha.⁵⁰

FASE PRECLINICA	FASE CLINICA	COMERCIALIZADA
AAV2/8 Gene Therapy delivered Ab-GAA (Regeneron)	AAV2/8 LSPhGAA liver-directed Gene Therapy (LOPD, Phase 1) Bayer/Actus/AskBIO (Actus-101) (NCT03533673)	Myozyme/Lumizyme (IOPD, LOPD) Genzyme (alglucosidase alfa)
AAV/Proprietary capsid Gene Therapy (Amicus)	AAV9 muscle-directed Gene Therapy w/immune modulation (LOPD, Phase 1) University of Florida (NCT02240407)	Nexviazyme (LOPD) Genzyme (avalglucosidase alfa)
AAV Gene Therapy (Sarepta-licensed from Lacerta)	AAV1/CMV-hGAA muscle-directed Gene Therapy (LOPD, Phase 1/2) University of Florida (NCT00976352)	
AAV/Proprietary capsid Gene Therapy (Abeona)	AAV8 liver-directed Gene Therapy (LOPD, Phase 1/2) Audentes (AT845) (NCT04174105)	
HSPC LV Gene Therapy (Erasmus MC)	AAV/Proprietary Rh74-derived capsid, liver-directed Gene Therapy (LOPD, Phase 1/2) Spark/Roche (SPK-3006) (NCT04093349)	
HSPC LV Gene Therapy AVR-RD-03 (AVROBIO)	Chaperone/ERT (IOPD/LOPD, Phase 3) Amicus (ATB200/AT2221) (NCT03729362)	
JR-162; IV (JCR Pharma) J-Brain Cargo platform to cross blood - brain barrier	Nexviazyme (IOPD, Phase 2) Genzyme (avalglucosidase alfa) (NCT03019406)	

Tabla 1: Terapias preclínicas, clínicas y productos comercializados para el tratamiento de la enfermedad de Pompe.

Las aplicaciones de terapia génica se encuentran en la fase de transición a la aplicación clínica. Los números de Clinicaltrials.gov aparecen en azul. **Ab:** anticuerpo; **AAV:** virus adeno-asociado; **CMV:** promotor de citomegalovirus; **HSPC:** células madre hematopoyéticas; **LV:** vector lentiviral; **ERT:** terapia de remplazo enzimático; **IOPD:** enfermedad de Pompe de inicio infantil; **LOPD:** enfermedad de Pompe de inicio tardío. **Amarillo:** producto ERT; **Gris:** terapia con chaperonas; **Naranja:** terapia génica AAV; **Azul:** terapia génica HSPC LV. *Tabla adaptada de Unnisa, et al*⁵⁰

1.1.7. Seguimiento

La valoración de la funcionalidad muscular en la clínica diaria y en ensayos clínicos se realiza por medio de un conjunto de pruebas recomendadas por la mayoría de las guías clínicas. El consorcio EPOC recomienda realizar un conjunto mínimo de pruebas con la finalidad de homogeneizar los resultados y que éstos puedan ser contrastados y compartidos en la comunidad científica. Las pruebas cubren

aspectos como la evaluación de la fuerza y funcionalidad muscular, la función pulmonar y escalas de calidad de vida⁵¹.

1.1.7.1. Fuerza muscular

Puede explorarse manualmente con la escala MRC (Medical Research Council) o bien utilizando un dinamómetro de mano o fijo. Los grupos musculares que deben explorarse son: cuello (extensores y flexores), hombro (abductores), codo (flexores y extensores), cadera (flexores, extensores, abductores y aductores) y en rodilla (flexores y extensores).

1.1.7.2. Función muscular

Se mide con tests cronometrados como la prueba de marcha de los 6 minutos (6MWT), el tiempo de caminar 10 metros (10MWT), el tiempo de subir cuatro escalones (Tup4), el tiempo de bajar 4 escalones (Tdo4), el tiempo de levantarse de la posición de decúbito supino y el tiempo de levantarse de una silla. La prueba 6MWT mide la distancia máxima que puede recorrer una persona sobre una superficie plana en un tiempo de 6 minutos, y aporta información sobre la resistencia y velocidad de la marcha. Es una prueba ampliamente utilizada en el seguimiento de pacientes con enfermedades neuromusculares.

1.1.7.3. Función pulmonar

Medida a través de espirometría convencional. Se mide la CVF en posición sentado y supino, valorando así la función diafragmática y la PIM y PEM que valoran la fuerza de los músculos inspiratorios y espiratorios.

1.1.7.4. Escalas de calidad de vida

Destaca el formulario R-PAct que se desarrolló específicamente para pacientes con EP, mide la capacidad de llevar a cabo actividades de la vida diaria. Otras escalas que se han utilizado son las escalas de calidad de vida EQ-5D y SF-36 o el formulario FSS que además mide el grado de fatiga.

Las pruebas antes descritas tienen como desventaja, que no son puramente objetivas ya que están influenciadas por factores como la motivación del paciente, la edad, el peso, la fatiga, la presencia de dolor además de ser pruebas operador dependiente ⁵². En los últimos años ha crecido la necesidad de encontrar nuevos marcadores de seguimiento más precisos ⁵³, uno de ellos que está ganando mucha popularidad es la resonancia magnética de la que hablaremos a continuación.

1.2. RESONANCIA MAGNÉTICA

La resonancia magnética (RM) es el proceso por el cual obtenemos una imagen aprovechando las propiedades magnéticas de los átomos de los tejidos. Entre 1940 a 1950 es cuando se registra el proceso de absorción y emisión de energía de los núcleos atómicos sometidos a un campo magnético, el resultado de este proceso recibió el apelativo de Resonancia Magnética Nuclear ⁵⁴. En 1980 dejó de utilizarse el término "nuclear" por la preocupación de que los pacientes pensaran que la técnica involucra radiaciones dañinas, prefiriendo referirse a ella como Imagen por Resonancia Magnética o MRI del inglés *Magnetic Resonance Imaging*.

1.2.1. Principios físicos

El fenómeno de resonancia es un proceso inducido y de breve duración que implica la liberación de energía (eco/señal) a través de la excitación controlada de una partícula ^{55,56}. Es importante conocer las bases físicas involucradas en la generación de esta señal y su comportamiento en diferentes tejidos para poder comprender su funcionamiento y su utilidad en el diagnóstico y seguimiento de las enfermedades neuromusculares.

1.2.1.1. Concepto de espín nuclear

El átomo está constituido por tres tipos de partículas: protones (carga positiva), neutrones (sin carga) y electrones (carga negativa). Los protones y neutrones forman parte del núcleo, mientras que los electrones orbitan en torno a él. No todos los átomos son útiles para generar la señal RM. Sólo aquellos átomos con un número impar de

protones tienen una propiedad intrínseca necesaria consistente en que sus núcleos giran sobre sí mismos siguiendo una dirección o eje. A este movimiento de rotación se conoce como "**Espín**" del inglés spinning y la dirección del eje sobre el cual giran está representado por un vector⁵⁷. Al tratarse de partículas cargadas y gracias al movimiento de espín, los átomos se comportan como cargas en movimiento, creando un campo electromagnético conocido como momento magnético (*Figura 3*).

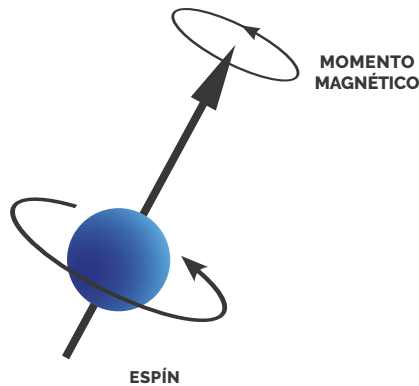


Figura 3: Representación gráfica del movimiento de rotación del átomo (espín) y de su momento magnético.

Por consiguiente, los átomos útiles para la MRI deben cumplir dos requisitos: tener la cualidad de espín y ser abundantes en los tejidos como por ejemplo el hidrógeno (^1H), Carbono (^{13}C), Sodio (^{23}Na) o Fósforo (^{31}P). El átomo de hidrógeno está constituido por un solo protón, tiene el momento magnético más fuerte lo que, unido a su abundancia en el cuerpo humano, hace que sea el elemento generalmente empleado. En adelante emplearemos el término espín y protón de ^1H como sinónimos.

1.2.1.2. Campo magnético y precesión

Una máquina de RM está dotada de un potente imán que genera de forma continua un campo magnético muy fuerte, cuya unidad de medida es el Tesla (T) gracias al nombre de su inventor Nikola Tesla. Por convenio a este campo magnético se le conoce como B_0 .

En condiciones normales los átomos de ^1H de nuestro cuerpo no tienen una orientación definida y su comportamiento es aleatorio. ¿Qué pasaría si introducimos una muestra de tejido dentro de la máquina de RM? Pues que el campo magnético B_0 produciría los siguientes fenómenos⁵⁸:

1. Los espines se alinearán con B_0 adoptando una de dos posibles orientaciones (*Figura 4*). **Paralelos** (estado de baja energía) si siguen la dirección del campo magnético **Antiparalelos** (estado de alta energía) si están orientados en sentido opuesto al campo magnético principal. Normalmente la mayoría de los espines serán paralelos.
2. Además del movimiento de espín, tras la aplicación de B_0 los protones de ^1H comenzarán a girar alrededor de dicho campo, a este nuevo movimiento de giro adicional se conoce como "**Precesión**". La frecuencia de precesión viene determinada por la ecuación de Larmor y es proporcional al campo magnético. Como se observa en la *figura 5*, el movimiento de precesión puede ser representado como un cono con dos ramas, una para los espines en **paralelo** y otra para los espines en **antiparalelo**.

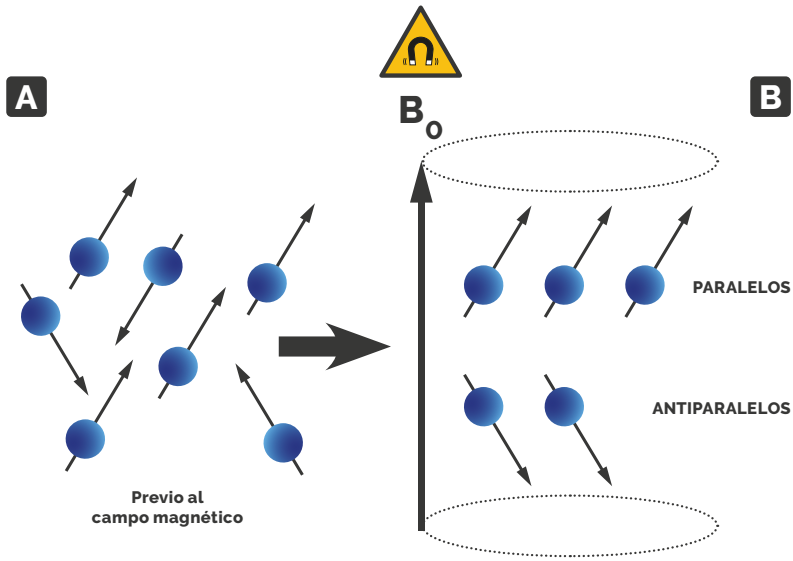


Figura 4: Dirección de un conjunto de espines.

A: antes del campo magnético y *B:* en presencia de un campo magnético externo, ubicándose en dos estados energéticos: paralelos y antiparalelos.

B_0 : representa el campo magnético de la máquina de RM.

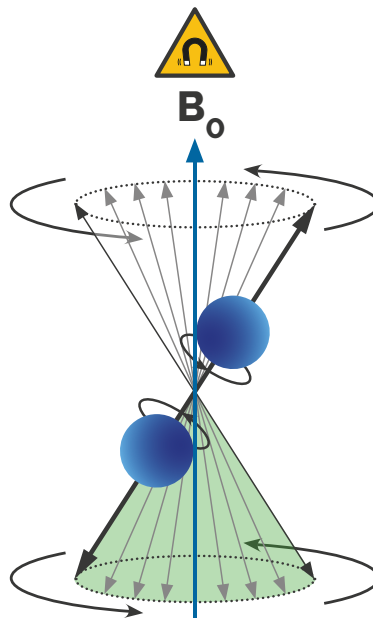


Figura 5: Esquema del movimiento de precesión de los espines en función del campo magnético B_0

Un espín puede cambiar de un estado de baja energía a un estado de alta energía mediante la absorción de un fotón suministrado por una fuente externa. La cantidad de energía necesaria del fotón debe ser igual a la diferencia de energía (ΔE) entre estas dos poblaciones de espines, esta diferencia es proporcional a la intensidad del campo magnético, a mayor campo magnético, mayor diferencia de los espines entre ambas poblaciones, ergo mayor energía y señal de RM (*Figura 6*).

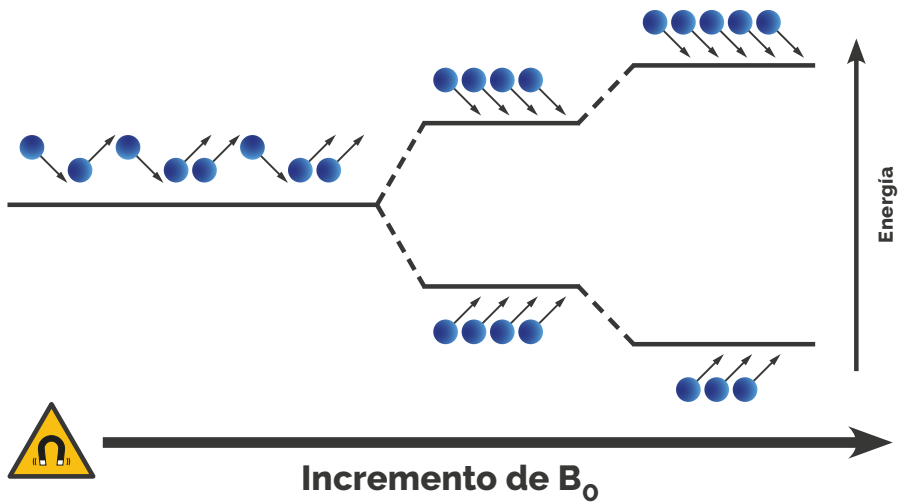


Figura 6: Interacción entre espines y campo magnético (B_0).

A mayor intensidad de B_0 , más espines cambian al estado de mayor energía.

Estado de baja energía: flecha hacia arriba. *Estado de alta energía:* flecha hacia abajo

1.2.1.3. Vector de magnetización neta (M)

En lugar de imaginarnos a los espines individualmente, es preferible pensar en ellos como un conjunto representado por el **vector de magnetización macroscópica neta (M)**. Cada espín en paralelo se anula con un antiparalelo y como normalmente existe un exceso de espines en el nivel de menor energía, el vector resultante se orientará siguiendo la dirección del campo magnético principal (B_0). Para entender el comportamiento de M es importante mirar su movimiento dentro de un sistema de coordenadas rotatorias: "x, y, z", representadas en la *figura 7*. Donde "z" es el eje longitudinal del cuerpo humano (cabeza a pies). "x, y" se orientan en el plano transversal, perpendicular a z.

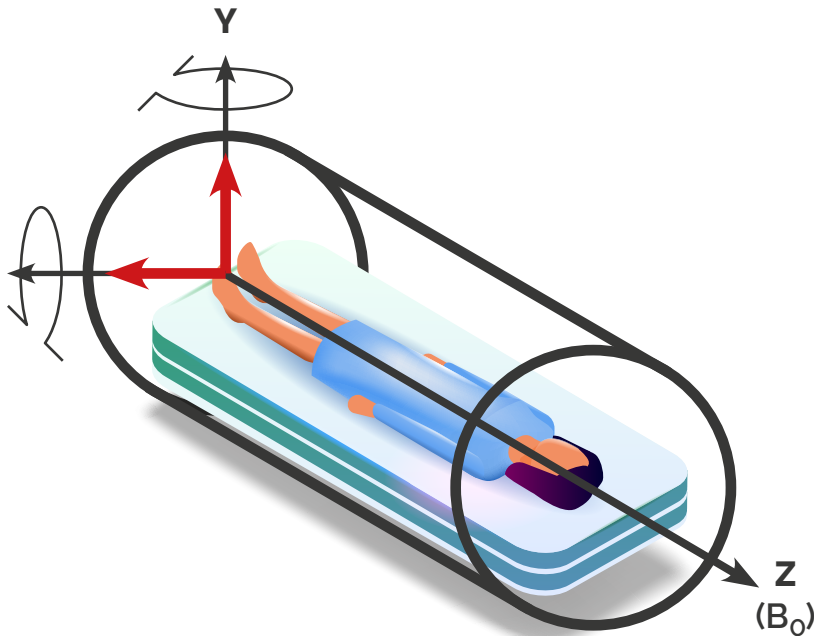


Figura 7: Sistema de coordenadas empleados en RM.

Por convenio z se alinea con el eje longitudinal del cuerpo, x, y con el eje transversal.

Ilustración modificada de Teravector

Durante el proceso de resonancia, M describe dos orientaciones principales. La primera sobre el plano longitudinal " z " llamado "**componente longitudinal o vector de magnetización longitudinal**" responsable de la señal T1. La segunda orientación es en los planos transversales " x, y " al que nos referiremos como "**componente transversal o vector de magnetización transversal**" responsable de la señal T2.

1.2.1.4. Pulso de radiofrecuencia – Flip angle

Para que se produzca la señal de resonancia es necesaria la aplicación de una fuente de energía externa capaz de desplazar al vector M fuera de su situación de equilibrio. Dicho proceso se consigue a través de los pulsos de radiofrecuencia (RF) que generan un campo magnético adicional transitorio, al que llamaremos B_1 . Durante la aplicación de este segundo campo magnético, el sistema de espines absorbe la energía necesaria para el desplazamiento de M .

El flip angle- (α) , representa los grados de inclinación que el vector M experimenta respecto a B_0 , mientras dura el pulso de radiofrecuencia.

1.2.1.5. Excitación y relajación nuclear

Tras la aplicación de RF el nuevo campo magnético B_1 excitará a los espines de nuestra muestra haciendo que comiencen a moverse siguiendo el sentido de B_1 , todos ellos a la misma velocidad (lo que se conoce como que entran en fase) y además algunos de ellos pasarán a un estado más energético. El resultado de ambos procesos será que M se inclina de un plano longitudinal a un plano transversal (**Figura 8**). Tras soltar el pulso de RF, los espines volverán a su estado menos energético y comenzarán a girar a velocidades diferentes entre ellos (se desfasan) y como consecuencia se reduce la componente transversal (T2) que no existía antes de la aplicación del pulso RF y la componente longitudinal (T1) vuelve a recuperarse, que era la única que existía antes del pulso de RF. El resultado final es la generación de un eco/señal necesario para la formación de la imagen. Tanto la relajación T1 como la relajación T2 acontecen simultáneamente, para una mejor comprensión es preferible describirlas por separado.

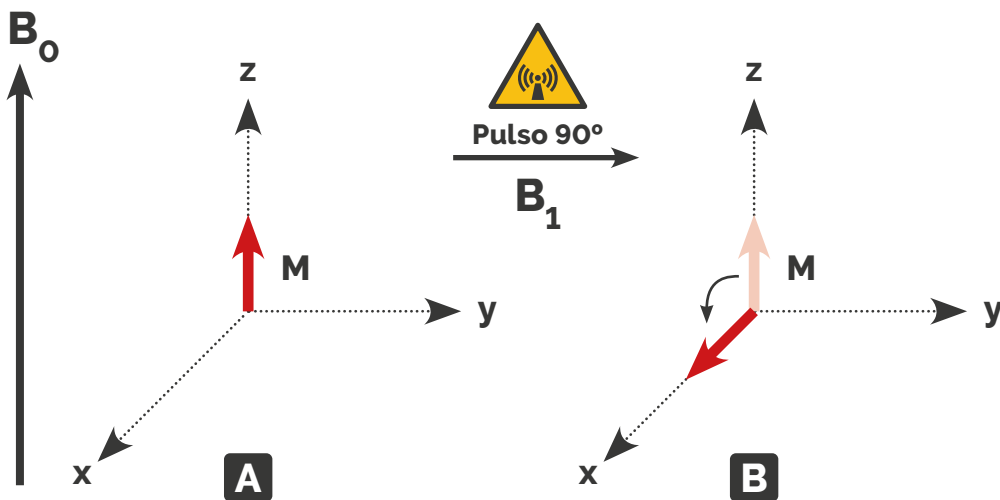


Figura 8: Representación del movimiento del vector magnetización neta (M).
A: previo al pulso de RF y **B:** después de su aplicación, obsérvese como M cambia su orientación a un plano transversal.

1.2.1.5.1. Relajación T1

La relajación T1 es el proceso por el cual la magnetización longitudinal crece/regresa a su valor máximo inicial, paralelo a B_0 . Gráficamente (**Figura 9**), T1 puede verse cómo el tiempo necesario para que el vector de magnetización longitudinal alcance el 63% de su valor máximo. Según el tipo de tejido que estudiemos, su valor puede ir desde unas décimas hasta varios segundos. Para la relajación T1 es necesaria la liberación de energía del sistema de espines previamente excitados, esta pérdida de energía es irre recuperable y representa la transferencia de magnetización entre los espines excitados y su entorno.

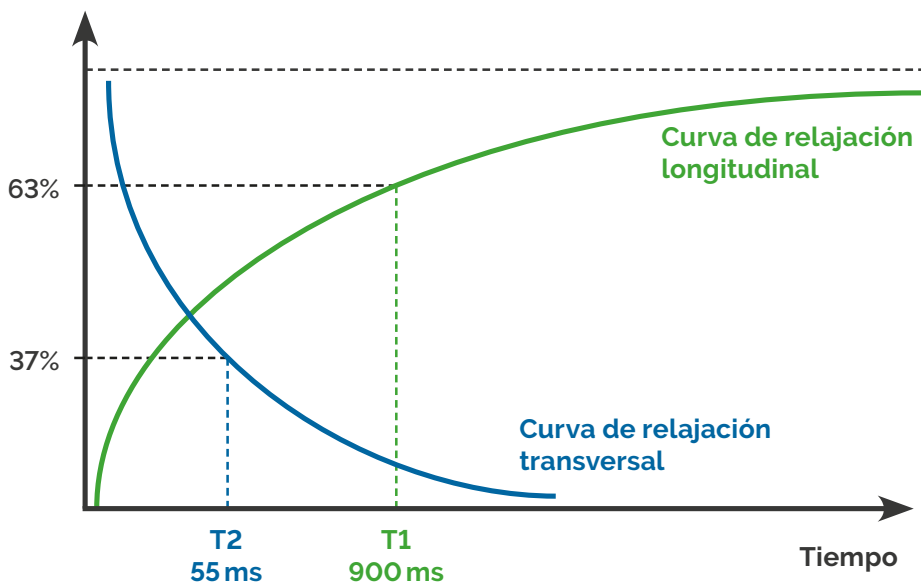


Figura 9: Representación gráfica del proceso de relajación longitudinal ($T1$) y transversal ($T2$) en función del tiempo.

Imagen adaptada de Elster, et al⁵⁹

1.2.1.5.2. Relajación T2

La relajación T2 es el tiempo necesario para que la magnetización transversal decaiga hasta aproximadamente el 37% de su valor inicial (**Figura 9**). Sus valores suelen ser mucho más cortos que T1, del orden de milisegundos. El barrido de esta magnetización transversal es la que induce una corriente en las bobinas receptoras de la máquina de RM, responsable de generar la señal.

1.2.1.6. FID y T_2^*

Se corresponden con la señal de RM y son representados en la *figura 10*.

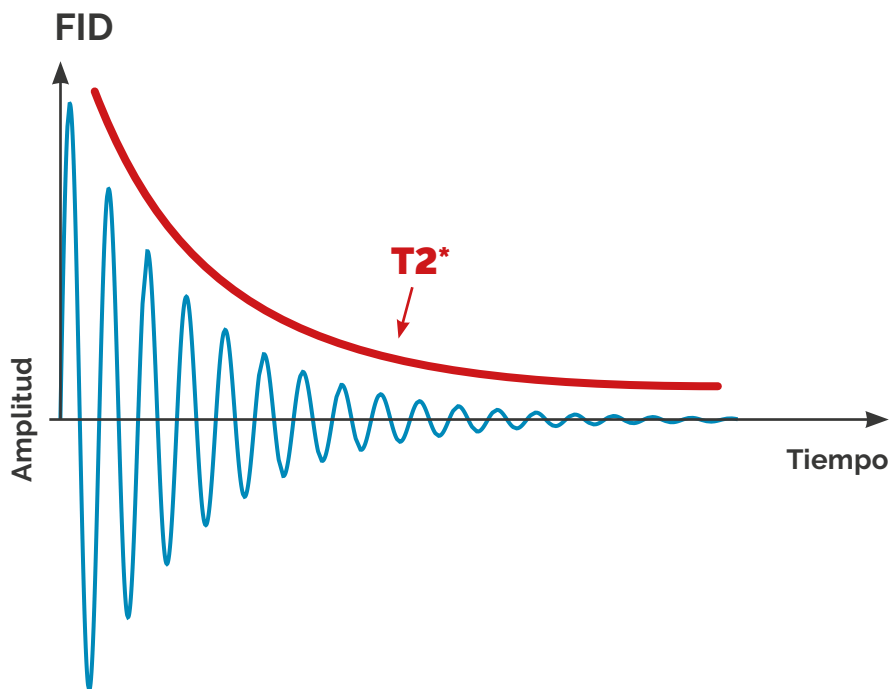


Figura 10: Representación gráfica de FID y T_2^* .

La señal FID tiene la forma de una sinusoidal que se atenúa en el el tiempo, gobernada por la constante T_2^* . *Imagen modificada de Blink, et al*⁵⁸.

La energía liberada durante la relajación tiene la forma de una sinusoidal y se conoce como FID (Free Induction Decay), gobernada por la constante T_2^* .

Como se describió previamente, T_2 representa el decaimiento de la magnetización transversal, sin embargo, en la realidad la magnetización transversal decae mucho más rápido de lo esperado ya sea por falta de homogeneidad del propio campo magnético como por las interacciones de los átomos a nivel intramolecular e intermolecular. El resultado es que los espines se desfazan más rápidamente de lo que podemos apreciar. Esta tasa de decaimiento de la señal T_2 se conoce como T_2^* .

1.2.1.7. Mecanismos responsables de la relajación T1-T2

Para que la magnetización longitudinal se recupere es necesario el flujo de energía desde los espines a su entorno. Los mecanismos implicados en la transferencia de esta energía son: la interacción dipolar, el desplazamiento químico, intercambio químico, traslación/difusión/flujo, acoplamiento-J y acoplamiento cuadrupolar ⁵⁹. Explicaremos brevemente la interacción dipolar y el desplazamiento e intercambio químico que son importantes en técnicas de RM, como la técnica Dixon, espectroscopia y transferencia de magnetización, entre otras.

1.2.1.7.1. Interacción dipolar

Si consideramos a los espines como partículas electromagnéticas y las comparamos con pequeños imanes con un polo norte y un polo sur (dipolo), la interacción entre sus campos magnéticos se conoce como interacción dipolo-dipolo (**Figura 11**). Si se da entre espines de la misma molécula (intramolecular) existe mejor transferencia de energía dada su cercanía en el espacio, mientras que si se da entre espines de diferentes moléculas o compartimentos (intermolecular) la interacción es más débil y por tanto la transferencia de energía es menor.

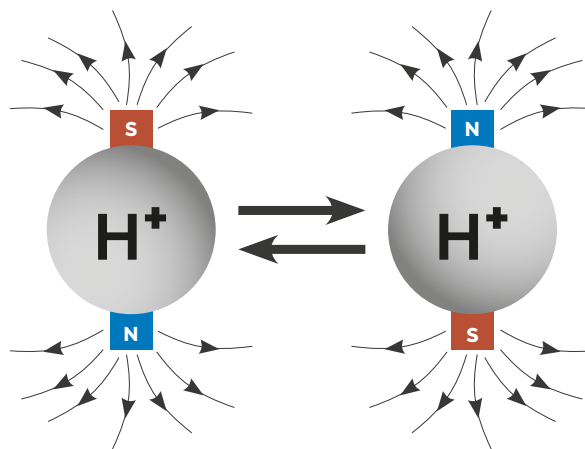


Figura 11: Representación gráfica de la interacción dipolar.

Ambos espines se comportan como pequeños imanes, sus campos magnéticos interactúan entre sí, de esta manera la energía fluye en ambas direcciones.

1.2.1.7.2. Desplazamiento químico (δ)

Se refiere a las diferencias de frecuencia en la resonancia del agua y de la grasa. Básicamente las nubes de electrones que rodean a los átomos de ^1H , los protegen en mayor o menor grado de la influencia del campo magnético (B_0). Como se esquematiza en la **figura 12**, en la molécula de agua, el oxígeno atrae nubes de electrones reduciendo las nubes de electrones alrededor de los átomos de ^1H , mientras que en la grasa los átomos de ^1H no se ven significativamente afectados. Cuanto menor sea la nube de electrones, mayor será la influencia de B_0 y por tanto la frecuencia de precesión también será mayor, por estos motivos la frecuencia de precesión es mayor en los átomos de ^1H del agua respecto al ^1H ligado a la grasa. El desplazamiento químico es la base de la espectroscopia y del método Dixon.

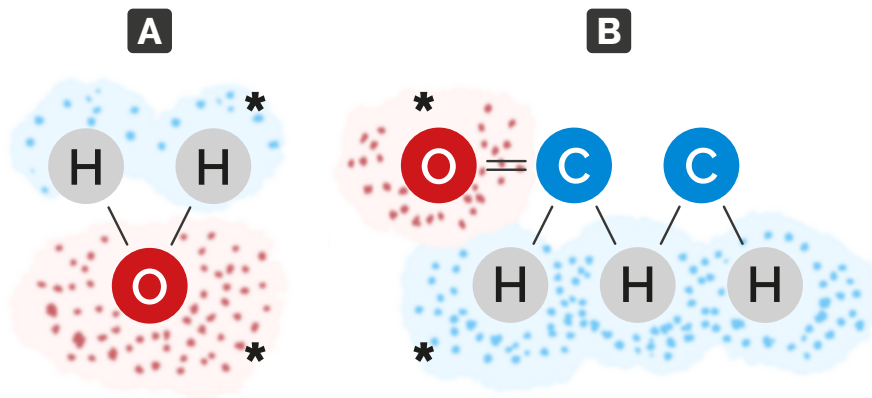


Figura 12: Esquema de una molécula de agua (A) y de grasa (B) con sus nubes de electrones representadas como áreas sombreadas (*). Las nubes de electrones protegen al núcleo de los efectos del campo magnético externo. La frecuencia de resonancia de los átomos de ^1H dependerá de la molécula en la que residan, a esto se conoce como desplazamiento químico.

1.2.1.7.3. Intercambio químico

Representa la transferencia de un protón de ^1H entre dos moléculas o compartimentos diferentes (**Figura 13**). El protón de ^1H cargado energéticamente por el pulso de RF se desplazará a otra molécula transfiriendo la energía para excitar a los protones vecinos. Este es uno de los mecanismos básicos en la técnica de transferencia de magnetización.

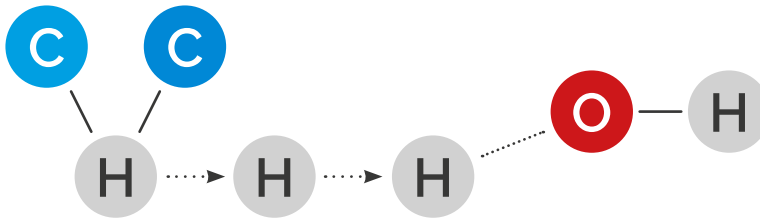


Figura 13: Los átomos de hidrógeno a menudo participan en procesos de intercambio químico, donde son transferidos físicamente de una molécula a otra.

Flecha punteada: representan la migración del átomo de hidrógeno.

1.2.1.8. Principales fuentes de la señal en MRI

La mayor parte de la señal en RM principalmente proviene de los protones de ^1H presentes en el agua y en los lípidos, en menor medida de proteínas de bajo peso molecular, pequeños aminoácidos y azúcares, entre otros. Finalmente, existe una última categoría que son las macromoléculas cuya contribución a la señal de RM es mínima.

1.2.1.8.1. Agua

Elemento más abundante en los tejidos, constituyendo la fuente más grande e importante de la señal. Se trata de una molécula de pequeño tamaño con una velocidad de precesión rápida, fácilmente influenciada por el campo magnético externo y como consecuencia es más efectiva para producir la relajación T1 y T2 cuyos valores suelen ser fácilmente detectables.

1.2.1.8.2. Lípidos

Los triglicéridos, los ésteres de colesterol y los ácidos grasos libres son en gran medida inmiscibles con el agua, existiendo en un estado semilíquido, con movimientos ligeramente restringidos que dan lugar a valores de T1 cortos (unos cientos de ms) y valores T2 de moderados a cortos (unas docenas de ms). Sin embargo, los fosfolípidos que conforman la vaina de mielina y de las membranas celulares tienen movimientos mucho más restringidos con valores de T2 inferiores a 1 ms.

1.2.1.8.3. Macromoléculas

En esta categoría se incluyen proteínas de alto peso molecular, ácidos nucleicos y polisacáridos como el glucógeno, que están presentes tanto a nivel intracelular como en los tejidos extracelulares como el colágeno^{60,61}. Todas las macromoléculas están conformadas por componentes que contienen ¹H. Cuando más grandes son estas moléculas más inmóviles se vuelven. Los protones de ¹H situados en las profundidades de las macromoléculas presentan movimientos muy restringidos y sus señales decaen tan rápidamente que pueden ser indetectables por los métodos "convencionales".

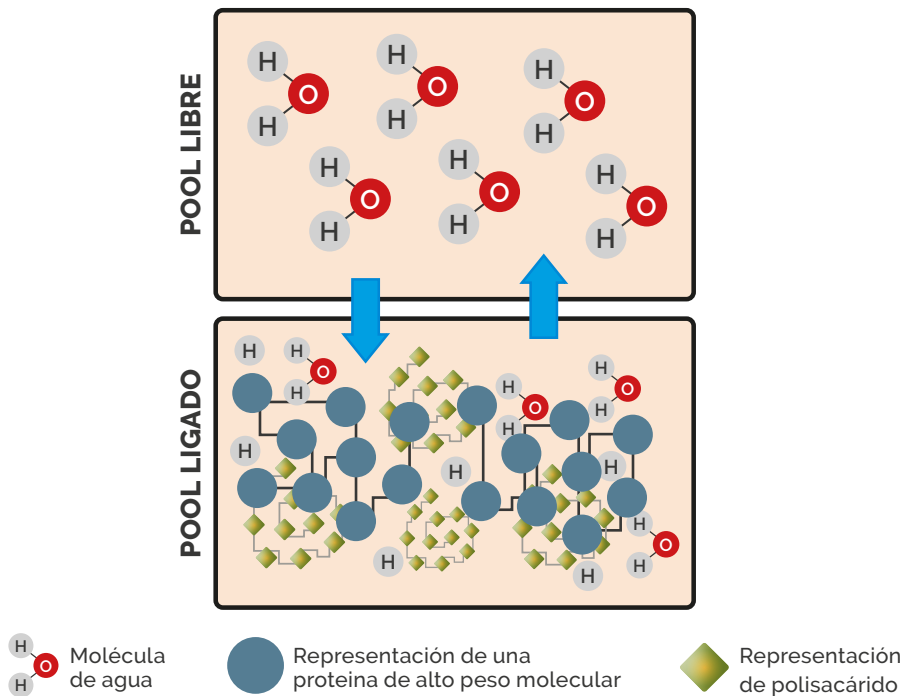


Figura 14. Esquema representativo de 2 compartimientos en tejidos no grasos.

Pool libre: compuesto principalmente por moléculas de agua libre, sus protones de ¹H forman enlaces transitorios entre ellos con intercambio rápido de energía.

Pool ligado: formado por macromoléculas como grandes proteínas y polisacáridos. Las moléculas de agua entre sus hendiduras así como los protones de ¹H unidos a macromoléculas experimentan restricción de movimiento y por ello generan tiempos de T2 muy cortos que no son medibles en secuencias rutinarias de RM.

La transferencia de energía fluye en ambos sentidos.

1.2.1.9. *Transferencia de magnetización (TM)*

Para comprender la TM tenemos que imaginarnos que, en los tejidos no grasos los protones de ^1H están distribuidos en dos compartimientos principales (*Figura 14*).

1) Agua libre: constituida principalmente por moléculas de agua no estructurada donde los átomos ^1H forman enlaces transitorios entre ellos. **2) Macromoléculas:** formado por proteínas, polisacáridos de gran tamaño y algunos lípidos con valores de T_2 ultracortos (<1 ms) por lo que no pueden ser detectados por RM convencional que utilizan tiempos de eco mayores a 1 ms⁶². Las moléculas de agua ligadas a estas macromoléculas o situadas entre sus hendiduras también mostrarán restricción de movimiento.

En adelante nos referiremos al compartimiento de agua libre como "pool-libre" mientras que al compartimiento formado por macromoléculas y agua ligadas a ellas lo llamaremos "pool-ligado".

Durante la fase de relajación en RM, los protones de ^1H cargados energéticamente transfieren su energía a los protones vecinos, en este caso protones no excitados que están tanto en el pool-libre como en el pool-ligado, excitándolos. A este flujo de energía entre compartimientos se le conoce como TM. Los mecanismos implicados en el proceso de intercambio de magnetización se dan a través de interacciones dipolares e intercambio químico⁶³ (*Figura 15*).

Aunque solemos visualizar la TM siguiendo el sentido pool-libre → pool-ligado, el sentido de flujo de energía podría invertirse aplicando un pulso especial de RF.

Como la señal del pool-ligado no es detectada de forma rutinaria, podemos potenciar su señal a través de la excitación directa de sus protones de ^1H por medio de un pulso especial de RF ó pulso de TM, que tiene una frecuencia alejada de la frecuencia de Larmor del agua libre, por lo que las moléculas del agua libre no serán

directamente excitadas. Como se observa en la **figura 16**, en estas condiciones la magnetización acumulada en el pool ligado se transferirá al pool-libre y viceversa, intercambiándose, el resultado será que la señal del pool-libre desciende apreciablemente. Esta pérdida de señal es la responsable de generar un contraste en la imagen de RM llamado contraste por transferencia de magnetización (CTM) ^{64,65,66}.

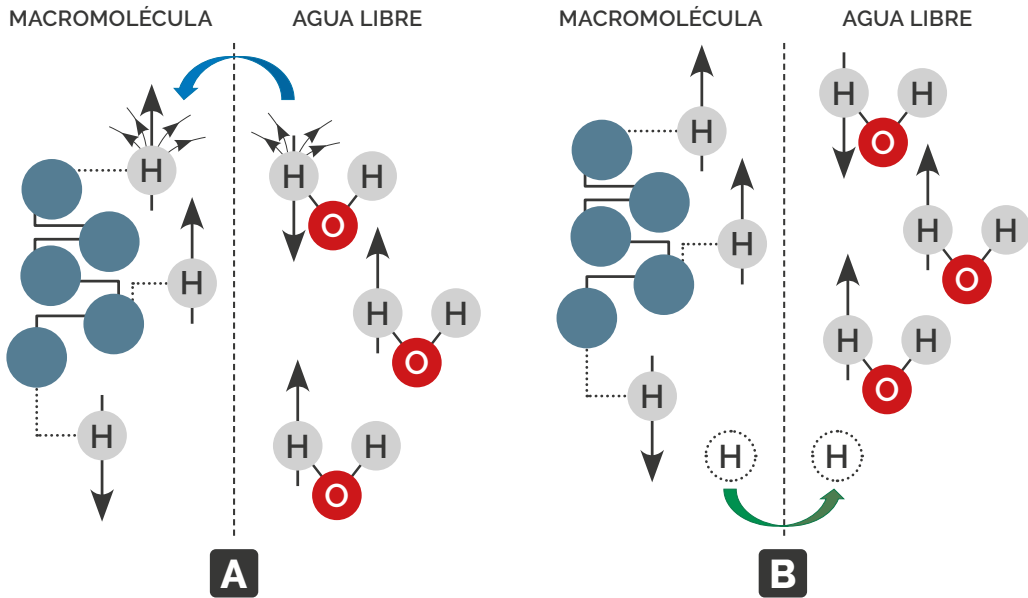


Figura 15: Esquematación de los mecanismos de intercambio de TM entre dos compartimentos:

A: Interacción dipolo-dipolo (*flecha azul*). Mientras más cercanos mayor intercambio de energía. **B:** Intercambio químico (*flecha verde*), implica la migración de un átomo de ¹H entre dos moléculas ó compartimentos.

1.2.1.10. Gradientes de Campo Magnético

Son bobinas conductoras orientadas en los tres ejes del espacio de la máquina de RM. Cuando la corriente eléctrica pasa por estas bobinas crea un campo magnético secundario llamado "campo de gradiente" que distorsiona el campo magnético principal. Existen tres campos de gradiente, gracias a los cuales la máquina será capaz de identificar de dónde viene la señal y generar la imagen que podemos observar con esta técnica ⁶⁷. También son fundamentales en una amplia gama de estudios especiales como la angiografía, difusión y perfusión.

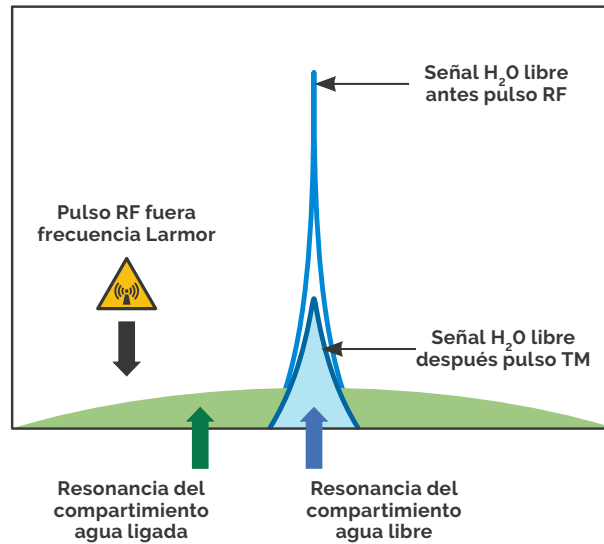


Figura 16: Señal del agua libre y macromoléculas, antes y después de la aplicación de RF. La señal de los protones de agua libre se identifica como un pico diferenciado en el espectro de RM. La señal de los protones unidos a macromoléculas resulta invisible y se representa como una curva ancha y de poca amplitud. Tras estimular directamente a los protones unidos a macromoléculas se observa un decaimiento de la señal de los protones de agua libre. *Imagen modificada, De Boer, et al*⁶³

1.2.2. Técnicas de adquisición en resonancia magnética

Describiremos las técnicas más comúnmente empleadas en el estudio de las miopatías hereditarias y las dividiremos en técnicas convencionales y técnicas especiales.

1.2.2.1. TR y TE

Son parámetros básicos de una secuencia de RM (*Figura 17*):

El tiempo de eco (TE) representa el tiempo desde el centro del pulso de RF hasta el centro del eco y se relaciona con la relajación T₂. El tiempo de repetición (TR) es la longitud de tiempo entre dos pulsos de RF, se relaciona con la relajación T₁. Modificando los TE y TR podremos obtener una imagen con un predominio de señal T₁ o señal T₂ lo que se conoce como potenciación.

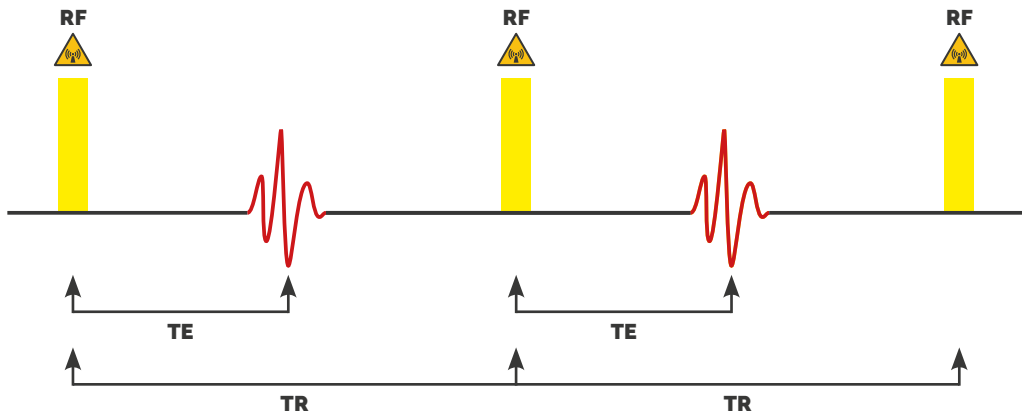


Figura 17: Diagrama de los principales parámetros empleados en una secuencia de RM.
TE: tiempo de eco. *TR:* tiempo de repetición. *RF:* pulso de radiofrecuencia.

1.2.2.2. Técnicas convencionales

1.2.2.2.1. Spin-echo (SE)

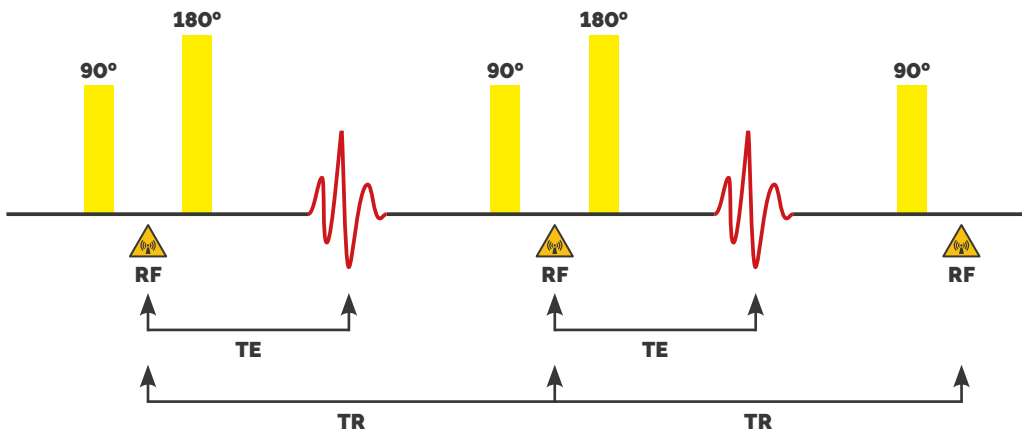


Figura 18: Representación de una secuencia Spin Echo. Cada ciclo comienza con la aplicación de un pulso de 90° seguido de un pulso de 180° para obtener un eco.
TE: representa el tiempo entre el primer pulso de RF (90°) y la obtención de la señal.
TR: tiempo entre dos pulsos de 90°.

En la *figura 18* se observa una secuencia SE. Comienza con un pulso de RF de 90° que hará que el vector de magnetización (M) gire al plano transversal "x"; sin embargo, por la falta de homogeneidad del campo magnético nuestra señal será deficiente y por este motivo aplicamos a un segundo pulso de 180° para obtener un eco. Si queremos obtener otro eco volvemos a repetir la secuencia 90°-180°.

Son secuencias lentas, que necesitan mucho tiempo de adquisición, por lo que en la actualidad quedan limitadas a situaciones específicas.

1.2.2.2.2. Fast (Turbo) Spin echo (TSE)

Las secuencias TSE son rápidas y comúnmente empleadas en la práctica diaria. Consisten en la aplicación inicial de un pulso de RF de 90° , añadiendo a continuación otro pulso de 180° que es seguido de otro pulso de 180° y así sucesivamente hasta volver a comenzar un nuevo ciclo con un pulso de 90° . Cada uno de estos pulsos de 180° genera un eco (*Figura 19*). El número de pulsos de 180° seguidos se conoce con el nombre de "Echo Train Length (ETL) o Factor Turbo (FT)" que sirve para reducir el tiempo de adquisición y no para potenciar una imagen. Habitualmente para una potenciación en T1 se usa factor turbo entre 2-4 y para una potenciación en T2 debido a su TR largo se usa un factor turbo entre 16-32.

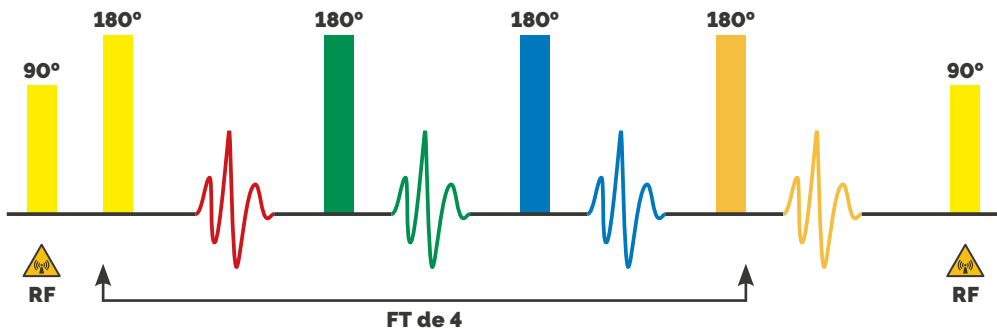


Figura 19: Representación gráfica de la secuencia Fast Turbo Spin Echo con un factor turbo de 4 obteniendo así 4 ecos. Tras cada pulso de 180° la señal se va debilitando

1.2.2.2.3. Gradient Echo- GRE

En las secuencias GRE habitualmente se emplea un flip-angle bajo y TR cortos. Con un solo pulso de RF podemos obtener más ecos ya que el flip-angle es inferior a 90° permitiendo que la magnetización longitudinal se recupere más rápido. La combinación de TE y TR cortos permiten una adquisición muy rápida de la señal y por este motivo las secuencias GRE constituyen la base de la mayoría de las técnicas de imagen rápida como en estudios con apneas, estudios dinámicos ó 3D.

En la *figura 20* podemos observar la representación de una secuencia GRE en la cual tras la aplicación de un pulso de RF de 90° comienza el desfase de la magnetización, posteriormente aplicamos un gradiente en un sentido (rephasing) y en sentido contrario (dephasing), consiguiendo así estabilizar la magnetización y generando varios ecos.

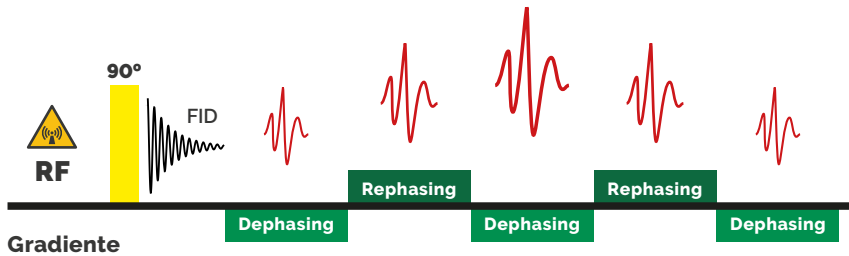


Figura 20: Esquema de una secuencia eco de Gradiente.

Pulso inicial de 90° comienza el caimiento de la FID, para volver a excitarlos aplicamos varios pulsos de gradientes (*rectángulo verde*).

1.2.2.4. Inversion recovery pulse sequences: STIR-FLAIR

Se basan en los tiempos de relajación longitudinal (T_1) y sirven para anular selectivamente la señal de algunos tejidos (por ejemplo, grasa ó líquidos). Básicamente son variantes de las secuencias SE ó TSE precedidos por un pulso de RF de 180° . Este primer pulso de 180° invierte M al plano longitudinal ($-z$). A continuación, los espines comienzan a relajarse para intentar volver al estado de equilibrio ($+z$) y la magnetización longitudinal sigue una curva exponencial diferente para cada tejido. En la *figura 21*, se representan las curvas de relajación de la grasa y del líquido cefalorraquídeo (LCR). Durante este proceso la curva de relajación pasa por un "punto nulo" donde aplicamos un pulso de 90° y conseguimos anular la señal del tejido deseado.

El tiempo transcurrido entre el pulso inicial de 180° y el de 90° se conoce como **tiempo de inversión (TI)**. Si el TI es corto, anulamos la señal de los tejidos con un T_1 corto (ejemplo, grasa), el resultado será una secuencia STIR (Short-TI Inversion Recovery). Si el TI es largo se anula la señal de los tejidos que tienen un T_1 largo (ejemplo los líquidos), entonces obtendremos una secuencia FLAIR (Fluid-Attenuated Inversion Recovery).

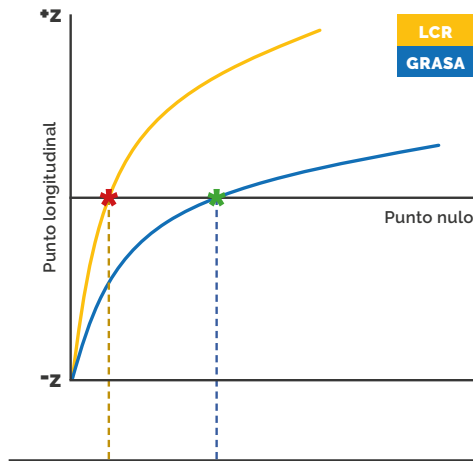


Figura 21: Esquematación de las curvas de relajación longitudinal de la grasa y del líquido cefalorraquídeo (LCR). El **asterisco en rojo** marca el punto cero de la grasa (T1 corto). El **asterisco verde** marca el punto cero del LCR (T1 largo).

Al interpretar la secuencia STIR deberemos ser cautos, puesto que, no sólo la señal de la grasa es la que se suprime, sino también de todos aquellos tejidos que tengan T1 cortos (en rangos similares a la grasa) como es el caso de la melanina, la sangre, tejidos con alto componente en proteínas. En la **figura 22** se muestra un ejemplo de una imagen STIR del muslo.

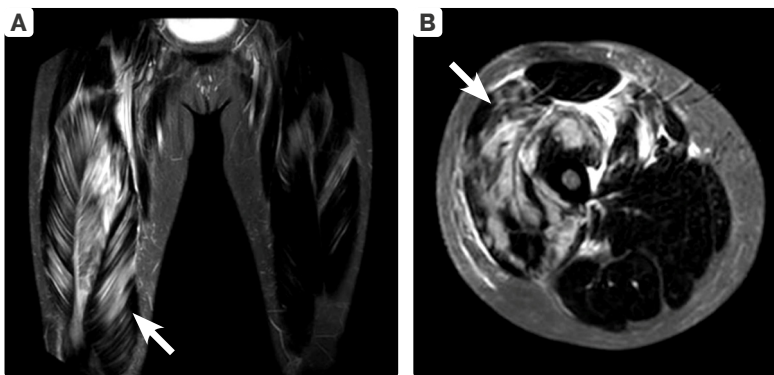


Figura 22: Secuencia STIR de los muslos de un paciente con miopatía inflamatoria. **A:** plano coronal; **B:** plano transversal. La supresión de la grasa de fondo permite observar un aumento difuso de la intensidad de la señal de los músculos cuádriceps correspondiente a edema. El edema se dispone entre las miofibrillas dando un aspecto fascicular (**flecha blanca**)

1.2.2.3. Técnicas especiales

Desde un punto de vista práctico podemos referirnos a ellas como técnicas cuantitativas, puesto que tienen la ventaja de poder cuantificar de forma precisa los cambios de señal, a diferencia de las técnicas convencionales donde las estimaciones se hacen mediante escalas visuales (métodos semicuantitativos).

1.2.2.3.1. Técnica Dixon

El método Dixon en honor a su descubridor Thomas Dixon, aprovecha el desplazamiento químico del agua y grasa. Sobre la base de una secuencia GRE este método añade ciclos de tiempo en los cuales los vectores de magnetización de la grasa y el agua rotan uno respecto al otro, estando alternativamente en fase (apuntando a la misma dirección) y fuera de fase (apuntan en direcciones contrarias)⁶⁸, los datos obtenidos pueden combinarse para generar un conjunto de 4 imágenes con contrastes diferentes, como se puede observar en la *figura 23*.

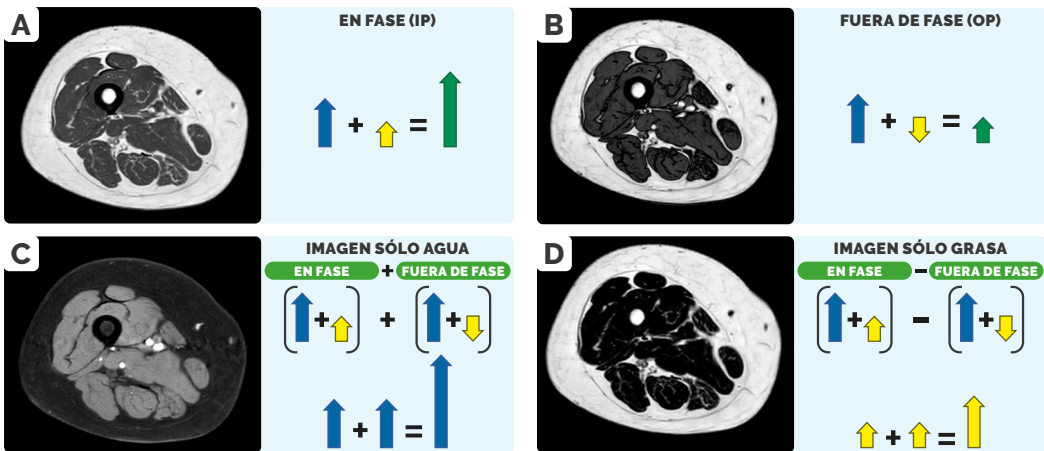


Figura 23: Proyección transversal del muslo, utilizando una secuencia 2 punto-Dixon. Obsérvese los 4 tipo de imágenes resultantes. **A:** La imagen en fase se obtiene de la suma de la señal de la grasa y agua. Es la equivalente a una secuencia convencional (T1w). **B:** La imagen fuera de fase se obtiene de la diferencia de las señales de grasa y agua. **C:** Imagen sólo agua: suma de las señales en fase y fuera de fase. **D:** Imagen sólo grasa: diferencia de la señal en fase y fuera de fase.

*Imagen modificada de Santos, et al*⁶⁸

Una de las aplicaciones más importantes del método Dixon y que forma parte del primer objetivo de la presente tesis, es la capacidad de detectar y cuantificar la grasa microscópica en los tejidos. Este método supone un sistema simplificado de dos componentes en el que la señal de RM observada es la suma de dos fuentes de señal: protones de la grasa y protones del agua. En una secuencia 2 punto-Dixon las imágenes se adquieren con dos tiempos de eco (TEs) en los que se asume que los protones del agua y grasa estarán exactamente en fase (IP) o fuera de fase (OP). Si los TEs empleados son cortos en relación con el T2* del tejido estudiado, supongamos el músculo esquelético, se asume que el decaimiento de T2* es despreciable y toda la variación de la señal que será recogida en los TEs se deberá a la interferencia de los protones de agua y grasa.

Basándonos en lo antes descrito la imagen IP es simplemente la suma de las señales de agua y grasa expresada mediante la fórmula:

$$S_1 \approx (IP + OP) / 2$$

La imagen OP es la diferencia entre las señales de agua y grasa:

$$S_2 \approx (IP - OP) / 2$$

Donde S1 representa el agua (Water) y S2 representa la grasa (Fat). De la combinación de ambas podemos obtener el coeficiente de fracción de grasa (Fat- Fraction, FF)

$$\frac{FAT}{Fat + Water}$$

La estimación de FF además de ser sensible a la relajación de T2*, también es sensible a los efectos de la relajación de T1, lo que introduce una dependencia de los parámetros de TR y flip-angle que pueden incrementar la señal de grasa y por tanto la FF. La grasa tiene un TR corto y si empleamos TR cortos no dejaríamos tiempo suficiente para que se relajen otros componentes del tejido. Para minimizar la amplificación de la ponderación T1, se debe utilizar un TR largo o un ángulo de

flip bajo, de modo que se pueda suponer una recuperación completa de T1 entre excitaciones sucesivas⁶⁹.

1.2.2.3.2. *Contraste de Transferencia de Magnetización*

El CTM es el resultado de observar selectivamente la interacción entre los protones del agua libre y los protones de ¹H ligados a macromoléculas. Este efecto puede cuantificarse mediante la obtención de una tasa de transferencia de magnetización, que representaría una medida indirecta de la señal del compartimiento macromolecular.

El efecto de TM puede ser aplicado a cualquier secuencia, en función de lo que deseemos estudiar. Para tales propósitos se generan dos conjuntos de imágenes: una con un pulso de TM (alejado de la frecuencia de Larmor) y otro conjunto de imágenes sin él, la diferencia entre ambas imágenes es el valor de MTR (Magnetic Transfer Ratio)⁷⁰. Entonces MTR puede expresarse mediante la ecuación:

$$\text{MTR} = \text{Mo} - \text{M Sat} / \text{Mo}$$

Mo: magnitud de la señal del tejido antes del pulso de TM

M Sat: es la señal después de aplicar el pulso de TM

Para comprender mejor este fenómeno, en la *figura 24* se representa un tejido con dos compartimientos (pool ligado, pool libre). En A previo al pulso TM el pool libre está constituido por 4 moléculas de agua con 4 espines responsables de la señal, y un pool-ligado con 3 espines unidos a macromoléculas que no contribuyen a la señal y por consiguiente, no existe contraste entre ambos compartimientos (D). A continuación, en la imagen B se aplica un pulso de TM a las macromoléculas sin afectar a los cuatro espines del pool-libre e inmediatamente puede observarse la transferencia de magnetización desde el pool-ligado al libre, principalmente a través de interacciones dipolares e intercambio químico. Al mantener el pulso de TM en el pool-ligado vemos que se genera una nueva situación de equilibrio en donde la relajación de T1_(sat) se acorta respecto al T1 normal y se crea el contraste de imagen (C y E).

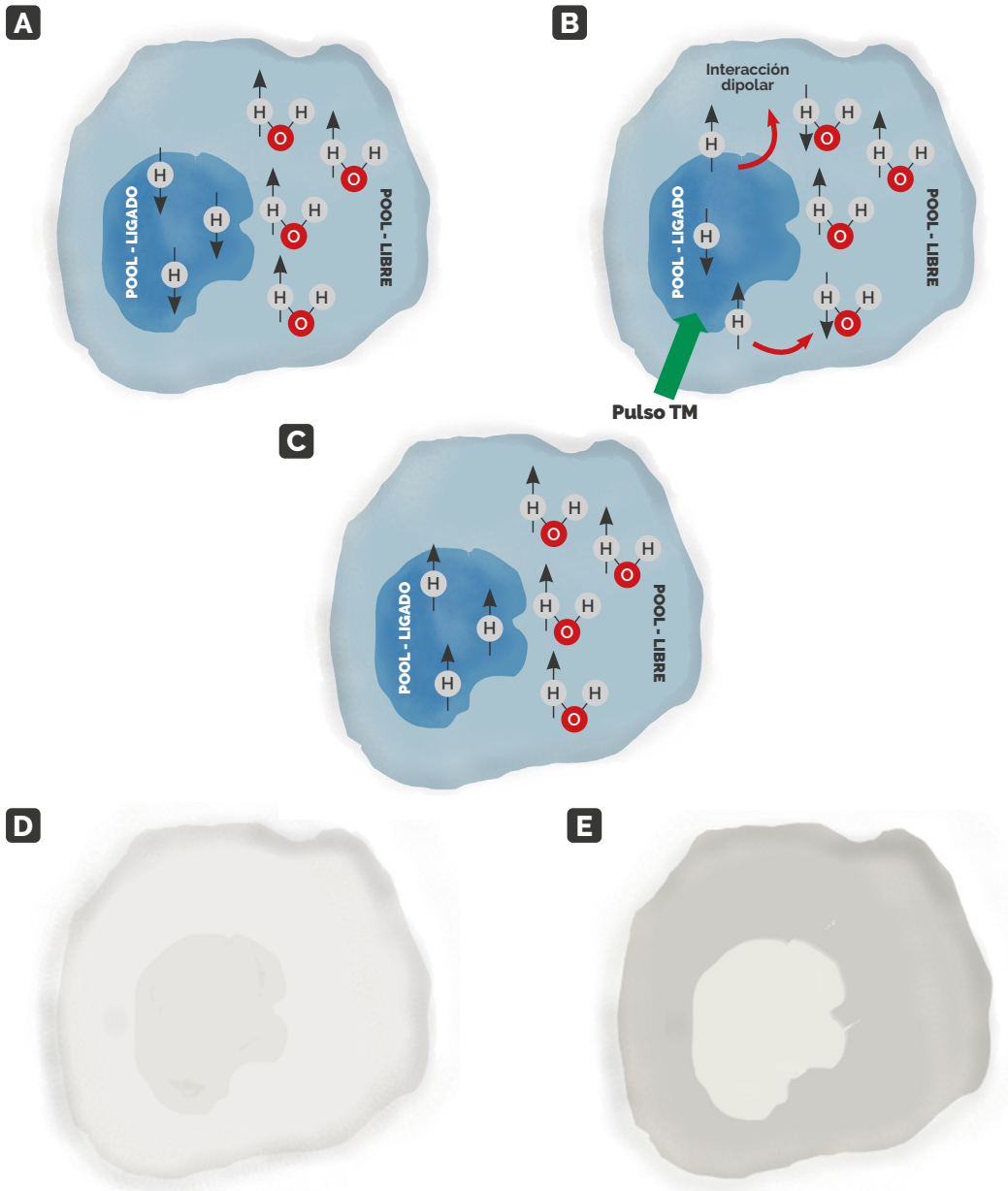


Figura 24: Modelo de generación de una imagen mediante el pulso de TM.
A y D: Imagen gobernada por la señal de los espinos del pool libre. Los espinos del pool ligado, no son medibles y por tanto no existe contraste entre ambos compartimientos. **B:** Excitación específica de los espinos del pool ligado que comienzan a intercambiar energía con el pool libre haciendo que su señal decaiga respecto al inicio, generando un contraste entre ambos compartimientos (**C, E**)

Imagen modificada de, De Boer, et al⁶³

1.2.2.3.3. *Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS)*

La espectroscopia busca analizar la composición química de los tejidos en un número de vóxels más reducidos, como consecuencia puede detectar pequeños metabolitos existentes en concentraciones milimolares (mM). Gracias al fenómeno de desplazamiento químico (δ), estos metabolitos pueden diferenciarse porque resuenan a frecuencias diferentes en función del medio en el que se encuentran. Así obtenemos una tabla con valores espectrales que representan las diferentes moléculas que conforman el tejido que estamos estudiando. Gracias a esta técnica podemos estudiar diferentes metabolitos además del ^1H como es el caso de ^{31}P o ^{13}C . La MRS de ^{13}C es la técnica de referencia para la medición de glucógeno en tejidos vivos.

1.2.2.3.4. *Glyco-CEST y NEOCEST.*

Son dos técnicas específicas dedicadas a la detección de glucógeno tisular mediante RM, ofrecen la posibilidad de monitorizar el metabolismo del glucógeno mediante métodos no invasivos.

La secuencia Glyco-CEST (Chemical exchange saturation transfer -CEST). Comparte similitudes con la imagen de TM. Consiste en la aplicación de un pulso de RF (con una frecuencia diferente del agua libre) dirigido específicamente a los protones de ^1H ligados a la molécula de glucógeno, los cuales absorben energía y la transfieren con bastante rapidez a los protones de ^1H del agua libre saturándolos. Si aplicamos este pulso durante un tiempo suficiente tendremos mayor saturación y por tanto mayor disminución de la señal del agua libre, al igual que en la TM, la transferencia de energía se da por intercambio químico y por interacciones dipolares^{71,72}.

La secuencia NEO-CEST es parte de la Espectroscopia por Resonancia magnética y se basa en el efecto de potenciación nuclear de Overhauser (NOE) llamado así en honor a su descubridor Albert Overhauser. Mediante esta técnica es posible

potenciar la intensidad de la señal de un protón sin estimularlo directamente, más bien, estimulando a su protón vecino⁷³.

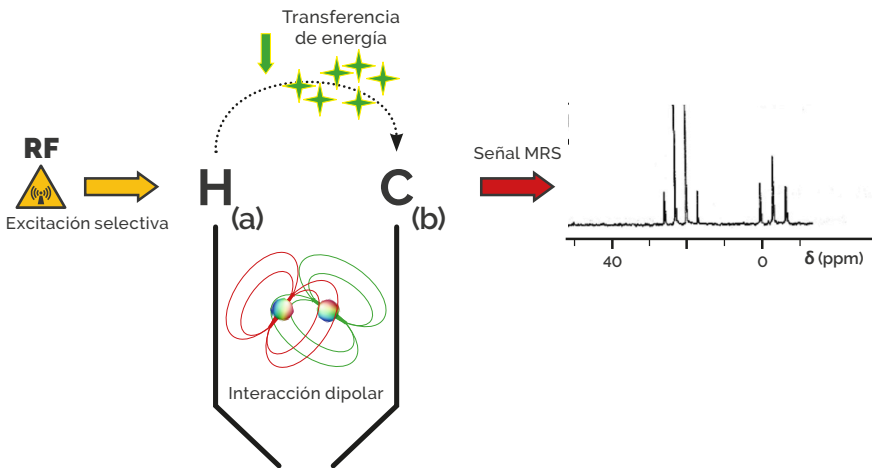


Figura 25: Diagrama que representa la potenciación nuclear de Overhauser entre dos átomos de un hipotético tejido.

H: átomo de hidrógeno; **C:** átomo de carbono; Véase como es posible obtener una señal de espectroscopia del carbono (**b**) a partir de la excitación del hidrógeno (**a**). El mecanismo de transferencia de energía implicado es la interacción dipolo-dipolo.

Imagen adaptada de Elster, et al⁵⁹

En la **figura 25** tenemos un hipotético modelo de una molécula con dos protones muy próximos entre sí, un átomo de Hidrógeno (**a**) y un átomo de Carbono (**b**). El fenómeno de NOE consiste en potenciar y recoger la señal del átomo de carbono a través de la excitación directa del átomo de Hidrógeno vecino. Este átomo de hidrógeno previamente excitado transmitirá su energía al átomo de carbono saturándolo y será visible en el espectro de RM. La transferencia de energía se realiza mediante interacción dipolar, por tanto, cuanto mayor sea la cercanía entre los átomos estudiados, mejor transferencia de energía y en consecuencia mayor potenciación de la señal. Podríamos invertir la potenciación, es decir estimular al átomo de carbono y mientras tanto obtener señal del átomo de hidrógeno, pero como la cantidad de átomos de carbono presentes en un tejido es sustancialmente menor, el efecto resultante no será significativo. La técnica NOE también puede ser aplicada a otros átomos sensibles a la RM.

1.2.3. Aplicaciones clínicas la RM en la enfermedad de Pompe

En las enfermedades neuromusculares la RM se utiliza principalmente en el diagnóstico, para guiar el estudio genético. Las técnicas convencionales identifican de forma no invasiva cambios en la estructura de los músculos esqueléticos como puede ser: atrofia, hipertrofia, edema y sustitución grasa. En la enfermedad de Pompe de inicio tardío, los cambios estructurales más relevantes son la sustitución grasa y el incremento del contenido de agua intramuscular^{74,75}.

La sustitución grasa muscular puede ser fácilmente identificada en secuencias T1w (SE,TSE) al observar el contraste que existe entre la señal del músculo y la grasa. El músculo es hipointenso, a diferencia de la grasa que es hiperintensa.

El protocolo básico de RM de cuerpo entero, normalmente incluye una secuencia T1w más una secuencia sensible al líquido con supresión grasa como el T2 Fat-Sat ó STIR⁷⁶. La obtención de imágenes de todo el cuerpo ha ayudado a comprender que la sustitución grasa no es uniforme, no todos los músculos se afectan de la misma forma ni al mismo tiempo. El grado de compromiso muscular es muy variable dentro de las diferentes miopatías e incluso dentro de un mismo paciente⁷⁷⁻⁷⁹.

Se han realizado varios estudios en pacientes con LOPD mediante secuencias convencionales T1w SE-TSE. Gracias a estos estudios se identificó patrón de sustitución por tejido graso que puede ser considerado característico de EP. Los músculos más frecuentemente infiltrados por grasa son: la lengua, el subescapular, el dorsal ancho, los músculos de la pared abdominal, los músculos paravertebrales, el músculo psoas, los glúteos, el aductor mayor, el semimembranoso y el vasto intermedio. El vasto lateral y el resto de los músculos del muslo están poco infiltrados o se afectan más tardíamente. Por otro lado, los músculos por debajo de la rodilla y los músculos de las extremidades superiores se encuentran respetados hasta estadios muy avanzados de la enfermedad⁸⁰⁻⁸³. La **figura 26** muestra el patrón de afectación muscular en la EP.

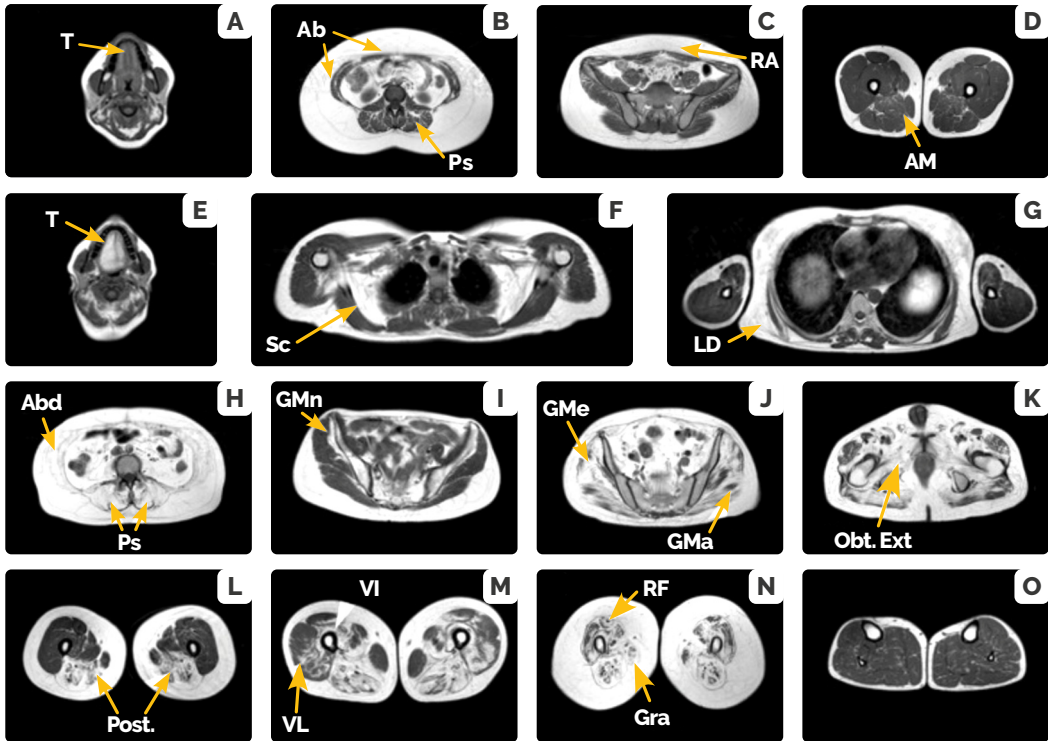


Figura 26: RM de cuerpo entero de pacientes con LOPD (T1w-TSE) mostrando el patrón de infiltración.

Imágenes de **A-D** son de un paciente con hiperkemia. Imágenes de **E-M**: paciente sintomático con mayor infiltración grasa. En **N** se corresponde a un paciente en estadios muy avanzados. En **O** se observa como los músculos de la pierna están preservados. **T**: lengua; **Ab**: recto abdominal; **Ps**: paravertebrales; **RA**: recto anterior; **AM**: aductor mayor; **Sc**: subescapular; **LD**: dorsal ancho; **Abd**: pared abdominal; **GMn**: glúteo menor; **GMe**: glúteo medio; **GMa**: glúteo mayor; **O**: obturador externo; **Post.**: músculos isquiotibiales; **VI**: Vasto intermedio; **VL**: vasto lateral; **RF**: recto femoral; **Gra**: gracilis.

Imagen modificada de Figueroa et, al⁸¹

Identificar este patrón de infiltración en una resonancia muscular es importante para orientar el diagnóstico del paciente, sobre todo en los casos donde la presentación clínica es atípica. Además, la RM es útil para diferenciar la EP de otras enfermedades neuromusculares. Existen algunas enfermedades con un patrón similar, como la distrofia muscular por déficit de sarcoglicano. En este caso los pacientes preservan la musculatura distal de las piernas y tienen una afectación de la musculatura abdominal, paravertebral y glútea, a diferencia de la EP estos pacientes no suelen tener

infiltración de los músculos de la lengua y la musculatura de las extremidades superiores se afecta de forma grave⁸⁵. Otros ejemplos donde se han observado patrones de infiltración muscular característicos, son las miopatías por déficit de colágeno tipo VI que muestran patrón de sustitución grasa muscular muy particular consistente en que la infiltración grasa de los músculos es predominantemente periférica mientras que las fibras musculares centrales permanecen más o menos preservadas^{86,87} o como es el caso de las distrofias óculo faríngeas⁸⁸ donde se observó una afectación predominante de los músculos de la lengua y de los músculos aductor mayor y sóleo en las extremidades inferiores, por citar algunos ejemplos.

Existen varias escalas visuales utilizadas para cuantificar la cantidad de tejido grasa en los músculos esqueléticos, la más conocida es la escala de Mercuri modificada por Fisher⁸⁹, en la cual se asigna un valor numérico a cada músculo según el contenido grasa, con puntuaciones que van desde 0 (músculo no infiltrado) hasta un valor de 4 (infiltración grasa completa). Si bien proporcionan una idea general sobre el grado de compromiso muscular y son rápidas de aplicar, tienen la desventaja de ser observador dependiente (semicuantitativas). Aquellas infiltraciones grasas musculares con baja puntuación son difíciles de determinar si son atribuibles a la propia enfermedad o si son esperables para la edad (sarcopenia), sobre todo en pacientes mayores. Además, en enfermedades de lenta progresión como es el caso de la EP son poco sensibles en identificar cambios sutiles de un año a otro y en consecuencia no son útiles en el seguimiento a corto plazo.

Otros autores han utilizado sistemas de software más sofisticados para cuantificar la grasa en secuencias convencionales (T1w TSE). La principal limitación que encontraron los autores fue la falta de homogeneidad del campo magnético, responsable de las variaciones en la señal T1w⁹⁰. Además, requieren una clara separación entre el músculo y el tejido grasa subcutáneo, lo cual en fases avanzadas de la enfermedad constituye todo un reto. Los estudios de seguimiento en LOPD mediante técnicas

convencionales identificaron un incremento del tejido graso en los músculos esqueléticos de las extremidades inferiores. Uno de los estudios siguió a 11 pacientes, antes y después del inicio de la TRE, durante un periodo de tiempo de 18-24 meses. Identificaron un incremento medio de la cantidad de grasa muscular de 1.3%^{91,92}.

Se ha demostrado una correlación significativa entre el grado de infiltración grasa muscular estimada a través de escalas semi-cuantitativas mediante técnicas de RM convencionales y los resultados de pruebas funcionales que valoran tanto la función como fuerza muscular (6MWT, MRC, dinamómetro) y escalas de actividades de la vida diaria, sugiriendo que la sustitución grasa muscular es un buen indicador de la función muscular⁹³.

Como se comentó previamente la cuantificación mediante escalas semicuantitativas tiene varias limitaciones, siendo necesario recurrir a técnicas más específicas. Existen otros métodos como la secuencia Dixon, que separan el agua de la grasa, generando un mapa de grasa y de agua, en los cuales es posible calcular exactamente la FF⁶⁸, con el valor añadido que al igual que en las secuencias T1w convencionales podemos identificar patrones de afectación muscular.

Hasta día de hoy destacan tres estudios que reúnen un número importante de pacientes con LOPD en los que se cuantificó la FF muscular. Los dos primeros estudios utilizaron la secuencia Dixon. El primer estudio monitorizó 23 pacientes durante 12 meses (14 tratados con la TRE), se obtuvieron imágenes de los músculos de las extremidades inferiores y se observó un incremento anual de FF del 0.9% siendo este un resultado estadísticamente significativo⁹⁴. El segundo estudio siguió una cohorte de 34 pacientes durante 12 meses (22 sintomáticos tratados con TRE y 10 pre-sintomáticos) obteniendo imágenes de la pelvis y muslos. Se estimó una progresión significativa de FF de 1.7% en pacientes sintomáticos. En ambos estudios la FF progresó antes que las pruebas funcionales, sugiriendo que la infiltración grasa precede a las manifestaciones clínicas.

En los pacientes pre-sintomáticos el valor de FF no fue significativo ni se identificaron cambios en la función muscular^{81,95}. Finalmente, el tercer estudio cuantificó la FF en secuencias de densidad protónica (DP), sus resultados no fueron significativos y no demostraron ser más sensibles que la técnica Dixon⁹³.

Los pacientes tratados con TRE muestran una respuesta positiva con mejoría inicial en las pruebas funcionales. Esta mejoría clínica se estabiliza en el tiempo, pero incluso algunos grupos de pacientes experimentan un deterioro progresivo ya sea en la capacidad de caminar, la fuerza muscular o la función pulmonar^{39,40}. Estos hallazgos se correlacionan con la progresión de la infiltración grasa muscular apreciada mediante técnicas Dixon, sugiriendo que la enfermedad permanece activa a lo largo del tiempo.

La estimación de la FF mediante Dixon ha demostrado ser sensible en la progresión de la enfermedad, pero aún no se han publicado estudios donde el seguimiento de los pacientes tratados sea por más de un año. En este contexto resulta incierto si el incremento de la sustitución grasa muscular de 0.9% o 1.7% descrita previamente, se estabiliza, disminuye o progresa en el tiempo a pesar del tratamiento específico, por ello es necesario nuevos estudios que sigan una cohorte de pacientes con LOPD por mucho más tiempo.

Otro aspecto importante en la enfermedad de Pompe es la acumulación progresiva de glucógeno en las miofibrillas, responsables del daño del aparato contráctil, que se manifiesta como debilidad muscular. El glucógeno es una macromolécula que retiene moléculas de agua formando soluciones coloidales, a diferencia de la grasa, que es hidrofóbica.

Un objetivo ambicioso es la cuantificación del glucógeno intramuscular mediante técnicas no invasivas como la RM, ya que podríamos estudiar pacientes con EP en

estadios incipientes de la enfermedad cuando aún no se observa infiltración grasa muscular, como es el caso de pacientes pre-sintomáticos. Los pacientes con formas infantiles que acumulan cantidades notables de glucógeno en las biopsias musculares no muestran signos de infiltración grasa mediante técnicas convencionales (T1w) representado otro grupo de pacientes en los que la detección del glucógeno también sería muy útil.

Todo ello ha suscitado que se apliquen técnicas más específicas encaminadas en la detección de glucógeno intramuscular, como la espectroscopía de ^{13}C que puede detectar de forma precisa la cantidad de glucógeno tanto en el hígado como en el músculo ⁹⁶. Esta técnica requiere un software y antenas especiales, muy costosas y no disponibles de forma rutinaria en los centros clínicos. Otras técnicas descritas son "GlycoCest" ⁹⁷ y "NOECEST" útiles en la detección de glucógeno hepático, son técnicas de difícil interpretación y lastimosamente aún están en periodo de investigación.

La imagen de transferencia de magnetización ha demostrado ser sensible en la detección del daño muscular en pacientes con la enfermedad de Charcot-Marrier-Tooth, en la atrofia muscular espinal (AME) ⁹⁸ o en las distrofias musculares de cinturas (LGMD) ⁹⁹ caracterizadas por pérdida progresiva de fibras musculares y reemplazo por tejido adiposo, no obstante, aún no se ha estudiado su utilidad en las enfermedades por depósito de glucógeno como la enfermedad de Pompe y la enfermedad de McArdle.

La enfermedad de Pompe es una miopatía de muy baja prevalencia, es una de las pocas enfermedades neuromusculares que tiene un tratamiento específico capaz de cambiar la historia natural de la enfermedad. La resonancia magnética ha mostrado ser útil en identificar un patrón de afectación muscular, así como en demostrar que la masa muscular es progresivamente sustituida por tejido graso. Sin embargo, aún quedan algunos interrogantes por resolver. No sabemos el comportamiento a

largo plazo de los cambios de señal muscular, y si estos cambios terminan correlacionados con las pruebas funcionales. Así mismo, desconocemos si los pacientes pre-sintomáticos que ya tienen sustitución por tejido graso se beneficiarían de un inicio temprano del tratamiento. Por ello, que es importante contar con marcadores sensibles que detecten cambios sutiles en la estructura muscular, ayudándonos en el seguimiento de los pacientes, en la toma de decisión respecto al inicio del tratamiento e incluso en monitorizar la respuesta al tratamiento.



HIPÓTESIS



La imagen de resonancia magnética es una herramienta útil para caracterizar y cuantificar los cambios en la estructura de los músculos de pacientes con enfermedad de Pompe de inicio tardío.




OBJETIVOS



El objetivo principal del presente trabajo es aplicar técnicas de resonancia magnética para valorar la estructura muscular de los pacientes con enfermedad de Pompe de inicio tardío.

Los objetivos secundarios son:

- ◀ **Objetivo 1.** Cuantificar el contenido de grasa en los músculos de los pacientes con enfermedad de Pompe del adulto y evidenciar si existen cambios a largo plazo en la misma mediante la secuencia 2 punto-Dixon.
- ◀ **Objetivo 2.** Estudiar si existe una correlación entre los cambios de contenido graso del músculo y los cambios en los resultados de las pruebas funcionales en pacientes con enfermedad de Pompe del adulto.
- ◀ **Objetivo 3.** Valorar si la técnica de transferencia de magnetización puede identificar cambios en la estructura muscular de los pacientes con enfermedad de Pompe, especialmente en las fases iniciales de la misma pudiendo ser una medida indirecta de glucógeno intramuscular.
- ◀ **Objetivo 4.** Estudiar si existe una correlación entre las alteraciones halladas en la técnicas de transferencia de magnetización y las pruebas funcionales en pacientes con enfermedad de Pompe del adulto.



COMPENDIO DE PUBLICACIONES



4

4.1. ARTÍCULO 1

Follow-up of late-onset Pompe disease patients with muscle magnetic resonance imaging reveals increase in fat replacement in skeletal muscles.

Nuñez-Peralta C, Alonso-Pérez J, Llauger J, Segovia S, Montesinos P, Belmonte I, Pedrosa I, Montiel E, Alonso-Jiménez A, Sánchez-González J, Martínez-Noguera A, Illa I, Díaz-Manera J. *Follow-up of late-onset Pompe disease patients with muscle magnetic resonance imaging reveals increase in fat replacement in skeletal muscles. J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2020 Aug;11(4):1032-1046. doi: 10.1002/jcsm.12555. Epub 2020 Mar 4.

Erratum in: J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2021 Oct;12(5):1354. PMID: 32129012; PMCID: PMC7432562.


4.1.1. *Publicación original*

ORIGINAL ARTICLE

Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle 2020; **11**: 1032–1046

Published online 4 March 2020 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/jcsm.12555

Follow-up of late-onset Pompe disease patients with muscle magnetic resonance imaging reveals increase in fat replacement in skeletal muscles

Claudia Nuñez-Peralta¹, Jorge Alonso-Pérez², Jaume Llauger¹, Sonia Segovia^{2,3}, Paula Montesinos⁴, Izaskun Belmonte⁵, Irene Pedrosa⁵, Elena Montiel⁵, Alicia Alonso-Jiménez², Javier Sánchez-González⁴, Antonio Martínez-Noguera¹, Isabel Illa^{2,3} & Jordi Díaz-Manera^{2,3,6*} 

¹Radiology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ²Neuromuscular Disorders Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, ³Centro de Investigación en Red en Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain, ⁴Philips Healthcare Iberia, Madrid, Spain, ⁵Rehabilitation and Physiotherapy Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁶John Walton Muscular Dystrophy Research Center, University of Newcastle, UK

Abstract

Background Late-onset Pompe disease (LOPD) is a genetic disorder characterized by progressive degeneration of the skeletal muscles produced by a deficiency of the enzyme acid alpha-glucosidase. Enzymatic replacement therapy with recombinant human alpha-glucosidase seems to reduce the progression of the disease; although at the moment, it is not completely clear to what extent. Quantitative muscle magnetic resonance imaging (qMRI) is a good biomarker for the follow-up of fat replacement in neuromuscular disorders. The aim of this study was to describe the changes observed in fat replacement in skeletal muscles using qMRI in a cohort of LOPD patients followed prospectively.

Methods A total of 36 LOPD patients were seen once every year for 4 years. qMRI, several muscle function tests, spirometry, activities of daily living scales, and quality-of-life scales were performed on each visit. Muscle MRI consisted of two-point Dixon studies of the trunk and thigh muscles. Computer analysis of the images provided the percentage of muscle degenerated and replaced by fat in every muscle (known as fat fraction). Longitudinal analysis of the measures was performed using linear mixed models applying the Greenhouse–Geisser test.

Results We detected a statistically significant and continuous increase in mean thigh fat fraction both in treated (+5.8% in 3 years) and in pre-symptomatic patients (+2.6% in 3 years) (Greenhouse–Geisser $p < 0.05$). As an average, fat fraction increased by 1.9% per year in treated patients, compared with 0.8% in pre-symptomatic patients. Fat fraction significantly increased in every muscle of the thighs. We observed a significant correlation between changes observed in fat fraction in qMRI and changes observed in the results of the muscle function tests performed. Moreover, we identified that muscle performance and mean thigh fat fraction at baseline visit were independent parameters influencing fat fraction progression over 4 years (analysis of covariance, $p < 0.05$).

Conclusions Our study identifies that skeletal muscle fat fraction continues to increase in patients with LOPD despite the treatment with enzymatic replacement therapy. These results suggest that the process of muscle degeneration is not stopped by the treatment and could impact muscle function over the years. Hereby, we show that fat fraction along with muscle function tests can be considered a good outcome measures for clinical trials in LOPD patients.

Keywords Enzymatic replacement therapy; Fatty replacement; Muscle degeneration; Muscle MRI; Muscle wasting; Pompe disease

Received: 5 May 2019; Revised: 25 December 2019; Accepted: 30 January 2020

*Correspondence to: Jordi Díaz-Manera, Neuromuscular Disorders Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Maria Claret 167, Barcelona 08025, Spain. Phone: +34-935565986, Fax: +34-935565602, Email:jdiazm@santpau.cat

© 2020 The Authors. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Society on Sarcopenia, Cachexia and Wasting Disorders. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Pompe disease is a rare autosomal recessive disorder produced by mutations in the *GAA* gene, which encodes the enzyme acid alpha-glucosidase. This enzyme metabolizes glycogen to glucose inside lysosomes¹. Consequently, mutations in the *GAA* gene lead to glycogen accumulation in numerous tissues, but clinical symptoms are primarily because of cardiac and skeletal muscle involvement.²

Pompe disease has two distinct phenotypes. The classic infantile phenotype is characterized by the onset of symptoms in the first months of life, with muscle weakness, hypertrophic cardiomyopathy, and respiratory insufficiency.³ Patients die early if they are not treated.⁴ In contrast, late-onset Pompe disease (LOPD) is more heterogeneous in its clinical presentation.^{5,6} Patients may present with asymptomatic hyperckemia or develop a slowly progressive weakness involving respiratory, axial, and limb muscles.^{7,8}

Enzymatic replacement therapy (ERT) with alglucosidase alfa (Myozyme®, Sanofi-Genzyme, Cambridge, MA, USA) is accepted as the standard treatment for Pompe disease. Several open label studies have demonstrated its efficacy in maintaining muscle function in LOPD since the original clinical trial was published in 2010.^{9–11} However, a recent single-centre follow-up study suggests that the initial improvement lasts for up to 2 or 3 years and is followed by a progressive deterioration in skeletal and respiratory muscle function.¹² Clinical trials with new therapeutic strategies, including improved enzymes or genetic therapies, are being designed and will probably start in the next few years.^{13,14} These trials will probably rely on functional outcome measures to demonstrate their efficacy. The changes that can be found in common muscle function tests in LOPD patients treated with Myozime® for several years have not been clearly established. Functional tests have the disadvantage of being subject to motivation, are influenced by several external factors, and often display limited interoperator reproducibility.¹⁵ Moreover, the process of muscle degeneration and fatty substitution may have started without yet influencing the results of the muscle function tests. Therefore, there is a need for robust biomarkers sensitive to disease progression and treatment efficacy.¹⁶

In recent years, muscle magnetic resonance imaging (MRI) has been proposed as a valuable tool for both the diagnosis and follow-up of patients with muscle disorders. The identification of muscles replaced by fat can be easily assessed using T1-weighted sequences, which is helpful in the diagnosis process of patients.¹⁷ However, patient follow-up requires a more specific technique, such as the Dixon MRI sequence, which is able to quantify the amount of fat present in an area of skeletal muscle of interest.¹⁸ This test is useful in natural history studies or clinical trials. In the case of Pompe disease, two studies applied Dixon to a large cohort of LOPD patients and in both cases demonstrated that the sequence is able to identify an increase in fat replacement in skeletal muscles

over a 1 year period.^{19,20} However, it is not known if the rate of progression of fat replacement in LOPD is stable over time or which clinical and/or demographic factors can influence this progression.

The aim of our study was to describe the changes observed in fat replacement in skeletal muscles over a period of 4 years in a long cohort of LOPD patients.

Methods

Study design and participants

This study was a prospective, open-label cohort study involving 36 patients with a confirmed diagnosis of LOPD performed at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP) in Barcelona, from December 2013 to June 2018. All patients were evaluated once every 12 months (± 2 months) for a total of four visits. At each visit, we performed muscle function tests, spirometry, quality-of-life scales, and quantitative muscle MRI. The study was registered in ClinicalTrials.gov with the identifier NCT01914536. The HSCSP ethics committee approved the study, and all participants signed an informed consent form. All study procedures were performed in accordance with Spanish regulations.

Inclusion criteria for the study were (i) diagnosis of LOPD based on recommendations proposed by the European Pompe Consortium, reduced enzymatic activity in leukocytes, fibroblasts, or skeletal muscle and/or the presence of two mutations in the *GAA* gene²¹; (ii) no contraindications to MRI; and (iii) willingness to complete all muscle function tests, respiratory assessment, and patient-reported outcomes measures. We included in the study both patients with skeletal muscle weakness and respiratory involvement and patients without symptoms.

All patients were studied by three physiotherapists (I.B., I. P., and E.M) with considerable experience in neuromuscular disorders at HSCSP. All patients were evaluated by the same physiotherapist throughout the whole study. The physiotherapists evaluated muscle function using the following tests: the 6 minute walking test, time to walk 10 m, timed up-and-go test, time to climb up and down four steps, and the Motor Function Measure 20-item scale (MFM-20). All timed tests were performed asking the patient to not use aids for walking. Muscle strength was studied using both the Medical Research Council (MRC) scale and hand-held myometry. Daily life activities were studied using the activity limitations scale for patients with upper and/or lower limb impairments, and quality of life was analysed using both the Individualized Neuromuscular Quality of Life Questionnaire and the Short Form 36 questionnaire. We obtained forced vital capacity, both seated and lying down, using the Carefusion Microlab ML 3500 MK8 spirometer (Carefusion, Yorba Linda, CA, USA).

Muscle imaging

All patients were examined in a 1.5 magnetic resonance system (1.5 Achieva dStream; Philips, Eindhoven, NL) at HSCSP as previously described.²² We used the same positioning protocol for all patients: a supine position with the legs stretched out.

Axial 3D Dixon Fast Field Echo was performed on the pelvis and thighs by using a thirty-two body coil, with the following parameters: the repetition time (TR) the echo time (TE) = 5.78/1.8, 4 m, flip angle = 15°, field of view = 520 × 340 × 300 mm, voxel size = 1 × 1 × 3 mm for thighs, and field of view = 520 × 320 × 200 mm and voxel size = 1.3 × 1.7 × 5 mm for pelvis. This Dixon sequence follows a seven peak fat modelling and provides separate images for fat and water. The acquisition time was 45 min per patient.

Three investigators (C.N-P., A.A-P, and J.D-M.) analysed the Dixon MR images using a Philips Research Image Development Environment tool developed for this project. Regions of interests (ROIs) were manually drawn on four slices of the following muscles: *rectus femoris*, *vastus intermedius*, *vastus lateralis*, *vastus medialis*, *adductor magnus*, *sartorius*, *gracilis*, *semitendinosus*, and *semimembranosus*; on three slices of *biceps femoris long head*, *biceps femoris short head*, and *adductor longus*; and on one slice for psoas and lumbar paraspinal muscles. Slices covered the proximal, middle, and distal part of the muscles. We used anatomical landmarks to ensure consistency between annual analyses. For every ROI, the total area and area covered by fat were calculated automatically using the Philips Research Image Development Environment tool. The fat fraction (FF) coefficient was defined as fat/(fat + water), where fat and water were the image intensity values over the ROI for the fat and water Dixon images, respectively. From those two parameters, and assuming that water content corresponds mainly to muscle, fat and muscle areas were estimated. Cumulative values across all slices were also computed, and as a final index, muscle FF was calculated as follows: $FF = (\text{muscle fat area} \times 100) / \text{muscle area}$. Once we obtained the values from every muscle, we calculated the thigh FF as follows: $\text{thigh FF} = (\text{sum of fat area of all thigh muscles} \times 100) / \text{sum of muscle area of all thigh muscles}$. For every muscle, we calculated the muscle fatty transformation rate = $FF \text{ final visit} - FF \text{ initial visit} / (\text{one-initial FF})$.

The time required to quantify FFs in Dixon images was 45 to 60 min per patient. A high degree of reliability was found between investigators. The Intraclass coefficient (ICC) coefficient was 0.982, with a 95% confidence interval from 0.977 to 0.987.

Statistics

We confirmed that the variables were normally distributed using a Kolmogorov–Smirnov test, and therefore, parametric statistical studies were used. Longitudinal analysis of the

different outcome measures, including muscle function tests and muscle FF quantified by MRI, was performed using linear mixed models applying the Greenhouse–Geisser test. To evaluate the magnitude of the changes observed in the results of outcome measures over the 3 year follow-up period, we provide the standardized response mean (SRM). The SRM is calculated by dividing the mean score change (final visit minus initial visit) by the standard deviation of the change. The estimation of the magnitude of change over time using this formula is based on Cohen's rule for effect size (ES): 'trivial' (ES < 0.20), 'small' (ES ≥ 0.20 < .50), 'moderate' (ES ≥ 0.50 < 0.80), or large (ES ≥ 0.80).²²

To study the influence of clinical and demographic factors in the progression of skeletal muscle FFs, we performed a two-step process. In the first exploratory step, we used a Pearson test to analyse the correlation between every factor of interest and the increase in thigh FF. Those factors with both a statistically significant correlation and a correlation coefficient higher than 0.4 were selected for the second step. This second step consisted of an ANCOVA analysis in which the influence of every selected factor on mean thigh FF increase, as detected by MRI, was assessed separately. The significance level for all statistical studies was set at $p < 0.05$, and post hoc Bonferroni corrections were used when needed. Statistical studies were performed with SPSS for Mac computers (Version 21, SPSS Inc, Chicago, IL). Heatmaps were developed using R version 3.1.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Results

Description of the cohort

Thirty-six LOPD patients (20 women, 55.5%) were enrolled in this study. Mean age at the start was 43.9 ± 14.8 years old. Table 1 provides the main clinical data of the patients at visit 0 (baseline). At Visit 0, 23 patients were already being treated with ERT with Myozyme® for a mean period of 4.1 years. All these patients continued the treatment without interruptions during the whole follow-up. Out of the 13 remaining patients, four started treatment during the follow-up because of the development of muscle weakness impairing the flexion and/or extension of the hip, as demonstrated in clinical examination. These four patients have been excluded from the statistical studies, and their results are shown separately. All these patients started treatment 1 to 3 months after Visit 1. The remaining nine patients were considered pre-symptomatic because they did not report any relevant symptoms or had no muscle weakness found by clinical examination, at any time during the study. At Visit 0, 10 patients needed walking aids such as a cane or a stick for walking outdoors, and 11 patients needed nocturnal non-invasive

Table 1 Clinical features of the patients included in the study

P	G	Age at onset symptoms (years)	Age at ERT (years)	Age at Visit 0 (years)	Baseline walking aids	Baseline ventilation	Last visit walking aids	Last visit ventilation
1	F	38	47	50	N	N	Y (stick)	N
2	F	30	39	48	Y (stick, wheelchair)	Yes (non-invasive)	Y (fully wheelchair)	Yes (non-invasive)
3	F	—	—	26	N	N	N	N
4	F	49	59	63	Y (crouch)	N	Y (crouch)	N
5	F	30	42	45	N	N	N	N
6	F	27	47	51	N	N	N	N
7	M	62	67	66	N	Y (non-invasive)	N	Y (non-invasive)
8	F	48	52	59	Y (stick)	N	Y (stick)	Y (non-invasive)
9	F	40	48	55	N	N	N	N
10	M	36	39	42	N	Y (non-invasive)	N	Y (non-invasive)
11	F	15	24	31	Y (Walker, wheelchair)	Y (non-invasive)	Y (Walker, wheelchair)	Y (non-invasive)
12	F	27	39	46	N	N	N	N
13	M	35	45	47	N	Y (non-invasive)	N	Y (non-invasive)
14	M	41	45	51	N	Y (non-invasive)	N	Y (non-invasive)
15	F	39	46	51	Y (crouch)	Y (non-invasive)	Y (crouch)	Y (non-invasive)
16	M	—	—	22	N	N	N	N
17	M	—	—	51	N	N	N	N
18	M	—	—	14	N	N	N	N
19	F	40	64	65	Y (stick)	N	Y (stick)	N
20	F	24	29	35	Y (crouch)	N	Y (crouch)	N
21	F	36	40	41	N	Y (non-invasive)	N	Y (non-invasive)
22	F	14	45	52	N	N	Y (stick)	N
23	M	22	57	64	Y (Stick)	Y (non-invasive)	Y (stick)	Y (non-invasive)
24	M	—	—	8	N	N	N	N
25	F	42	55	57	Y (Stick)	Y (non-invasive)	Y (stick)	Y (non-invasive)
26	M	35	43	46	N	Y (non-invasive)	N	Y (non-invasive)
27	M	34	51	51	N	N	N	Y (non-invasive)
28	M	—	—	51	N	N	N	N
29	M	32	43	44	N	N	N	N
30	F	39	48	54	N	N	Y (stick)	N
31	M	—	—	12	N	N	N	N
32	M	—	—	51	N	N	N	N
33	M	38	43	42	Y (stick)	N	Y (stick)	N
34	F	20	22	21	N	N	N	N
35	F	—	—	35	N	N	N	N
36	F	24	40	29	N	N	N	N

F, female; G, gender; M, male; N, not needed; P, patient number; Y, yes.

ventilation support (Table 1). During the follow-up period, three patients started using walking aids, and two more started using non-invasive ventilation at night.²⁰

Functional assessments

The muscle function tests that showed significant differences in symptomatic-treated patients after the follow-up period were lower limb muscle strength, measured using MRC and hand-held myometry, and respiratory muscle strength (forced vital capacity seated), with *p* values lower than 0.01 and high SRMs as shown in Table 2. Specific details of the myometry assessments are detailed in Table 3. In summary, all myometry assessments of the lower limbs but knee flexion showed worsening of muscle strength, with knee extension and hip flexion being the two that worsened the most (−4.9 and −4.3 kg, respectively). In contrast, myometry assessments of the upper limbs did not show significant

differences. We did not observe significant differences in timed tests, MFM-20, or daily life activity scales after this period of time. In the case of pre-symptomatic patients, we did not observe significant differences in any of the results of the motor function tests, spirometry, or daily life activity scales.

Quantitative muscle magnetic resonance imaging: progression of fat fraction in late-onset Pompe disease patients

We performed a total of four visits for the whole cohort of patients using two-point Dixon. In every case, we calculated the area of the muscle, the muscle fraction, and the FF of psoas, paraspinal muscles, and each muscle in the thighs, and from that, we derived the mean thigh FF. In the case of symptomatic patients treated with Myozyme®, we observed a statistically significant increase in mean thigh FF of 5.7 ± 3.7% at the end of the follow-up, which corresponds to an

Table 2 Change between Visits 0 and 3 evaluation in muscle function tests, spirometry, quantitative muscle magnetic resonance imaging, and patient reported outcome measures in treated and pre-symptomatic late-onset Pompe disease patients

Test	Symptomatic treated patients <i>n</i> = 22				Pre-symptomatic patients <i>n</i> = 9			
	Visit 0	Visit 3	P	SRM	Visit 0	Visit 3	P	SRM
Time to walk 10 m (s)	7.9 ± 3.8	7.8 ± 6.1	0.30	0.3	3.1 ± 0.5	2.8 ± 0.8	0.39	0.1
6MWT (m)	394.4 ± 150.4	422.3 ± 140.1	0.16	0.1	599.6 ± 85.4	596.2 ± 69.5	0.29	0.03
Timed up & go (s)	7.5 ± 7.2	10.2 ± 6.2	0.20	0.4	3.8 ± 1.5	4.1 ± 0.9	0.44	0.4
Time to climb up four stairs (s)	4.8 ± 3.5	4.7 ± 2.9	0.59	0.3	1.4 ± 0.3	1.3 ± 0.3	0.20	0.3
Time to go down four stairs (s)	3.6 ± 2.4	3.3 ± 2.1	0.40	0.3	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.2	0.61	0.3
MRC total score	95.5 ± 11.1	90.8 ± 11.8	0.0001	0.9	110 ± 0	110 ± 0	0.99	0
MRC LL score	47.1 ± 10.2	42.5 ± 10.3	0.001	0.8	60 ± 0	60 ± 0	0.99	0
Myometry total (kg)	203.7 ± 118.8	180.9 ± 107.7	0.005	0.6	312.3 ± 91.3	354.9 ± 82.3	0.21	0.2
Myometry LL (kg)	117.5 ± 67.7	97.3 ± 58.3	0.0001	0.8	172.3 ± 81.6	201.6 ± 47.0	0.35	0.3
Myometry UL (kg)	95.2 ± 50.4	91 ± 48.4	0.27	0.2	130 ± 10.2	145.8 ± 9.4	0.08	0.5
MFM20 score	48 ± 8	47.6 ± 8.7	0.32	0.1	59 ± 2.4	59 ± 1.9	0.66	0
FVC seated (L)	75.9 ± 22.9	69 ± 25.4	0.0001	0.8	93.6 ± 12.8	90.1 ± 10.3	0.48	0.2
FVC supine (L)	67.6 ± 25.3	65.7 ± 24.1	0.74	0.4	89.3 ± 17.6	88.3 ± 22.5	0.37	0.1
ACTIVLIM score	28 ± 7	27.7 ± 6.8	0.84	0.1	36 ± 0	36 ± 0	0.99	0
Mean thigh FF (%)	36.5 ± 18.6	42.31 ± 19.39	0.0001	1.6	11.9 ± 4.4	15.1 ± 5.1	0.01	1.2
Mean Ps FF (%)	81.8 ± 10.2	82.9 ± 8.6	0.32	0.3	38.3 ± 24.4	45.8 ± 24.3	0.26	0.6

Mean value and standard deviation are shown. Greenhouse–Geisser test analysing the data from Visits 1, 2 and 3 were used to find out whether the differences observed were statistically significant.

ACTIVLIM, activity limitations; FF, fat fraction; FVC, forced vital capacity; LL, lower limbs; MFM20, Motor Function Measure 20-item scale; MRC, Medical Research Council; Ps, paraspinal muscles; SRM, standardized response mean; UL, upper limbs; 6MWT, 6 min walking test.

Table 3 Change between Visits 0 and 3 evaluation in hand-held myometry assessments in symptomatic-treated and pre-symptomatic late-onset Pompe disease patients

Test	Symptomatic treated patients <i>n</i> = 22				Pre-symptomatic patients <i>n</i> = 9			
	Visit 0	Visit 3	<i>p</i>	SRM	Visit 0	Visit 3	<i>p</i>	SRM
Neck flexion	7.3 ± 5.3	8.1 ± 6.1	0.1	0.15	15.5 ± 5.7	15.1 ± 6.7	0.2	-0.05
Shoulder abduction	23.2 ± 10.3	22.4 ± 10.2	0.52	-0.12	27.6 ± 9.7	27.7 ± 6.7	0.98	0.01
Shoulder adduction	15.4 ± 10.3	16.2 ± 2.2	0.37	0.14	26.5 ± 8.7	29.9 ± 7.8	0.02	0.37
Elbow flexion	25.3 ± 12.1	22.9 ± 2.3	0.06	-0.38	29.7 ± 9.4	37.4 ± 7.7	0.02	0.82
Elbow extension	19.2 ± 9.9	17.8 ± 8.2	0.13	-0.34	24.2 ± 7.4	26.3 ± 6.2	0.22	0.41
Hip flexion	21.4 ± 13.8	17.1 ± 12.7	0.007	-0.61	33.9 ± 11.9	32.5 ± 12.3	0.46	-0.5
Hip extension	11.3 ± 9.1	8.7 ± 8.9	0.001	-0.76	33.2 ± 25.1	35.1 ± 8.1	0.06	0.19
Hip abduction	18.3 ± 12.1	14.6 ± 10.9	0.005	-0.63	33.4 ± 17.7	30.3 ± 10.7	0.46	-0.24
Hip adduction	11.5 ± 7.3	8.8 ± 6.3	0.001	-0.76	20.8 ± 6.3	19.8 ± 5.7	0.27	-0.42
Knee extension	33.6 ± 19.8	28.7 ± 16.4	0.01	-0.54	48.1 ± 15.7	47.1 ± 11.5	0.88	-0.06
Knee flexion	20.1 ± 14.2	19.1 ± 11.4	0.31	-0.18	35.2 ± 13.2	34.7 ± 8.2	0.91	-0.04

Mean value and standard deviation are shown. Greenhouse–Geisser test analysing the data from Visits 1, 2, 3 and 4 was used to find out whether the differences observed were statistically significant, and *p* values are shown. All units are expressed as kilogrammes.

SRM, standardized response mean.

Bold emphasis mean statistical significance

increase of 1.9% per year (Greenhouse–Geisser test, *p* < 0.0001 and SRM 1.6) (Figure 1A). Increase in mean thigh FF varied substantially from one patient to another, with a maximum of +13.2% and a minimum of +0.8% (Figure 1B). We observed a significant increase in FF in all muscles analysed, except the paraspinal muscle, as described in Table 4 and displayed in Figure 2. An example of this increase can be found in Figure 3.

In the case of pre-symptomatic patients, we observed a statistically significant increase in mean thigh FF of 2.6 ± 1.6% at the end of the follow-up, which represents an increase of 0.8% per year (Greenhouse–Geisser test, *p* < 0.0001) (Figure 1B). However, we identified higher values of FF in the *adductor major* and the paraspinal muscles of

some pre-symptomatic patients at Visit 0, especially those older than 25 (Figure 1D). In fact, we observed a positive correlation between the age at study of pre-symptomatic patients, and the percentage of FF in these two muscles (*adductor major*: *ρ* = 0.71, *p* = 0.02; paraspinal muscles: *ρ* = 0.96, *p* = 0.0001; Pearson test). On the basis of these data, we decided to divide our cohort of pre-symptomatic patients into younger than 25 years old at baseline (*n* = 5 patients) and older than 25 years old at baseline (*n* = 4 patients). Mean thigh FF did not change significantly in pre-symptomatic patients younger than 25 (+0.7 ± 0.3% in 4 years; Greenhouse–Geisser *p* = 0.33), while it increased significantly in patients older than 25 (+3.2 ± 0.4% in 4 years; Greenhouse–Geisser *p* = 0.004).

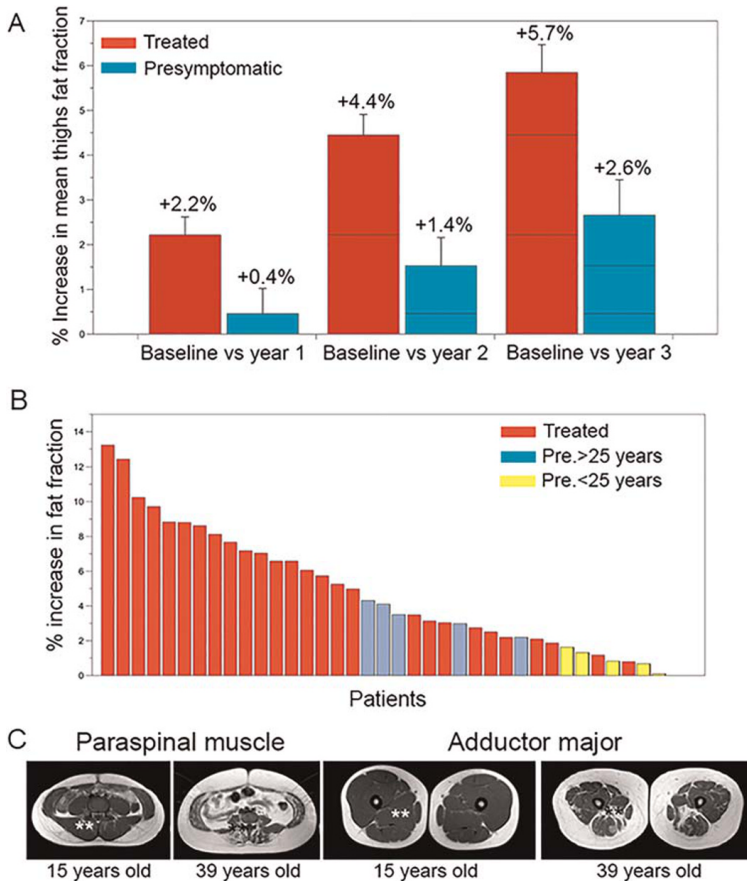


Figure 1 (A) Increase in mean thigh fat fraction at year 1, year 2 and year 3 related to the baseline value. Red bars show data from symptomatic patients treated while blue bars show data from presymptomatic patients. Mean increase and standard error is provided. (B) Increase in mean thigh fat fraction in every single patient of the cohort at visit 3 related to baseline. Red bars represent ERT treated patients. Blue bars represent presymptomatic non-treated patients older than 25, and yellow bars represent patients younger than 25 years old. (C) Involvement of paraspinal and adductor major muscles in presymptomatic patients depending on the age. Fat replacement and atrophy of both muscles was observed in patients older than 25 years old. *Paraspinal muscles **Adductor major muscles

Correlation between changes in muscle function and fat fraction identified by magnetic resonance imaging

We observed a significant correlation between increase in mean thigh FF and changes in muscle strength as measured by hand-held myometry and MRC, as shown in Table 5. The strongest correlation was between increase in FF in the vasti muscles and decrease in muscle strength for knee extension ($\rho = 0.54, p = 0.02$). We also found significant correlations between increase in mean thigh FF and the changes observed in the following timed tests: time to walk 10 m, 6

min walking test, time to climb up four steps and time to go down four steps (Table 5). In contrast, we did not identify a significant correlation between increase in mean thigh FF and results of the MFM-20 score or the activity limitations test.

Analysis of patients who started treatment during follow-up

A total of four patients started treatment with Myozyme® during follow-up, because of the onset of muscle weakness.

Table 4 Increase in fat fraction described by each muscle analysed in treated and pre-symptomatic patients

Muscle	Symptomatic treated patients (n = 23)				Pre-symptomatic patients (n = 9)			
	Visit 0 FF	Visit 3 FF	P	SRM	Visit 0 FF	Visit 3 FF	P	SRM
Rectus femoris	19.5 ± 18.7	21.1 ± 17.1	0.001	0.84	8.8 ± 2.6	11.3 ± 2.7	0.007	1.02
Vastus medialis	31.64 ± 26.9	31.35 ± 27.1	0.009	0.71	10.2 ± 2.2	12.3 ± 2.4	0.14	1.01
Vastus lateralis	22.6 ± 16.4	27.2 ± 21.1	0.0001	1.07	8.5 ± 1.8	12 ± 2.6	0.007	1.34
Vastus intermedius	38.7 ± 27.2	40.6 ± 28.5	0.0001	1.14	9.7 ± 3.1	14.3 ± 4.1	0.01	1.76
Biceps short head	28.3 ± 20.5	32.7 ± 21.5	0.07	1.18	12.8 ± 4.3	15.7 ± 4.2	0.33	0.61
Biceps long head	55.8 ± 29.1	64 ± 26	0.0001	0.96	11.8 ± 5.1	15.4 ± 7.2	0.03	2.91
Semimembranosus	66.7 ± 26.4	70 ± 24	0.02	0.63	16.9 ± 12.7	21.6 ± 14.5	0.69	0.47
Semitendinosus	46.7 ± 29.1	51.3 ± 32.8	0.0001	0.98	12 ± 4.2	14.2 ± 5.8	0.14	1.12
Adductor major	79.4 ± 17.2	79.2 ± 17.3	0.02	0.69	22.1 ± 20.1	27.2 ± 26.3	0.37	0.69
Adductor longus	51.7 ± 33.6	51.9 ± 32.5	0.0001	0.86	11 ± 3.2	14.8 ± 3.2	0.01	3.43
Sartorius	25.3 ± 17.6	27.8 ± 17	0.0001	0.89	19.8 ± 5.3	20.7 ± 5.5	0.49	0.02
Gracillis	22.8 ± 13	27 ± 12.9	0.0001	0.91	15.2 ± 3.8	17.2 ± 4.4	0.27	0.4
Paraspinalis	80.4 ± 9.7	83.3 ± 6	0.29	0.3	38.3 ± 24.4	45.8 ± 24.3	0.26	0.6
Psoas	54.8 ± 30.6	60.6 ± 28.7	0.051	0.22	24.7 ± 16.2	29.2 ± 15.9	0.27	0.26
Total thighs	39.5 ± 18.2	42.6 ± 19	0.0001	1.69	12.1 ± 4.2	15.1 ± 5	0.0001	1.26

Mean fat fraction and standard deviation at Visits 0 (baseline) and 3 (Year 3) are provided. Linear mixed model applying Greenhouse-Geisser test was performed, and *p* is provided. Bold numbers in *p* values are related with significant changes. The standardized response mean (SRM) for every muscle is also provided. FF, fat fraction.

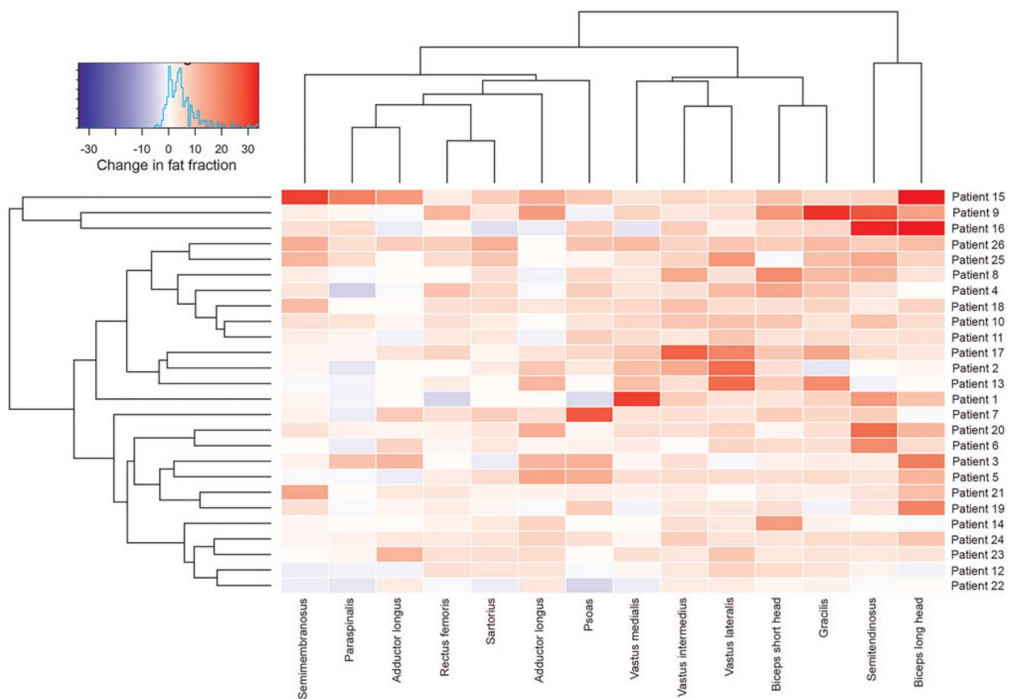


Figure 2 Heatmaps showing changes in fat fraction of thigh muscles studied in symptomatic-treated late-onset Pompe disease patients. Patients and muscles are ordered according to hierarchical clustering with increasing replacement severity from bottom to top (patient-rows) and from left to right (muscles-columns). The increase in fat fraction over a 3 year period of time in the muscle of a patient is indicated by the colour of the square. Red colours mean increased fat fraction, while blue colours mean decreased fat fraction.

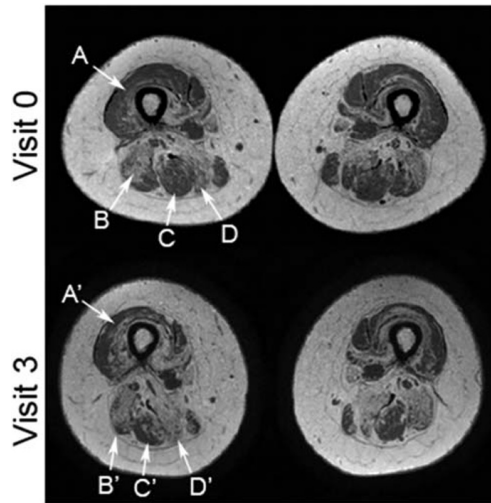


Figure 3 Images illustrate the change in fat replacement throughout the follow-up. Fat fraction maps acquired from the thigh at Visits 0 and 3 (0–100% scale). Increase in fat replacement was visible in most of the muscles, with changes most obvious in the following muscles: (A and A') vastus lateralis (in this patient fat fraction increased from 15.5% to 35.7%), (B and B') long head of the biceps femoris (fat fraction increased from 57.6% to 79.4%), (C and C') semitendinosus (fat fraction rose from 20.3% to 51.4%), and (D and D') semimembranosus (fat fraction increased from 74.2% to 82.4%).

Table 5 Correlation between increase in fat fraction during the follow-up and changes observed in muscle function tests in late-onset Pompe disease patients ($n = 32$)

Variable	Significance (p value)	Correlation coefficient
Time to walk 10 m (s)	0.011	0.43
6MWT (m)	0.024	-0.48
Timed up & go (s)	0.09	0.32
Time to climb four stairs (s)	0.017	0.46
Time to go down four stairs (s)	0.015	0.47
MRC LL score (kg)	0.31	0.15
Myometry LL (kg)	0.032	-0.4
MFM-20 (score)	0.56	-0.13
FVC seated (L)	0.023	-0.39
FVC supine (L)	0.20	-0.24
ACTIVLIM score	0.29	0.18

Correlation was studied using Pearson test. p value was considered significant if lower than 0.05.

ACTIVLIM, activity limitations; FVC, forced vital capacity; LL, Lower limbs; MFM20, Motor Function Measure 20-item scale; MRC, Medical Research Council; 6 min walking test.

Bold emphasis means variables that were selected for the ANCOVA study

All cases started the treatment shortly after Visit 1 (1 to 3 months later). *Table 6* shows the mean thigh FF at Visit 0 (baseline) and the changes observed at every visit in these four patients. We identified a reduction in the rate of FF increase between Visits 0 and 1 (before treatment was started, mean increase +3.39%), Visits 1 and 2, and Visits 2 and 3 (both after starting the treatment, mean increase +1.52%

and +1.71% respectively). However, we did not apply any statistical tests to these data because they only correspond to four patients and can therefore be considered merely descriptive, requiring further evaluation.

Factors influencing increase in fat fraction

We analysed which demographic, clinical, and muscle-functional factors could influence the progression of mean thigh FF in Pompe disease patients. In a first step, we studied which variables had a significant correlation with mean increase in thigh FF, using Pearson correlation tests (*Table 7*). After that, in a second step, we confirmed which of these variables were influencing progression of FF using an ANCOVA analysis. *Table 8* shows the variables that correlated with the progression of FF in our cohort of patients after this analysis, and *Figure 4* displays the graphics showing correlations between variables. We observed that at an earlier start of the symptoms, a longer period of treatment, muscle function at baseline, and muscle FF at baseline were associated with a higher increase in FF in the muscle MRI.

Muscle fat fraction progression: recommendations for the follow-up

We wanted to identify which muscles could be best for following up fatty replacement in LOPD patients in clinical

Table 6 Changes in mean thighs fat fraction observed in the four patients who started the treatment during the follow-up due to the presence of muscle weakness

Patient	Mean thighs fat fraction			
	Visit 0 (%)	Visit 1 (%)	Visit 2 (%)	Visit 3 (%)
Patient 1	25.26	30.66, +5.4	31.74, +1.08	32.25, +0.51
Patient 2	9.85	9.43, -0.42	9.02, -0.41	10.53, +1.51
Patient 3	57.69	62.11, +4.42	65.5, +3.39	67.93, +2.43
Patient 4	26.05	30.22, +4.17	32.27, +2.05	34.67, +2.4
Group		+3.39	+1.52	+1.71

Mean thighs fat fraction and increase over previous visit is shown for every patient.

Table 7 Correlation between increase in fat fraction after 4 years of follow-up and demographic, clinic, and muscle function tests at baseline visit

Variable	Significance (p value)	Correlation coefficient
Sex (M/W)	0.43	-0.15
Age at onset of symptoms (year)	0.14	0.12
Time of progression (year)	0.049	0.34
Age at onset of ERT (year)	0.002	-0.7
Time on ERT (year)	0.019	0.49
Antibody titers	0.87	0.05
Use of aids for walking (Yes/No)	0.31	0.15
Use of ventilation (Yes/No)	0.016	0.42
Time to walk 10 m (s)	0.06	0.37
6MWT (m)	0.005	0.52
Time to climb four steps (s)	0.004	0.53
Time to go down four steps (s)	0.07	0.35
Timed up & go test (s)	0.38	0.22
MFM20 (score)	0.002	-0.57
MRC lower limbs (score)	0.0001	-0.65
Myometry lower limbs (kg)	0.1	-0.39
FVC (L)	0.73	0.15
ACTIVLIM (score)	0.65	0.16
Baseline mean thigh FF (%)	0.001	0.58

Correlation was studied using Pearson test. Antibody titers were studied at baseline visit.

ACTIVLIM, activity limitations; ERT, enzymatic replacement therapy; FVC, forced vital capacity; M, men; MFM20, Motor Function Measure 20-item scale; MRC, Medical Research Council; 6 min walking test; W, women.

Bold emphasis: patients with statistical significance

trials or natural history studies. Increase in FF in most of the muscles analysed was statistically significant in symptomatic-treated patients at the end of the follow-up period. However, we observed a high variability in the amount of increase from one patient to another. In order to classify patients in similar groups, we divided our cohort into four groups, depending on the mean thigh FF at Visit 0 (baseline), which we had previously described as correlating with the clinical situation of the patient.²³ Table 9 shows the four groups and the changes observed in FF during the follow-up. The first group was 'baseline FF lower than 15%'. All individuals in that group ($n = 9$) were pre-symptomatic. Although these patients had never had muscle weakness or any symptoms of muscle weakness, we already detected high values of FF in the paraspinal muscles at baseline visit (FF = 35%).

Table 8 A one-way analysis of covariance was conducted to determine which factors influenced the progression of mean thighs fat fraction

Factor	Effect on increase in FF
Time of progression	0.49
Age at onset of ERT	0.001
Time on ERT	0.045
Ventilation	0.56
Age at ventilation	0.007
Time to walk 10 m	0.052
6MWT	0.009
Time to climb four steps	0.004
Time to go down four steps	0.12
MRC lower limbs	0.0001
Myometry lower limbs	0.21
MFM20	0.001
Baseline FF	0.0001

Results of Greenhouse-Geisser test are shown and were considered significant if $p < 0.05$.

ERT, enzymatic replacement therapy; FF, fat fraction; MFM20, Motor Function Measure 20-item scale; MRC, Medical Research Council; 6 min walking test.

Bold emphasis: statistical significance

In this group, the muscle with a higher progression was the paraspinal muscles. The second group (15% to 30% baseline mean thigh FF) included 11 symptomatic patients. In this group, both paraspinal and *adductor major* were the two muscles showing the highest values of FF at baseline (78.8% and 75.3% respectively). The muscle with a more uniform progression was the long head of the *biceps femoris long head*. The third group (31% to 45% baseline mean thigh FF) included six individuals, all of whom were symptomatic. In this group, paraspinal, *adductor major*, *semimembranosus*, *semitendinosus*, and *biceps femoris long head* muscles were replaced by fat to a large extent, and the muscles identified with a higher increase in FF were the *biceps femoris short head*, the *vastus intermedius*, and the *vastus lateralis*. The last group (more than 45% baseline mean thigh FF) had 11 individuals, all of them symptomatic. In this group, paraspinal, *adductor major and longus*, *biceps femoris long head*, *semimembranosus*, *semitendinosus*, and *psaos* were replaced by fat and therefore not useful for the follow-up. In contrast, we identified *vastus lateralis* as the best candidate for the follow-up. A summary of all these findings is displayed in Figure 5.

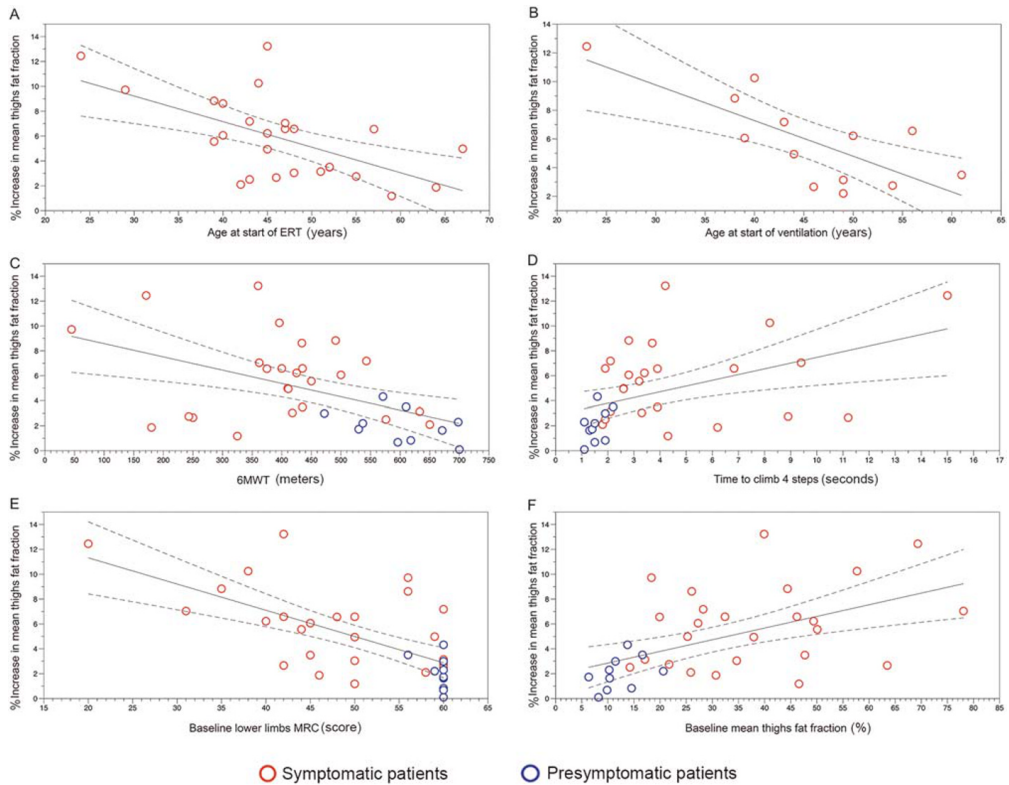


Figure 4 (A) Correlation between age at start of ERT and increase in mean thigh fat fraction. (B) Correlation between age at start of ventilation and increase in mean thigh fat fraction. (C) Correlation between results of the 6 min walking test (6MWT) at baseline and increase in mean thigh fat fraction. (D) Correlation between time to climb four steps at baseline and increase in mean thigh fat fraction. (E) Correlation between MRC for lower limbs at baseline and increase in mean thigh fat fraction. (F) Correlation between mean thigh fat fraction at baseline and increase in mean thigh fat fraction. ERT, enzymatic replacement therapy; MRC, magnetic resonance imaging.

Discussion

In this study, we followed-up a large cohort of patients with LOPD, both symptomatic-treated and pre-symptomatic patients, for a period of 4 years using Dixon quantitative muscle MRI and several clinical assessments including muscle function tests, spirometry, and activities of daily living scales. We detected a significant and continuous increase in muscle fat replacement in symptomatic patients despite being treated with ERT, which correlated to a decrease in muscle strength. In the case of pre-symptomatic patients, we identified an increase in FF, especially in paraspinal muscles, that was not associated to any change in motor function tests. The study has allowed us to confirm that quantitative muscle MRI is able to identify subtle changes in muscle structure and it can be considered a promising outcome measure for the

follow-up of patients in natural history studies or clinical trials.

Late-onset Pompe disease is a metabolic disorder characterized by a progressive accumulation of glycogen inside the lysosomes of the tissues. The increasing number of glycogen-charged lysosomes in the sarcoplasm of the muscle fibres triggers a set of processes that eventually lead to muscle fibre death and replacement by fat and fibrotic tissue.^{24,25} The loss of muscle fibres is related to the muscle weakness of these patients. In recent years, quantitative muscle MRI has been implemented as one of the best candidate biomarkers to follow-up disease progression in patients with different muscle disorders, such as Duchenne muscle dystrophy, facio-scapulo-humeral muscle dystrophy, limb girdle muscle dystrophy 2I, or Pompe disease.^{26–28} Most of the previously published studies using qMRI have focused on quantifying

Table 9 Increase in fat fraction depending on visit 0 mean thigh fat fraction

Muscle	Visit 0 FF <15% (n = 9)			Visit 0 FF 15-30% (n = 11)			Visit 0 FF 30-45% (n = 6)			Visit 0 FF >45% (n = 10)		
	Visit 0	V0-V3	SRM	MFTR	Visit 0	V0-V3	SRM	MFTR	Visit 0	V0-V3	SRM	MFTR
RF	8.8%	+1.6%	0.87	+1.7%	8.6%	+2.7%	1.56	+2.9%	16.6%	+3.4%	1.44	+3.9%
VM	9.8%	+1.2%	0.72	+1.3%	12.9%	+2.8%	0.84	+3.3%	27.9%	+4.1%	1.50	+5.7%
VL	8.1%	+2.5%	1.12	+3.4%	12.5%	+3.9%	1.51	+4.7%	18.4%	+8%	1.28	+9.8%
VI	9.2%	+3.1%	2.32	+3.4%	15.1%	+5.2%	2.51	+6.1%	40.6%	+9%	1.01	+15.2%
BFSH	12.9%	+1.8%	0.55	+2.1%	15.6%	+4.7%	1.73	+5.6%	27%	+9.5%	1.47	+13.1%
BFLH	10.5%	+1.9%	1.01	+2.2%	32.5%	+15.6%	1.51	+23.1%	65.6%	+2.4%	1.23	+7.1%
AM	17.1%	+2%	1.07	+2.5%	75.3%	+3.6%	0.64	+14.6%	84.5%	+3.6%	0.91	+23.1%
AL	11%	+2.3%	0.75	+2.5%	30.7%	+5.7%	0.98	+8.3%	42.4%	+2.9%	0.74	+5.1%
Sa	19.1%	-0.9%	0.22	-1.1%	18.6%	+3.3%	0.79	+4.1%	20.7%	+3.8%	1.82	+4.8%
Gr	15.1%	-1.4%	0.23	+0.9%	15.9%	+2.6%	1.43	+5.3%	20.1%	+3.3%	1.49	+8.3%
ST	11.5%	+0.7%	0.29	+0.8%	18.3%	+8.8%	0.88	+10.7%	61.6%	+5%	1.29	+13.1%
SM	12.3%	+1.3%	0.31	+1.5%	49%	+8.1%	0.94	+16.1%	80.7%	+1.3%	1.63	+7.1%
Pso	20.7%	+1.4%	0.25	+1.8%	47.6%	+5.9%	0.58	+11.4%	50%	+7.7%	0.8	+15.5%
P5	38.5%	+5.3%	0.7	+8.7%	78.8%	+3.7%	1.26	+17.7%	85.1%	+0.8%	0.06	+0.5%

Patients were divided in four groups depending on Visit 0 mean thighs fat fraction. Per every muscle, fat fraction at Visit 0 and increase at Visit 3 are shown. AM, adductor major; AL, adductor longus; BFSH, biceps femoris short head; BFLH, biceps femoris long head; FF, fat fraction; Gr, gracilis; MFTR, muscle fatty transformation rate; P5, paraspinous muscle; Pso, psoas; RF, rectus femoris; VL, Vastus lateralis; VM: Vastus Medialis; Sa, sartorius; SM, semimembranosus; SRM, standardized response mean; ST, semitendinosus; VI, vastus intermedius; VV, vastus lateralis.

the amount of fat and/or water present in the skeletal muscles of the patients. Two-point or three-point Dixon, global T2, and ¹H spectroscopy are the main techniques used for this purpose.¹⁸ Here, we have used two-point Dixon, which is a qMRI sequence that can be done in 1.5 Teslas MRIs, available in most of the clinical centres that follow Pompe patients. Our results support the use of Dixon technique as a reliable outcome measure for the follow-up of patients with LOPD disease. Using this technique, we have shown that skeletal muscle FF increases in symptomatic patients despite ongoing treatment with ERT.

The yearly progression ratio of mean FF, close to 2%, was stable in our cohort. This increase is slightly higher than the one found in previous studies. For example, the group of Professor Carlier performed a retrospective analysis of 14 LOPD patients treated with ERT and found a significant increase of 0.9% in FF of all lower limb muscles during a 1 year period.¹⁹ However, that study included lower leg muscles, such as *tibialis anterior* or *soleus*, that are commonly less involved in LOPD, probably reducing the final average increase in FF observed. When comparing with other studies, it is important to take into account the acquisition parameters used. For example, in our Dixon sequence, we used a flip angle of 15° that is higher than the one used in previous studies.¹⁹ A higher T1 weighting, due to the use of a higher flip angle, can lead to an overestimation of the FF, especially for higher FF values.²⁹ We have observed considerable variability in the increase of FF from one patient to another, ranging from a 14% increase to less than 1%, suggesting that there are clinical or genetic factors than can influence the progression of the disease. We have observed that the following correlate with a larger increase in FF over a 4 year period: (i) starting ERT at a younger age, suggesting that patients started symptoms earlier; (ii) starting mechanical ventilation early; (iii) worse baseline muscle performance; and (iv) higher baseline fat replacement detected by MRI.

We have also detected significant changes in two function tests: muscle strength and forced vital capacity. These results are in line with other recently published evidence showing decrease of muscle strength in LOPD patients despite ERT treatment.¹² Moreover, in our study, changes in muscle strength is correlated with increase in FF, which has a clear explanation. Increase in FF comes with a decrease in contractile muscle mass. It is therefore not unusual that those patients in whom FF increased the most had a greater decrease in muscle strength, as has been previously shown in other muscle disorders such as limb-girdle muscular dystrophy type 2I.³⁰ However, decrease in muscle strength did not impact timed test results in our cohort of patients, probably because these tests are not only influenced by muscle strength, but also for other factors such as respiratory involvement, fatigue, muscle pain, or personal motivation.

Quantification of FF using Dixon analysis can be a complicated task that requires a high degree of specialization.³¹

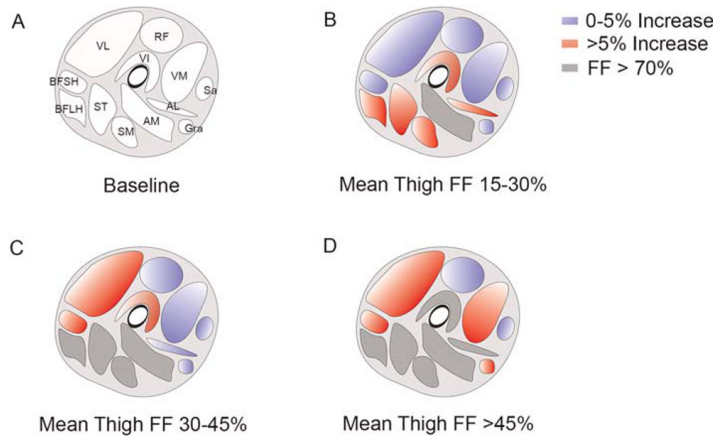


Figure 5 Progression of fat fraction depending on the baseline mean thigh fat fraction. (A) Baseline image showing the localization of thigh muscles (VL: *vastus lateralis*, RF: *rectus Femoris*, VM: *vastus medialis*, VI: *vastus intermedius*, BFSH: *biceps femoris short head*, BFLH: *biceps femoris long head*, ST: *semitendinosus*, SM: *semimembranosus*, AM: *adductor major*, AL: *adductor longus*, Sa: *sartorius*, and Gra: *gracilis*). (B) Increase in fat fraction over a 4 year period in patients with baseline mean thigh fat fraction of 15% to 30%. (C) Increase in fat fraction over a 4 year period in patients with baseline mean thigh fat fraction of 30% to 45%. (D) Increase in fat fraction over a 4 year period in patients with baseline mean thigh fat fraction >45%. FF, fat fraction.

No automatized software is yet available that can distinguish one muscle from the others, and so the analysis has to be performed manually.³² In this study, all MRIs were separately analysed by three investigators with considerable experience in this field. We have observed that if anatomical landmarks are well established, the variability in the measurements between investigators is very low. Previous studies have shown that fat replacement is not homogeneous in muscles in patients with muscle diseases, and therefore, analysing one slice only is probably not sufficient to estimate the mean FF of that muscle.³³ It is therefore necessary to include several slices of every muscle in the analysis, increasing significantly the time needed to complete the study. The identification of single muscles that could act as reporters of the increase in FF is desirable because it could make studies more efficient. Our study allows a description of the typical order in which different muscles are involved, thereby sketching out a hypothetical natural history of fat replacement progression. In our opinion, this is an important step that should be made to select the best muscle to identify changes in FF over a period of time. If a muscle that has already been completely replaced by fat is selected, no changes will be observed as there is no more muscle to lose. On the other hand, if a muscle that is not involved until very late in the progression of the disease is selected, no changes will likely be recorded, even though FF could actually be increasing in other muscles. We have observed that paraspinal muscles are the first muscles involved in LOPD from a radiological point of view, probably leading to the frequently reported symptoms of

scoliosis in juvenile patients and lumbar pain or changes in the walking pattern in adults.^{34,35} The *adductor major* muscle is also involved early in the progression of the disease, and in fact, we have observed that these two muscles are almost completely replaced by fat in most of our symptomatic patients.³⁶ The muscles of the posterior compartment of the thighs are affected later, and so they can be considered good candidates for monitoring FF progression during intermediate stages of the disease. Finally, *vasti* muscles are involved in more advanced cases. In fact, only two patients in our cohort had clear quadriceps weakness leading to difficulties walking downstairs or standing. *Vastus lateralis* is, in the light of our results, a good candidate for monitoring FF progression in patients that are at an advanced clinical stage.

We had the opportunity to study four patients before and after starting ERT. Interestingly, we observed that ERT decreased the rate of increase of FF from 3% to 1.7%, which is a value close to the mean observed in the whole cohort, suggesting that ERT with Myozyme® is effective in slowing down the progression of muscle degeneration in Pompe disease. These results are in accordance with those previously reported by the group of Professor Carlier. This group reported that increase in FF was lower in patients treated with ERT than in those not treated after 1 year of follow-up (19).

Through our study, we realized that Dixon has some clear limitations in the study of pre-symptomatic Pompe patients. Increase in mean thigh FF was only significant in those pre-symptomatic patients older than 25 years old but not in the

younger patients whose age ranged from 8 to 21 years old. This can be related to the fact that the process of muscle degeneration and fatty replacement was not active in younger patients. However, we identified two different situations that should be discussed and analysed in further studies. We already identified fat replacement in paraspinal and *adductor major* muscles of some pre-symptomatic patients at baseline visit, suggesting that the process of muscle degeneration progresses very slowly in Pompe, and is subclinical in some patients, until a moment in which patients experience muscle weakness. However, we identified two young patients that developed muscle weakness, one during the study, and the other just at the end, in which increase in FF was not detected despite those patients complaining of worsening muscle weakness. In the first case, we observed mild psoas and glutei weakness in a 19-year-old girl. At that moment, her MRI did not show muscle fat replacement. The second case was a 12-year-old boy who developed scoliosis and glutei weakness 6 months after Visit 3 (end of the study). We performed a new MRI that did not show muscle fat replacement. It is therefore probable that in some cases, the accumulation of glycogen-charged lysosomes, or the presence of free glycogen in the sarcoplasm, disrupts muscle fibre contraction, leading to muscle weakness before inducing necrosis of the fibre and fatty substitution.³⁷ In these cases, Dixon may not be useful, because there are no changes in fat tissue content. Therefore, a combination of Dixon with a muscle MRI sequence able to identify glycogen in the muscle fibres of weak muscles may be more informative in this subset of patients. Muscle glycogen can be identified and quantified using some specific muscle MRI sequences, such as GlycoCEST or ¹³C-MR spectroscopy, but this technology is not routinely available on standard clinical scanners.^{38,39} An increased signal intensity in Short Tau Inversion Recovery (STIR) sequence in muscles from LOPD patients has been described, suggesting that this is related to the presence of water molecules retained by glycogen.⁴⁰ In a similar way, increase in the water T2 signal in some muscles was identified in LOPD patients, which correlated with a higher increase in FF after 1 year follow-up, suggesting that water T2 could be a potential marker of disease activity.¹⁹ However, increased signal intensity in STIR or changes in water T2 is not specific and can be observed in muscle fibre necrosis, inflammation, or denervation.⁴¹ In our opinion, for Pompe patients, studying MRI sequences that are able to identify changes related to the accumulation of glycogen is likely to be especially useful for the study of juvenile patients who are experiencing muscle symptoms.

Our results support the use of muscle MRI in the decision-making process in patients with Pompe disease. We have shown that a high value in FF in skeletal muscles at baseline is associated with a quicker progression of the disease. Moreover, there is a correlation between increase in FF and changes in muscle function tests, which translates the clinical

importance of the radiological findings. As fat replacement is an irreversible process, we suggest that muscle MRI should be part of the initial assessment of patients with LOPD and taken into account in deciding when to start treatment in pauci-symptomatic patients.

To conclude, the results of our longitudinal study (i) establish the rate of annual progression of fat replacement in LOPD patients treated with ERT with Myozyme; (ii) pinpoint clinical factors influencing the increase in muscle FF; and (iii) show the clinical relevance of the changes observed in muscle MRI.

Acknowledgements

We would like to thank the Spanish Association of Patients with Glycogenosis (www.glucogenosis.org) for their support for our investigation. We thank Neil McMillan for editorial support and Ignasi Gich for help with statistics. We thank the entire MRI technician team: Esther Alemany, Nieves Campillos, Elisenda Mestres, Eugenia Torres, Ricard Cullerell, Ingrid Rubio, Alberto Fernández, and Mario González, for their patience and support for the study. We also thank Mrs Concepción Escolá for her assistance during the visits of the study. This investigation was sponsored by the following grants, one from Sanofi Genzyme and another from the Spanish Ministry of Health, Fondos FEDER-ISCIII PI15/01822 and PI18/01525 to Dr Jordi Díaz-Manera. Isabel Illa has received speaker honorarium from Grifols and Sanofi-Genzyme. Jordi Díaz-Manera has received speaker honorarium from PTC Therapeutics and Sanofi-Genzyme. The authors of this manuscript certify that they comply with the ethical guidelines for authorship and publishing in the Journal of Cachexia, Sarcopenia, and Muscle.⁴²

Contributions of authors

CNP, JL, SS, PM, IB, IP, EM, JSG, AMN, II, and JDM carried out the concept and design of the study. CNP, JAP, JL, IB, IP, EM, and AAJ performed the acquisition and analysis of data. CNP, JAP, JL, SS, PM, AAJ, JSG, AMN, II, and JDM drafted of the manuscript. SS performed the acquisition of data. II and JPM obtained funding for the study. Spanish Pompe Study Group: see supplemental Table S1.

Online supplementary material

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Table S1 Members of the Spanish Pompe Study Group Placement

Conflicts of interest

The company has neither reviewed the data nor suggested changes in any of the conclusions of the paper. Claudia

Núñez-Peralta, Jorge Alonso-Pérez, Jaume Llauger, Sonia Segovia, Paula Montesinos, Izaskun Belmonte, Irene Pedrosa, Elena Montiel, Alicia Alonso-Jiménez, Javier Sánchez-González, and Antonio Martínez-Noguera have no conflict of interest.

References

- Lim J, Li L, Raben N. Pompe disease: from pathophysiology to therapy and back again. *Front Aging Neurosci* 2014;**6**:1–14.
- Kohler L, Puertollano R, Raben N. Pompe disease: From basic science to therapy. *Neurotherapeutics* 2018;**15**:928–942.
- Case LE, Beckemeyer AA, Kishnani PS. Infantile Pompe disease on ERT: update on clinical presentation, musculoskeletal management, and exercise considerations. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2012;**160C**:69–79.
- Kishnani P, Corzo D, Nicolino M, Byrne B, Mandel H, Hwu WL, et al. Recombinant human acid α -glucosidase: major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease. *Neurology* 2007;**68**:99–109.
- Schuller A, Wenninger S, Strigl-Pill N, Schoser B. Toward deconstructing the phenotype of late-onset Pompe disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2012;**160C**:80–88.
- Hagemans ML, Winkel LP, Van Doorn PA, Hop WJ, Loonen MC, Reuser AJ, et al. Clinical manifestation and natural course of late-onset Pompe's disease in 54 Dutch patients. *Brain* 2005;**128**:671–677.
- Echaniz-Laguna A, Carlier RY, Laloui K, Carlier P, Salort-Campana E, Pouget J, et al. Should patients with asymptomatic pompe disease be treated? A nationwide study in France. *Muscle Nerve* 2015;**51**:884–889.
- Hagemans ML, Winkel LP, Hop WC, Reuser AJ, Van Doorn PA, Van der Ploeg AT. Disease severity in children and adults with Pompe disease related to age and disease duration. *Neurology* 2005;**64**:2139–2141.
- van der Ploeg AT, Clemens PR, Corzo D, Escolar DM, Florence J, Groeneveld GJ, et al. A randomized study of alglucosidase alfa in late-onset Pompe's disease. *N Engl J Med* 2010;**362**:1396–1406.
- Schoser B, Stewart A, Kanters S, Hamed A, Jansen J, Chan K, et al. Survival and long-term outcomes in late-onset Pompe disease following alglucosidase alfa treatment: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol* 2017;**264**:621–630.
- Toscano A, Schoser B. Enzyme replacement therapy in late-onset Pompe disease: a systematic literature review. *J Neurol* 2013;**260**:951–959.
- Kuperus E, Kruijshaar ME, Wens SCA, de Vries JM, Favejee MM, van der Meijden JC, et al. Long-term benefit of enzyme replacement therapy in Pompe disease: a 5-year prospective study. *Neurology* 2017;**89**:2365–2373.
- Byrne BJ, Geberhiwot T, Barshop BA, Barohn R, Hughes D, Bratkovic D, et al. A study on the safety and efficacy of reveglucosidase alfa in patients with late-onset Pompe disease. *Orphanet J Rare Dis* 2017;**12**:1–10.
- Puzzo F, Colella P, Biferi MG, Bali D, Paulk NK, Vidal P, et al. Rescue of Pompe disease in mice by AAV-mediated liver delivery of secreted acid α -glucosidase. *Sci Transl Med* 2017;**9**:418.
- Lachmann R, Schoser B. The clinical relevance of outcomes used in late-onset Pompe disease: can we do better? *Orphanet J Rare Dis* 2013;**8**:160.
- Straub V, Bertoli M. Where do we stand in trial readiness for autosomal recessive limb girdle muscular dystrophies? *Neuromuscul Disord* 2016;**26**:111–125.
- Diaz-Manera J, Llauger J, Gallardo E, Illa I. Muscle MRI in muscular dystrophies. *Acta Myol [Internet]* 2015;**34**:95–108.
- Burakiewicz J, Sinclair CDJ, Fischer D, Walter GA, Kan HE, Hollingsworth KG. Quantifying fat replacement of muscle by quantitative MRI in muscular dystrophy. *J Neurol* 2017;**264**:2053–2067.
- Carlier PG, Azzabou N, de Sousa PL, Hicks A, Boisserie JM, Amadon A, et al. Skeletal muscle quantitative nuclear magnetic resonance imaging follow-up of adult Pompe patients. *J Inherit Metab Dis* 2015;**38**:565–572.
- Figueroa-Bonaparte S, Llauger J, Segovia S, Belmonte I, Pedrosa I, Montiel E, et al. Quantitative muscle MRI to follow up late onset Pompe patients: a prospective study. *Sci Rep* 2018;**8**:1–11.
- van der Ploeg AT, Kruijshaar ME, Toscano A, Laforêt P, Angelini C, Lachmann RH, et al. European consensus for starting and stopping enzyme replacement therapy in adult patients with Pompe disease: a 10-year experience. *Eur J Neurol* 2017;**24**:768–e31.
- Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioural sciences. revised edition ed.* New York: Academic Press; 1977.
- Figueroa-Bonaparte S, Segovia S, Llauger J, Belmonte I, Pedrosa I, Alejalde A, et al. Muscle MRI findings in childhood/adult onset Pompe disease correlate with muscle function. *PLoS ONE* 2016;**11**:e0163493.
- Thurberg BL, Lynch Maloney C, Vaccaro C, Afonso K, Tsai AC, Bossen E, et al. Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Lab Invest* 2006;**86**:1208–1220.
- Schänzer A, Kaiser AK, Mühlfeld C, Kulesa M, Paulus W, von Pein H, et al. Quantification of muscle pathology in infantile Pompe disease. *Neuromuscul Disord* 2017;**27**:141–152.
- Willis TA, Hollingsworth KG, Coombs A, Sveen ML, Andersen S, Stojkovic T, et al. Quantitative muscle MRI as an assessment tool for monitoring disease progression in LGMD2I: a multicentre longitudinal study. *PLoS ONE* 2013;**8**:e70993.
- Andersen G, Dahlqvist JR, Vissing CR, Heje K, Thomsen C, Vissing J. MRI as outcome measure in facioscapulohumeral muscular dystrophy: 1-year follow-up of 45 patients. *J Neurol* 2017;**264**:438–447.
- Willcocks RJ, Rooney WD, Triplett WT, Forbes SC, Lott DJ, Senesac CR, et al. Multi-center prospective longitudinal study of magnetic resonance biomarkers in a large duchenne muscular dystrophy cohort. *Ann Neurol* 2016;**79**:535–547.
- Bydder M, Yokoo T, Hamilton G, Middleton MS, Chavez AD, Schwimmer JB, et al. Relaxation effects in the quantification of fat using gradient echo imaging. *Magn Reson Imaging* 2008;**26**:347–359.
- Murphy AP, Morrow J, Dahlqvist JR, Stojkovic T, Willis TA, Sinclair CD, et al. Natural history of limb girdle muscular dystrophy R9 over 6 years: searching for trial endpoints. *Ann Clin Transl Neurol* 2019;**6**:1033–1045.
- Carlier PG, Marty B, Scheidegger O, Loureiro de Sousa P, Baudin PY, Snezhko E, et al. Skeletal muscle quantitative nuclear magnetic resonance imaging and spectroscopy as an outcome measure for clinical trials. *J Neuromuscul Dis* 2016;**3**:1–28.
- Ogier A, Sdika M, Fouré A, Le Troter A, Bendahan D. Individual muscle segmentation in MR images: a 3D propagation through 2D non-linear registration approaches. *Proc Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* 2017;**2017**:317–320.
- Chrzanowski SM, Baligand C, Willcocks RJ, Deol J, Schmalfluss I, Lott DJ, et al. Multi-slice MRI reveals heterogeneity in disease distribution along the length of muscle in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol* 2017;**36**:151–162.
- Taisne N, Desnuelle C, Juntas Morales R, Ferrer Monasterio X, Sacconi S, Duval F, et al. Bent spine syndrome as the initial symptom of late-onset Pompe disease. *Muscle Nerve* 2017;**56**:167–170.
- Herbert M, Case LE, Rairikar M, Cope H, Bailey L, Austin SL, et al. Early-onset of symptoms and clinical course of Pompe

- disease associated with the c.-32-13 T > G variant. *Mol Genet Metab* 2019;**126**: 106–116.
36. Carlier RY, Laforet P, Wary C, Mompoin D, Laloui K, Pellegrini N, et al. Whole-body muscle MRI in 20 patients suffering from late onset Pompe disease: involvement patterns. *Neuromuscul Disord* 2011;**21**: 791–799.
37. Griffin J. Infantile acid maltase deficiency. I. Muscle fiber destruction after lysosomal rupture. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1984;**45**:23–36.
38. van Zijl PC, Jones CK, Ren J, Malloy CR, Sherry AD. MRI detection of glycogen in vivo by using chemical exchange saturation transfer imaging (glycoCEST). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:4359–4364.
39. Baligand C, Todd AG, Lee-McMullen B, Vohra RS, Byrne BJ, Falk DJ, et al. 13C/31P MRS metabolic biomarkers of disease progression and response to AAV delivery of hGAA in a mouse model of Pompe disease. *Mol Ther* 2017;**7**:42–49.
40. Pichiecchio A, Berardinelli A, Moggio M, Rossi M, Balottin U, Comi GP, et al. Asymptomatic Pompe disease: can muscle magnetic resonance imaging facilitate diagnosis? *Muscle Nerve* 2016;**53**:326–327.
41. Azzabou N, Carlier PG. Fat quantification and T2 measurement. *Pediatr Radiol* 2014;**44**:1620–1621.
42. von Haehling S, Morley JE, Coats AJS, Anker SD. Ethical guidelines for publishing in the Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle: update 2019. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2019; **10**: 1143-1145.

4.2. ARTÍCULO 2

Magnetization Transfer Ratio in Lower Limbs of Late Onset Pompe Patients Correlates With Intramuscular Fat Fraction and Muscle Function Tests.

Nuñez-Peralta, C., Montesinos, P., Alonso-Jiménez, A., Alonso-Pérez, J., Reyes-Leiva, D., Sánchez-González, J., Llauger-Roselló, J., Segovia, S., Belmonte, I., Pedrosa, I., Martínez-Noguera, A., Matellini-Mosca, B., Walter, G., & Díaz-Manera, J.

Frontiers in neurology, 12, 634766. doi:10.3389/fneur.2021.634766

4.2.1. *Publicación original*

Magnetization Transfer Ratio in Lower Limbs of Late Onset Pompe Patients Correlates With Intramuscular Fat Fraction and Muscle Function Tests

Claudia Nuñez-Peralta^{1,2*}, Paula Montesinos³, Alicia Alonso-Jiménez⁴, Jorge Alonso-Pérez⁵, David Reyes-Leiva⁵, Javier Sánchez-González³, Jaume Llauger-Roselló¹, Sonia Segovia^{5,6}, Izaskun Belmonte⁷, Irene Pedrosa⁷, Antonio Martínez-Noguera¹, Briano Matellini-Mosca¹, Glenn Walter⁸ and Jordi Díaz-Manera^{5,6,9*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Edoardo Malfatti,
INSERM U1179 Handicap
Neuromusculaire: Physiopathologie,
Biothérapie et Pharmacologie
Appliquées (END-ICAP), France

Reviewed by:

Marianne De Visser,
University of Amsterdam, Netherlands
Carmelo Rodolico,
University of Messina, Italy

*Correspondence:

Claudia Nuñez-Peralta
cnunez@santpau.cat
Jordi Díaz-Manera
jordi.diaz-manera@newcastle.ac.uk

Specialty section:

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

Received: 28 November 2020

Accepted: 01 February 2021

Published: 16 March 2021

Citation:

Nuñez-Peralta C, Montesinos P,
Alonso-Jiménez A, Alonso-Pérez J,
Reyes-Leiva D, Sánchez-González J,
Llauger-Roselló J, Segovia S,
Belmonte I, Pedrosa I,
Martínez-Noguera A,
Matellini-Mosca B, Walter G and
Díaz-Manera J (2021) Magnetization
Transfer Ratio in Lower Limbs of Late
Onset Pompe Patients Correlates
With Intramuscular Fat Fraction and
Muscle Function Tests.
Front. Neurol. 12:634766.
doi: 10.3389/fneur.2021.634766

¹Radiology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain, ²Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ³Philips Healthcare Iberia, Madrid, Spain, ⁴Neuromuscular Reference Center, Neurology Department, University Hospital of Antwerp, Edegem, Belgium, ⁵Neuromuscular Disorders Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain, ⁶Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain, ⁷Rehabilitation Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain, ⁸Department of Physiology and Functional Genomics, University of Florida, Gainesville, FL, United States, ⁹John Walton Muscular Dystrophy Research Center, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, United Kingdom

Objectives: Magnetization transfer (MT) imaging exploits the interaction between bulk water protons and protons contained in macromolecules to induce signal changes through a special radiofrequency pulse. MT detects muscle damage in patients with neuromuscular conditions, such as limb-girdle muscular dystrophies or Charcot-Marie-Tooth disease, which are characterized by progressive fiber loss and replacement by fatty tissue. In Pompe disease, in which there is, in addition, an accumulation of glycogen inside the muscle fibers, MT has not been tested yet. Our aim is to estimate MT ratio (MTR) in the skeletal muscle of these patients and correlate it with intramuscular fat fraction (FF) and results of muscle function tests.

Methods: We obtained two-point axial Dixon and Dixon-MT sequences of the right thigh on a 1.5 Teslas MRI scanner in 60 individuals, including 29 late onset Pompe disease patients, 2 patients with McArdle disease, and 29 age and sex matched healthy controls. FF and MTR were estimated. Muscle function using several muscle function tests, including quantification of muscle strength, timed test quality of life scales, conventional spirometry obtaining forced vital capacity while sitting and in the supine position, were assessed in all patients.

Results: MTR was significantly lower in Pompe patients compared with controls (45.5 ± 8.5 vs. 51.7 ± 2.3 , Student *T*-test, $p < 0.05$). There was a negative correlation between the MTR and FF muscles studied (correlation coefficient: -0.65 , Spearman test: $p < 0.05$). MTR correlated with most of the muscle function test results. We analyzed if there was any difference in MTR values between Pompe patients and healthy controls in those muscles that did not have an increase in fat, a measure that could be related to the

presence of glycogen in skeletal muscles, but we did not identify significant differences except in the adductor magnus muscle (48.4 ± 3.6 in Pompe vs. 51 ± 1.3 in healthy controls, Student *T*-test = 0.023).

Conclusions: MTR is a sensitive tool to identify muscle loss in patients with Pompe disease and shows a good correlation with muscle function tests. Therefore, the MT technique can be useful in monitoring muscle degeneration in Pompe disease in clinical trials or natural history studies.

Keywords: late onset Pompe disease, lower limb muscle, magnetic transfer ratio, intramuscular fat fraction, muscle function tests

INTRODUCTION

Magnetization transfer (MT) imaging is a magnetic resonance (MRI) technique that exploits the magnetization exchange between water and tissue protons present in different environments. In normal tissue, hydrogen protons are present in two compartments: the so-called “free pool” with mobile protons in free water and a second compartment called the “bound pool,” consisting of protons bound to proteins and other macromolecules, such as glycogen (1). Protons within the free pool are responsible for the conventional MRI signal because they have a long and easily detectable T2 signal; on the other hand, protons bound to macromolecules have short T2 values due to their highly restricted motion and are not detected in routine MRI.

The interaction between these two compartments can be probed by measuring the exchange of energy from the bound to the free pool of protons. This is achieved by applying a special radiofrequency (RF) pulse called MT pulse (a low-power RF saturation pulse) that gives origin to the MT effect (2). The MT effect can be used to create additional contrast (MTC) in different tissues, and it is widely used in MR angiography, enhancing the representation of smaller peripheral branches of the vessels (3), or in multiple sclerosis in which the background suppression improves detection of acute lesions (4). The MT effect can also be quantified obtaining the magnetization transfer ratio (MTR), which provides insight into relaxation and exchange rates of free water and macromolecules (5).

Musculoskeletal tissue displays a pronounced MT effect, and it is already demonstrated to be a sensitive measure of muscle damage in patients with neuromuscular conditions, such as limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) or Charcot-Marie-Tooth disease, which are disorders characterized by progressive muscle fiber loss and replacement by fatty tissue (6, 7). Nevertheless, the utility of MT has not been tested in Pompe disease yet, a disease in which there is an accumulation of glycogen within muscle fibers leading to cell death and replacement by fat. Estimation of the intramuscular fat fraction (FF) using the Dixon technique in Pompe patients is a useful biomarker for the follow-up of patients as we demonstrate that there is a progressive accumulation of fat in the skeletal muscles that precedes changes in muscle function tests in patients that have already started enzyme replacement therapy (8). However, presymptomatic

patients do not always show an increase in fat accumulation even if they develop muscle weakness, suggesting that the identification of changes related to glycogen accumulation could be useful to monitor progression of the disease, especially in these presymptomatic cases. Our hypothesis is that MT could identify early structural changes related to the accumulation of glycogen before degeneration of the muscle fibers to substitution by fatty tissue takes place in the muscles. To confirm our hypothesis, we studied a cohort of patients with late-onset Pompe disease (LOPD) using the MT technique and compared the results with those obtained in healthy controls. Additionally, we correlated MTR values with intramuscular FF and muscle function tests.

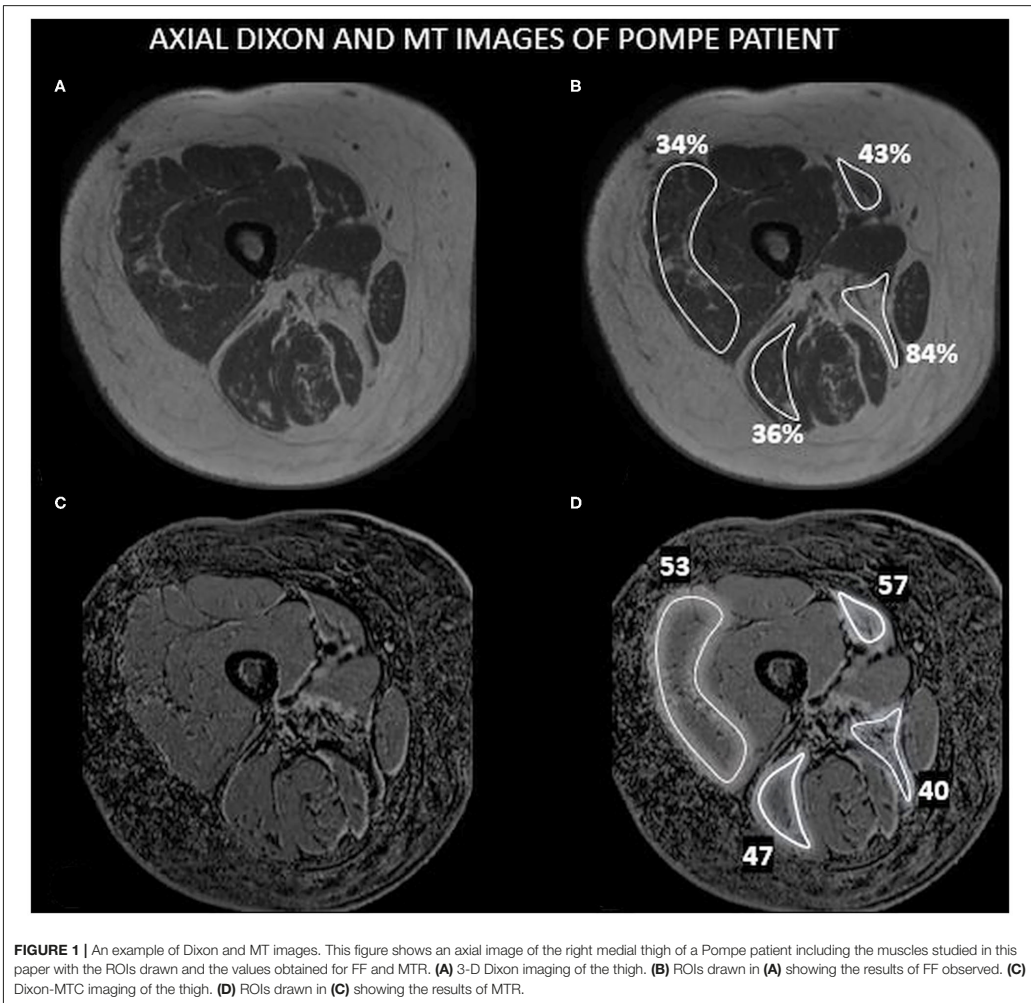
METHODS

Study Design and Participants

This is a transversal cross-sectional study involving 60 individuals who were studied at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP) in Barcelona. The study is registered in *ClinicalTrials.gov* with the identifier NCT01914536. The HSCSP ethics committee approved the study, and all participants signed an informed consent form. All study procedures were performed in accordance with Spanish regulations.

The inclusion criteria for the study were (1) genetically confirmed diagnosis of Pompe disease or McArdle disease; (2) no contraindications to MRI; and (3) willingness to complete all muscle function tests, respiratory assessment, and patient-reported outcomes measures. As control, we included a group of healthy volunteers age- and sex-matched with the Pompe patients. We ruled out other neuromuscular conditions in all participants in the study based on clinical data and results of complementary tests, such as blood analysis, spinal MRI, or EMG when needed.

All patients were studied by three physiotherapists with long experience in neuromuscular disorders at HSCSP. The physiotherapists evaluated muscle function using the following tests: the 6-min walking test, time to walk 10m, timed up-and-go test, time to climb up and down four steps, and the Motor Function Measure 20-item scale (MFM-20). All timed tests were performed asking the patient to not use aids for walking. Muscle strength was studied using both the Medical Research Council (MRC) scale and hand-held myometry. Daily life activities were studied using the activity limitations scale



for patients with upper and/or lower limb impairments, and quality of life was analyzed using both the Individualized Neuromuscular Quality of Life Questionnaire and the Short Form 36 questionnaire. We obtained forced vital capacity (FVC), both seated and lying down, using the Carefusion Microlab ML 3500 MK8 spirometer (Carefusion, Yorba Linda, CA, USA). These last two tests were added due their being commonly used in Pompe disease patients to measure their clinical status (9). Finally, Creatine kinase levels in serum were quantified in the HSCSP biochemistry laboratory following standard protocols.

MRI

All patients were examined in a 1.5 MR system (1.5 Achieva dStream; Philips, Best, NL) at HSCSP in the supine position with stretched legs using a 32-channel body coil. Axial 3-D Dixon FFE on the middle third of both thighs was performed with the following parameters: TR/TE1/TE2 = 5.78/1.8/4 ms, flip angle = 15, FOV = 520 × 340 × 300, acquired voxel size = 1 × 1 × 3 mm³; acquisition time was 2 min 33 s. Also, another 3-D Dixon FFE sequence was acquired with and without an off-resonance magnetization transfer contrast prepulse active, TR/TE1/TE2 = 32/1.8/4 ms, flip angle = 15, FOV = 400 × 200 × 114 mm,

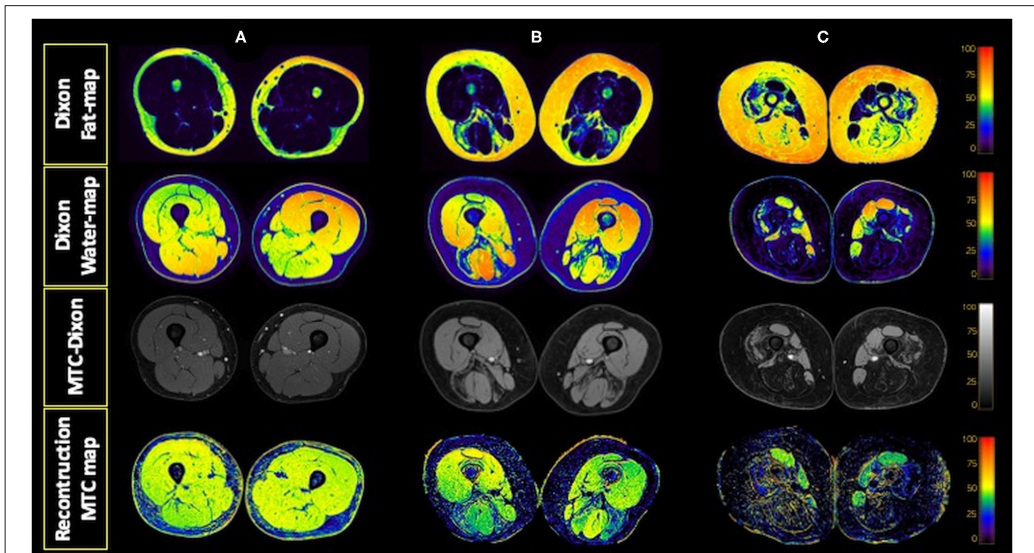


FIGURE 2 | Dixon water and fat maps and MTC-Dixon images obtained. Examples of fat and water maps generated from the data obtained with the Dixon sequence and of the images obtained with the MTC-Dixon sequence and the map generated. Axial sections of the thighs of a control (A) and two patients with Pompe disease, one with moderate involvement (B) and the other with severe muscle involvement (C).

TABLE 1 | Mean demographic and clinical data of the patients included in the study.

	Pompe	McArdle	Controls
Individuals (n)	29	2	29
Age at MRI	41.2 ± 21.3 y.o.	44 and 38 y.o	45.2 ± 22.7 y.o.
Use of ERT (n)	21		
Aids for walking (n)	12	–	–
Need of ventilation (n)	11	–	–

MRI, magnetic resonance imaging; ERT, enzymatic replacement therapy; N, number of patients.

acquired voxel size = 1 × 1 × 3 mm³; total acquisition time for images with and without MTC module active was 7 min 58 s.

Analysis

We analyzed both sequences in the middle right thigh of all patients. Regions of interest (ROIs) were manually drawn by three investigators on one slice of the following muscles: vastus lateralis (VL), sartorius (Sar), the long head of the biceps femoris (BLH), and adductor magnus (AM), keeping a reasonable distance from the fascia and subcutaneous fat tissue. FF was obtained using a Philips Research Image Development Environment (PRIDE) tool developed for this purpose. MTR was calculated using the following formula in which Mo and MSat refer to the images without and with the saturation prepulse.

MTR values were expressed in percentage. **Figure 1** shows an example of MT imaging, and the ROIs drawn and **Figure 2** shows an example of the images obtained in this study.

$$MTR = \left(\frac{Mo - MSat}{Mo} \right) \quad (1)$$

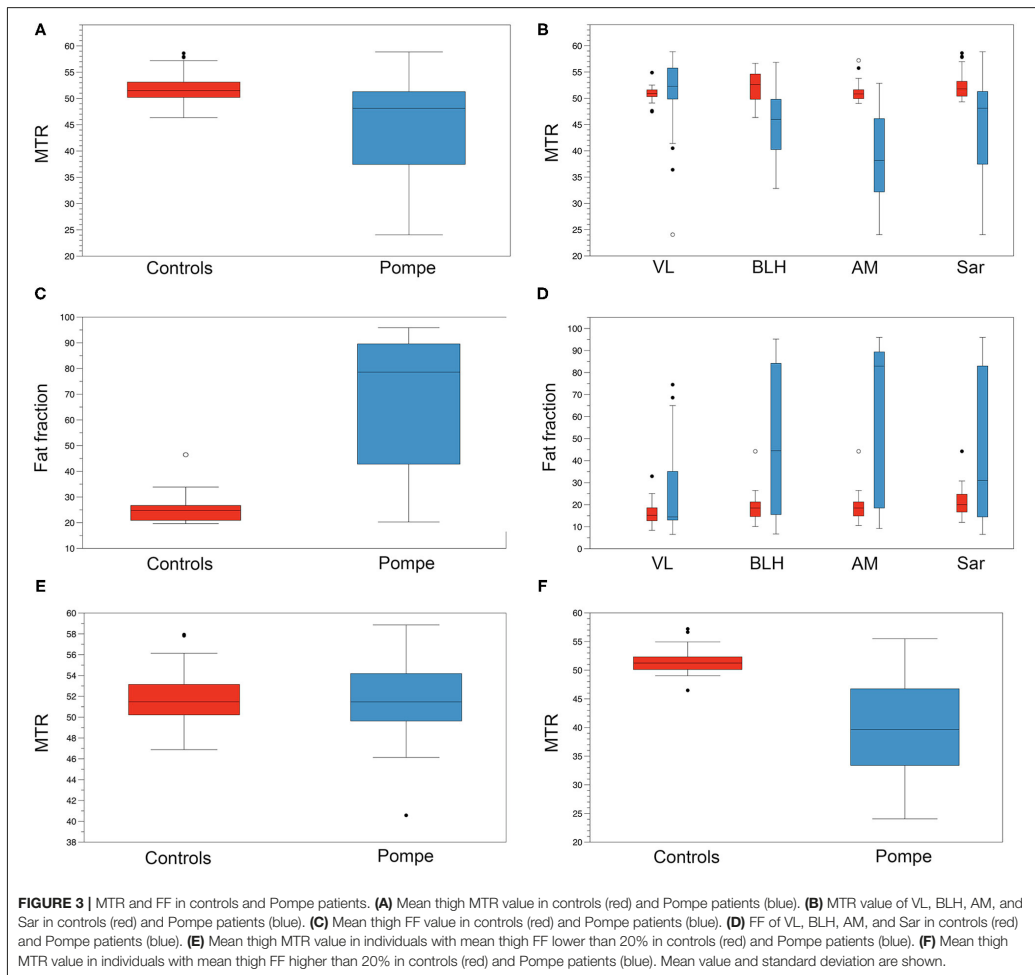
Statistics

We confirmed that the variables to be analyzed were normally distributed using a Kolmogorov–Smirnov test, and therefore, parametric statistical studies were used. We used the Student *T*-test to analyze if the differences observed in FF and MTR between Pompe and controls were statistically significant. We used the Pearson test to study if correlations between variables were significant. We consider that a correlation was good if the correlation coefficient was higher than 0.6. The significance level for all statistical studies was set at *p* < 0.05, and *post-hoc* Bonferroni corrections were used when needed. Statistical studies were performed with SPSS for Mac computers (Version 21, SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTS

Patients Included

We included in the study 29 LOPD patients of which 23 patients were symptomatic and treated with enzymatic replacement therapy (ERT) and 6 patients were presymptomatic and not



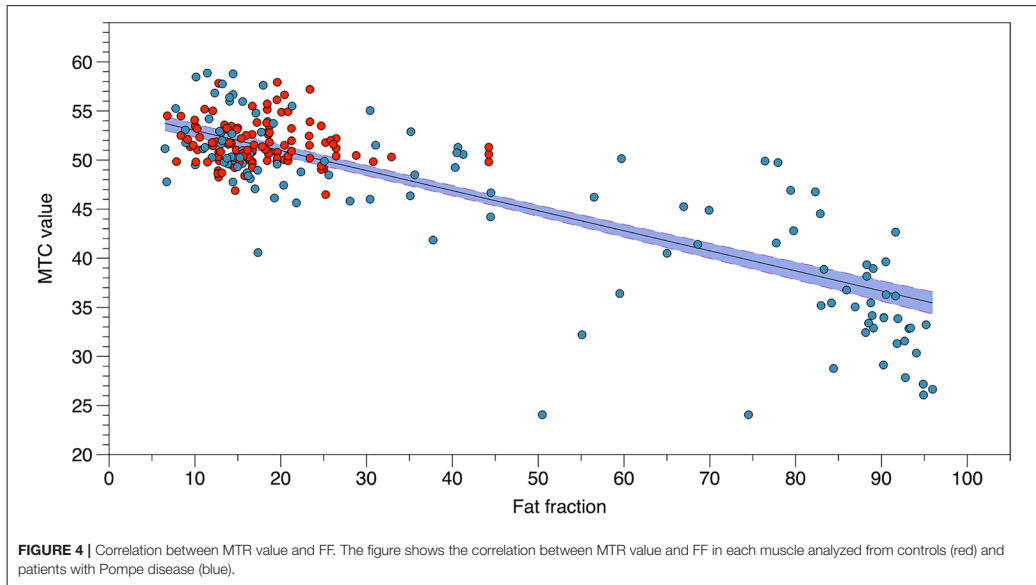
treated with ERT. Clinical features of LOPD patients included in this study have been reported before (10). We also included in the study 2 patients with McArdle disease without muscle weakness at clinical examination and 29 healthy age- and sex-matched controls. Main demographic and clinical data of the individuals included in the study are summarized in **Table 1**.

MRI Results

We found lower MTR average value in LOPD patients' muscles (45.5 ± 8.5) compared with controls (51.7 ± 2.3) (Student *T*-test, $p < 0.001$; **Figure 3A**). When analyzed separately, we identified significant lower values in AM and BLH but not in VL nor Sar in LOPD patients compared with controls (**Figure 3B**).

MTR average value was lower in symptomatic compared with presymptomatic (41.9 ± 9.8 vs. 51 ± 4 , respectively, Student *T*-test $p < 0.001$). There were no differences in MTR between controls and presymptomatic patients.

We found higher mean thigh FF in LOPD patients' muscles ($44.9 \pm 32.8\%$) compared with controls ($17.86 \pm 6.8\%$) (Student *T*-test, $p < 0.001$; **Figure 3C**). When analyzed separately, we identified higher values in AM, BLH, and VL but not in Sar in LOPD patients compared with controls (**Figure 3D**). Mean thigh FF was significantly higher in symptomatic compared with presymptomatic LOPD patients (32.6 ± 7.7 vs. 21.24 ± 7.3 , respectively, Student *T*-test $p < 0.001$). There were no differences in mean thigh FF between controls and presymptomatic patients.



We did not identify significant differences in MTR in those muscles with FF lower than 20% between LOPD and healthy controls when the four individual muscles were analyzed together (Figures 3E,F). However, when analyzed separately, we observed significant differences in MTR in the AM (48.4 ± 3.6 in Pompe vs. 51 ± 1.3 in controls, Student *T*-test = 0.023). We observed a negative correlation between MTR value and FF in muscles studied (correlation coefficient: -0.65 , Spearman test $p < 0.0001$; Figure 4).

Correlation With Results of the Muscle Function Tests

We observed a significant correlation between mean thigh MTR value and the results of muscle function tests, including timed tests, such as the 6MWT or the time to walk 10 m, and measures of muscle strength, such as the composite MT value of the lower limbs. Moreover, we identified a good correlation between individual muscle MTR values and specific muscle assessments as is shown in Table 2.

DISCUSSION

We observed that MT is an indirect measurement of muscle loss in LOPD patients, and it correlates with results of different muscle function tests commonly used in clinical trials and natural history studies. We also identified a good correlation between muscle FF and muscle MTR value, suggesting that MTR values decrease in relation to progressive loss of muscle fibers that are replaced by fatty tissue.

TABLE 2 | Correlation between MTC values and results of the muscle function tests.

	Mean MTC value	
	Correlation coefficient	Significance
Time to walk 10 m	-0.72	0.0001
6 MWT	0.813	0.0001
Time up go	-0.78	0.0001
Time climb up 4 Steps	-0.79	0.0001
Time go down 4 Steps	-0.75	0.0001
MRC lower limbs	0.71	0.0001
Activlim	0.59	0.001
CK levels	0.12	0.71
	MTC adductor magnus	
Hip adduction	0.63	0.0001
	MTC biceps long head	
Knee flexion	0.54	0.003
	MTC vastus lateralis	
Knee extension	0.38	0.52

6MWT, 6 min walking Test. Pearson test was performed, and *p*-values are shown.

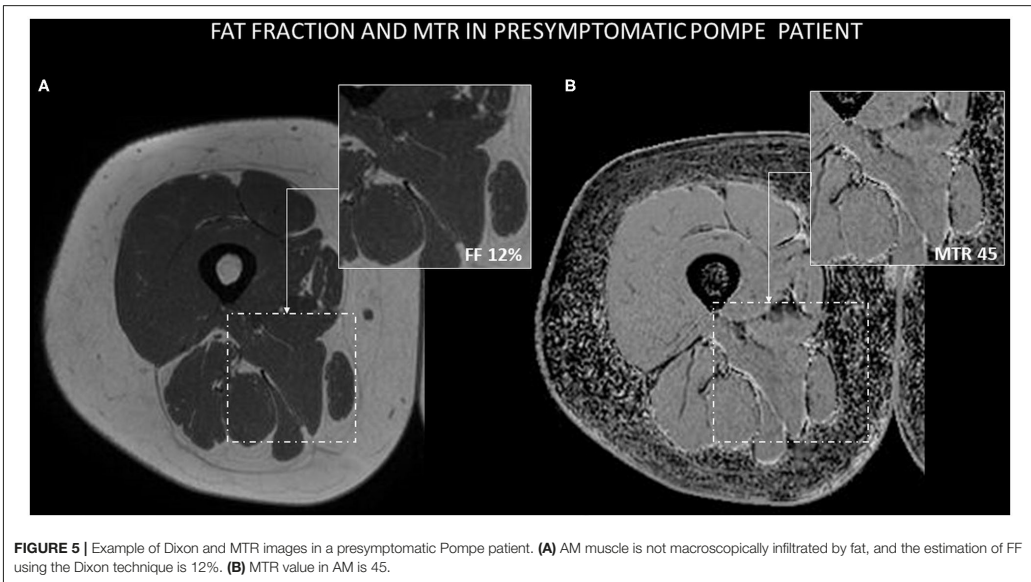


FIGURE 5 | Example of Dixon and MTR images in a presymptomatic Pompe patient. **(A)** AM muscle is not macroscopically infiltrated by fat, and the estimation of FF using the Dixon technique is 12%. **(B)** MTR value in AM is 45.

Moreover, Dixon has proved to be useful to follow up the progression of fat replacement in LOPD patients in longitudinal studies. Previous studies have identified risk factors associated with FF, such as early age of onset of symptoms and disease duration (8).

Based on these results, Dixon sequences are being implemented in the new clinical trials that are being designed in this disease. MT imaging is based on the magnetization exchange between protons present in the free-water compartment and protons bound to macromolecules. The more hydrated the macromolecules are, the more magnetization transfer is obtained. MT from fat is low as it is a hydrophobic tissue. Hydrophobic properties of lipids cause them to experience limited MT; for that reason, MT is generally low in tissues with high fat content (14–16). However, it is known that fat generates chemical shift artifacts that could compromise the characterization and analysis of tissue. The use of traditional fat-suppression techniques in MT studies can affect the MTR measurements, but the use of water images obtained from Dixon sequences avoids possible confounding effects derived from the fat signal for MTR calculation (17, 18). For these reasons, in this study, we decided to use a two-point Dixon sequence with an off-resonance prepulse. However, the signal obtained in muscles replaced by fat could also be influenced by other concomitant components, such as fibrotic tissue or inflammation. Therefore, MTR is not directly measuring only fat replacement, but in our opinion, is an indirect measurement of loss of muscle fibers that reduce the values obtained. In this sense, our results are similar to the ones reported in other neuromuscular diseases, such as LGMD, inclusion body myositis, Charcot-Marie-Tooth

disease, or spinal muscle atrophy (6, 7). We observed lower MTR values in symptomatic patients compared with non-symptomatic patients and controls. To fully understand the biophysical origins of MT in Pompe muscle, a more detailed quantitative MT study is warranted that takes into account pool sizes, T1, lipids, and multiple transfer magnetization transfer mechanisms (5, 19).

Our initial hypothesis was that MT could be useful as an indirect measurement of glycogen. Glycogen is a highly hydrated molecule, and therefore, it was tempting to hypothesize that, in patients with Pompe disease who accumulate glycogen in their muscles, MTR could increase because of the accumulation of water bound to the glycogen. In this study, we observed that fat replacement is a confounding factor because it reduces the MTR signal considerably and makes difficult the identification of the effect of other tissue components on MTR. However, MT values in muscles with low levels of fat replacement (<20% FF) are not statistically different between healthy controls and LOPD patients except for the AM. Additionally, we have not seen differences between presymptomatic non-treated and symptomatic treated patients in the MTR values in muscles with FF lower than 20% (Figure 5). There are two potential explanations for our findings. On one hand, it is possible that the amount of glycogen accumulated in these muscles was too low to induce any change in MTR. It is well-known that LOPD patients accumulate less glycogen than infantile onset patients (IOPD). Muscle biopsies of LOPD patients can show mild accumulation of glycogen or even be normal, and muscle biopsies in IOPD patients are characterized by a massive accumulation of glycogen. On the other hand and based on the physiopathology of the disease, it is probable that

the accumulation of glycogen was more prominent in those muscles undergoing fatty replacement, but if that was the case, MTR could be influenced by the loss of muscle fibers and expansion of fat, producing, as a result, a decrease in MTR values (20–22). We have also tested MT in 2 patients with glycogenosis type V, usually known as McArdle disease, who had mean thigh FF lower than 10%, and we have not seen any change in MTR values compared with controls. In our opinion, to completely rule out MTR as an indirect measure of glycogen in patients, we should explore it in pretreated IOPD patients because they accumulate larger amounts of glycogen in their muscles.

Interestingly, we have seen a statistically significant decrease in MTR values in the AM muscle in presymptomatic patients without an increase in FF. We previously identified that this muscle is one of the muscles earlier replaced by fat in the progression of the disease (8). Two of these patients developed mild hip adduction weakness soon after being scanned in this study. In our opinion, this result probably reflects the loss of muscle fibers that could be the cause of the weakness rather than accumulation of glycogen as we would expect an increase in the MTR values. It is possible that MT has high sensitivity to detect mild muscle fiber loss even when these fibers have not been replaced by fat yet, and Dixon studies do not detect an increase in fatty tissue. Accordingly, McDaniel et al. reported a decrease in MTR value in muscles of patients with muscular dystrophies that were not replaced by fat, which could be related, in our opinion, to the existence of early muscle damage not yet leading to fat replacement.

The main limitation of our study is that we have not used a gold standard test to study the amount of glycogen present in the muscles of the patients, such as a muscle biopsy or specific imaging sequences able to identify glycogen, such as ¹³C and ¹H spectroscopy (23), chemical exchange saturation transfer imaging of glycogen (GlycoCEST) (24–26), and the recently described nuclear Overhauser enhancement of glycogen (Glyco-nOe) (27, 28). All these sequences are able to identify glycogen in muscles and/or liver but are not available in conventional hospitals not focused on research. Some of the advantages of the MT technique are that it is available in many hospitals, does not require a specific coil, and the acquisition is relatively fast and easy to analyze.

We have seen that MT values correlate with FF and, therefore, could be used to monitor disease progression over time although this should be explored in future longitudinal studies. The only longitudinal study published so far shows that MT measurements decreased in Charcot-Marie-Tooth and IBM patients after 1 year of follow-up in relation to the accumulation of fatty tissue identified using Dixon (29).

REFERENCES

1. Sinclair CDJ, Samson RS, Thomas DL, Weiskopf N, Lutti A, Thornton JS, et al. Quantitative magnetization transfer in *in vivo* healthy human skeletal muscle at 3 T. *Magn Reson Med*. (2010) 64:1739–48. doi: 10.1002/mrm.22562

CONCLUSION

The MTR estimation constitutes a sensitive tool for the identification of cellular damage in patients with Pompe disease. It is correlated with muscle loss and muscle function tests. Therefore, MT should be further explored as a tool for monitoring muscle degeneration in Pompe disease in clinical trials or natural history studies.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

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

ETHICS STATEMENT

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

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CN-P and PM: concept and design of the study, acquisition and analysis of data, and drafting the paper. AA-J and JA-P: acquisition and analysis of data, and drafting the paper. DR-L, JL-R, IB, IP, and BM-M: concept and design of the study, acquisition of data, and drafting the paper. JS-G, AM-N and GW: concept and design of the study, and drafting the paper. SS: concept and design of the study, coordination of the study, and drafting the paper. JD-M: concept and design of the study, obtaining funding for the study, acquisition and analysis of data, and drafting the paper. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was sponsored by grants from Sanofi Genzyme and from the Spanish Ministry of Health, Fondos FEDER-ISCIH PI18/01525 to JD-M. The company has neither reviewed the data nor suggested changes in any of the conclusions of the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank all members of the Spanish Association of Patients with Glycogenosis (www.glucoenosis.org) and the Philips Healthcare engineer team for their collaboration. We also thank all patients and relatives for their collaboration in this study.

2. Henkelman RM, Stanisz GJ, Graham SJ. Magnetization transfer in MRI: a review. *NMR Biomed*. (2001) 14:57–64. doi: 10.1002/nbm.683
3. Catalano C, Pavone P, Laghi A, Faroni J, Clementi M, Di Girolamo M, et al. Magnetic resonance angiography of the intracranial circle using magnetization transfer contrast (MTC). *Radiol Med*. (1995) 89:245.

4. Horsfield MA. Magnetization transfer imaging in multiple sclerosis. *J Neuroimaging*. (2005) 15(Suppl. 4):58–67. doi: 10.1177/1051228405282242
5. Li K, Dortch RD, Kroop SF, Huston JW, Gochberg DF, Park JH, et al. A rapid approach for quantitative magnetization transfer imaging in thigh muscles using the pulsed saturation method. *Magn Reson Imaging*. (2015). 33:709–17. doi: 10.1016/j.mri.2015.03.003
6. Kollmer J, Kessler T, Sam G, Hayes JM, Lentz SI, Heiland S, et al. Magnetization transfer ratio: a quantitative imaging biomarker for 5q spinal muscular atrophy. *Eur J Neurol*. (2020) 28:331–40. doi: 10.1111/ene.14528
7. McDaniel JD, Ulmer JL, Prost RW, Franczak MB, Jaradeh S, Hamilton CA, et al. Magnetization transfer imaging of skeletal muscle in autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy. *J Comput Assist Tomogr*. (1999) 23:609–14. doi: 10.1097/00004728-199907000-00023
8. Nuñez-Peralta C, Alonso-Pérez J, Llauger J, Segovia S, Montesinos P, Belmonte I, et al. Follow-up of late-onset Pompe disease patients with muscle magnetic resonance imaging reveals increase in fat replacement in skeletal muscles. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. (2020) 11:1032–46. doi: 10.1002/jcsm.12555
9. Berger KI, Kanters S, Jansen JP, Stewart A, Sparks S, Haack KA, et al. Forced vital capacity and cross-domain late-onset Pompe disease outcomes: an individual patient-level data meta-analysis. *J Neurol*. (2019) 266:2312–21. doi: 10.1007/s00415-019-09401-1
10. Figueroa-Bonaparte S, Llauger J, Segovia S, Belmonte I, Pedrosa I, Montiel E, et al. Quantitative muscle MRI to follow up late onset Pompe patients: a prospective study. *Sci Rep*. (2018) 8:10898. doi: 10.1038/s41598-018-29170-7
11. Paoletti M, Pichicchio A, Piccinelli SC, Tasca G, Berardinelli AL, Padovani A, et al. Advances in quantitative imaging of genetic and acquired myopathies: clinical applications and perspectives. *Front Neurol*. (2019) 10:78. doi: 10.3389/fneur.2019.00078
12. Diaz-Manera J, Walter G, Straub V. Skeletal muscle magnetic resonance imaging in Pompe disease. *Muscle Nerve*. (2020). doi: 10.1002/mus.27099. [Epub ahead of print].
13. Nuñez-Peralta C, Alonso-Pérez J, Díaz-Manera J. The increasing role of muscle MRI to monitor changes over time in untreated and treated muscle diseases. *Curr Opin Neurol*. (2020) 33:611–20. doi: 10.1097/WCO.0000000000000851
14. Kim H, Booth CJ, Pinus AB, Chen P, Lee A, Qiu M, et al. Induced hepatic fibrosis in rats: hepatic steatosis, purpose: methods: results: conclusion: distribution. *Radiology*. (2008). 247:696–705. doi: 10.1148/radiol.2473070605
15. Shah B, Anderson SW, Scalaria J, Jara H, Soto JA. Quantitative MR imaging: physical principles and sequence design in abdominal imaging. *Radiographics*. (2011) 31:867–80. doi: 10.1148/rg.313105155
16. Yarnykh VL, Tartaglione EV, Ioannou GN. Fast macromolecular proton fraction mapping of the human liver *in vivo* for quantitative assessment of hepatic fibrosis. *NMR Biomed*. (2015) 28:1716–25. doi: 10.1002/nbm.3437
17. Smith AK, Dortch RD, Dethrage LM, Lytle BD, Kang H, Welch EB, et al. Incorporating dixon multi-echo fat water separation for novel quantitative magnetization transfer of the human optic nerve *in vivo*. *Magn Reson Med*. (2017) 77:707–16. doi: 10.1002/mrm.26164
18. Ercan E, Varma G, Dimitrov IE, Xi Y, Pinho MC, Yu FF, et al. Combining inhomogeneous magnetization transfer and multipoint Dixon acquisition: potential utility and evaluation. *Magn Reson Med*. (2020) 85:2136–44. doi: 10.1002/mrm.28571
19. Zhou Y, van Zijl PCM, Xu J, Yadav NN. Mechanism and quantitative assessment of saturation transfer for water-based detection of the aliphatic protons in carbohydrate polymers. *Magn Reson Med*. (2020) 85:1643–54. doi: 10.1002/mrm.28503
20. Sinclair CDJ, Morrow JM, Miranda MA, Davagnanam I, Cowley PC, Mehta H, et al. Skeletal muscle MRI magnetisation transfer ratio reflects clinical severity in peripheral neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. (2012) 83:29–32. doi: 10.1136/jnnp.2011.246116
21. Brown JWL, Chowdhury A, Kanber B, Prados Carrasco F, Eshaghi A, Sudre CH, et al. Magnetisation transfer ratio abnormalities in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler J*. (2019) 26:679–87. doi: 10.1177/1352458519841810
22. Schmierer K, Scaravilli F, Altmann DR, Barker GJ, Miller DH. Magnetization transfer ratio and myelin in postmortem multiple sclerosis brain. *Ann Neurol*. (2004) 56:407–15. doi: 10.1002/ana.20202
23. Heinicke K, Dimitrov IE, Romain N, Cheshkov S, Ren J, Malloy CR, et al. Reproducibility and absolute quantification of muscle glycogen in patients with glycogen storage disease by C NMR spectroscopy at 7 Tesla. *PLoS ONE*. (2014). 9:e108706. doi: 10.1371/journal.pone.0108706
24. Zijl PCM Van, Jones CK, Ren J, Malloy CR, Sherry AD. MRI detection of glycogen *in vivo* by using chemical exchange saturation transfer imaging (glycoCEST). *Proc Natl Acad Sci USA*. (2007). 104:4359–64. doi: 10.1073/pnas.0700281104
25. Stender S, Zaha VG, Malloy CR, Sudderth J, DeBerardinis RJ, Park JM. Assessment of rapid hepatic glycogen synthesis in humans using dynamic ¹³C magnetic resonance spectroscopy. *Hepatol Commun*. (2020) 4:425–33. doi: 10.1002/hep4.1458
26. Miller CO, Cao J, Chekmenev EY, Damon BM, Cherrington AD, Gore JC. Noninvasive measurements of glycogen in perfused mouse livers using chemical exchange saturation transfer NMR and comparison to (¹³C) NMR spectroscopy. *Anal Chem*. (2015) 87:5824–30. doi: 10.1021/acs.analchem.5b01296
27. Zhou Y, van Zijl PCM, Xu X, Xu J, Li Y, Chen L, et al. Magnetic resonance imaging of glycogen using its magnetic coupling with water. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2020) 117:3144–9. doi: 10.1073/pnas.1909921117
28. Vinogradov E. MRI monitoring of energy storage *in vivo* using magnetization pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2020) 117:5092–94. doi: 10.1073/pnas.2001048117
29. Morrow JM, Sinclair CD, Fischmann A, Machado PM, Reilly MM, Yousry TA, et al. MRI biomarker assessment of neuromuscular disease progression: a prospective observational cohort study. *Lancet Neurol*. (2016) 15:65–77. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00242-2

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

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

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



Corrigendum: Magnetization Transfer Ratio in Lower Limbs of Late Onset Pompe Patients Correlates With Intramuscular Fat Fraction and Muscle Function Tests

Claudia Nuñez-Peralta^{1,2*}, Paula Montesinos³, Alicia Alonso-Jiménez⁴, Jorge Alonso-Pérez⁵, David Reyes-Leiva⁵, Javier Sánchez-González³, Jaume Llauger-Roselló¹, Sonia Segovia^{5,6}, Izaskun Belmonte⁷, Irene Pedrosa⁷, Antonio Martínez-Noguera¹, Briano Matellini-Mosca¹, Glenn Walter⁸ and Jordi Díaz-Manera^{5,6,9*}

OPEN ACCESS

Approved by:

Frontiers Editorial Office,
Frontiers Media SA, Switzerland

*Correspondence:

Claudia Nuñez-Peralta
cnunez@santpau.cat
Jordi Díaz-Manera
jordi.diaz-manera@newcastle.ac.uk

Specialty section:

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

Received: 17 June 2021

Accepted: 18 June 2021

Published: 13 July 2021

Citation:

Nuñez-Peralta C, Montesinos P,
Alonso-Jiménez A, Alonso-Pérez J,
Reyes-Leiva D, Sánchez-González J,
Llauger-Roselló J, Segovia S,
Belmonte I, Pedrosa I,
Martínez-Noguera A,
Matellini-Mosca B, Walter G and
Díaz-Manera J (2021) Corrigendum:
Magnetization Transfer Ratio in Lower
Limbs of Late Onset Pompe Patients
Correlates With Intramuscular Fat
Fraction and Muscle Function Tests.
Front. Neurol. 12:727020.
doi: 10.3389/fneur.2021.727020

¹ Radiology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain, ² Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ³ Philips Healthcare Iberia, Madrid, Spain, ⁴ Neuromuscular Reference Center, Neurology Department, University Hospital of Antwerp, Edegem, Belgium, ⁵ Neuromuscular Disorders Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain, ⁶ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain, ⁷ Rehabilitation Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain, ⁸ Department of Physiology and Functional Genomics, University of Florida, Gainesville, FL, United States, ⁹ John Walton Muscular Dystrophy Research Center, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, United Kingdom

Keywords: late onset Pompe disease, lower limb muscle, magnetic transfer ratio, intramuscular fat fraction, muscle function tests

A Corrigendum on

Magnetization Transfer Ratio in Lower Limbs of Late Onset Pompe Patients Correlates With Intramuscular Fat Fraction and Muscle Function Tests

by Nuñez-Peralta C, Montesinos P, Alonso-Jiménez A, Alonso-Pérez J, Reyes-Leiva D, Sánchez-González J, et al. (2021). *Front. Neurol.* 12:634766. doi: 10.3389/fneur.2021.634766

In the published article, there was an error regarding the affiliation(s) for Claudia Nuñez-Peralta. As well as having affiliation(s) **1**, they should also have **2Department de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain**.

The authors apologize for this error and state that this does not change the scientific conclusions of the article in any way. The original article has been updated.

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



RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS



En la presente tesis hemos utilizado dos técnicas cuantitativas de resonancia magnética (la técnica Dixon y la transferencia de magnetización) para identificar y caracterizar los cambios estructurales en los músculos esqueléticos de pacientes con enfermedad de Pompe de inicio tardío.

En el primer trabajo recogido en el **artículo 1**, cuantificamos la cantidad de grasa intramuscular en los músculos de una cohorte de 36 pacientes con LOPD, es un estudio prospectivo de 4 años de duración, con visitas anuales. Cada visita incluía la evaluación del estado clínico mediante pruebas funcionales (MRC, dinamometría, 6MWT, 10MWT, CVF, escalas de actividades de la vida diaria) y una RM muscular utilizando la secuencia 2 punto-Dixon. La cohorte incluía 23 pacientes sintomáticos en tratamiento con TRE y 13 pre-sintomáticos no tratados. Durante el estudio 4 pacientes pre-sintomáticos mostraron debilidad muscular e iniciaron TRE, a estos 4 pacientes los analizamos por separado.

En los pacientes sintomáticos las pruebas de fuerza muscular evaluadas mediante la escala MRC, miometría, y la función respiratoria (CVF) mediante espirometría, fueron las que más progresaron al final del estudio. La disminución de la fuerza muscular fue más notable en la flexión y extensión de la cadera. En los pacientes pre-sintomáticos no encontramos diferencias significativas en ninguna de las pruebas funcionales como función muscular, la fuerza muscular, la función respiratoria ni en las escalas de actividades de vida diaria.

Se realizó una secuencia 3D Dixon-FFE de pelvis y muslos en todos los pacientes, con los siguientes parámetros: TE 1.8/4 ms, TR 5.78 ms, flip-angle: 15°. Para la cuantificación de la FF utilizamos un programa informático diseñado para tal propósito por la empresa Philips, llamado Research Image Development Environment (PRIDE). Tras la obtención de las imágenes, dibujamos manualmente el área de cada músculo teniendo cuidado en no incluir tejido subcutáneo. Para obtener una

muestra representativa de todo el músculo, estudiamos 4 cortes en los músculos: *vasto intermedio*, *vasto lateral*, *vasto medial*, *recto femoral*, *aductor mayor*, *sartorio*, *gracilis*, *semitendinoso* y *semimembranoso*. En 3 cortes en los músculos: *bíceps femoral cabeza larga-cabeza corta* y *aductor largo* y en 1 corte en los músculos *paravertebrales* y *psoas*. El tiempo aproximado de análisis de las imágenes (cuantificación de FF) por paciente fue entre 45-60 minutos.

Realizamos un total de 4 visitas a todos los pacientes de nuestra cohorte. En cada visita adquirimos la secuencia de RM 3D Dixon-FFE. Calculamos el área del músculo, la fracción de músculo, y la FF de los músculos paravertebrales, del psoas y de cada uno de los músculos que conforman los muslos. El coeficiente de FF grasa fue definido como: $\text{Fat}/(\text{Fat} + \text{Water})$. En el grupo de pacientes sintomáticos tratados con TRE observamos un incremento significativo de FF del muslo de $5.7 \pm 3.7\%$ al final del estudio, que se corresponde con un incremento anual de 1.9%. El incremento de FF fue variable de un paciente a otro, algunos con más del 13 % y otros menos del 1%. Estos hallazgos sugieren que aparte del tratamiento deben existir otros factores que influyen en esta variabilidad. Para respondernos a esta interrogante, correlacionamos el incremento de FF con otros factores demográficos, clínicos y funcionales. El inicio precoz de los síntomas, mayor duración de tratamiento, una peor situación muscular y respiratoria en la visita basal, así como mayor fracción grasa al inicio del estudio se asocian con mayor incremento de la FF en la RM muscular.

Todos los músculos que conforman el muslo mostraron una progresión significativa de FF. Los músculos que presentaron mayor progresión de la FF fueron: *vasto lateral*, *bíceps femoral-cabeza larga* y *cabeza corta*, *semimembranoso*, *semitendinoso* y *gracilis*. En contraparte, no encontramos incrementos significativos de FF en los músculos paravertebrales, posiblemente debido a que al inicio del estudio dichos músculos ya presentaban valores altos de FF, sugiriendo que se afectan en fases iniciales de la enfermedad. Pensamos que al no haber muchas más fibras

musculares que puedan ser sustituidas por grasa, es lógico pensar que la FF no se va a incrementar en el tiempo.

En un estudio realizado por nuestro equipo se siguieron 32 pacientes con LOPD por periodo de un año. Todos estos pacientes están incluidos en el artículo 1 de la presente tesis. Observamos un incremento de la fracción grasa en los muslos del 1.7%. Otro estudio que efectuó un análisis retrospectivo de 14 pacientes LOPD tratados, identificaron un incremento significativo de la fracción grasa del 0.9%, en un periodo de un año. Este resultado podría estar influenciado por que estudiaron además de los músculos de los muslos, los músculos de las piernas que se afectan en fases avanzadas de la enfermedad, disminuyendo así el valor final de la fracción grasa⁹⁴. El incremento de la fracción grasa cercano al 2% que identificamos en el presente trabajo es cercano a los valores de los trabajos previamente descritos, y a diferencia de ellos, hemos demostrado que el incremento de la fracción grasa mantuvo una progresión estable durante los 3 años de seguimiento, a pesar de recibir tratamiento.

En los pacientes pre-sintomáticos, también observamos un incremento anual medio de la fracción de grasa del 0.8% que fue estadísticamente significativo a pesar de que las pruebas funcionales no mostraron cambios en este grupo de pacientes durante los 3 años de seguimiento, sugiriendo que el daño muscular comienza antes que se manifieste la debilidad muscular y estableciendo a la RM muscular; especialmente las técnicas destinadas a encontrar grasa muscular; como idóneas para realizar el seguimiento de estos pacientes. Al estudiar los músculos individualmente en este grupo de pacientes nos llamó la atención el comportamiento de dos músculos en especial: los músculos paravertebrales y el aductor mayor. Observamos que ambos músculos al inicio del estudio (visita 0) tenían valores altos de FF en pacientes pre-sintomáticos mayores de 25 años, mientras que se encontraban respetados en menores de 25 años, sugiriendo que

la edad podría tener un papel relevante en el proceso de degeneración muscular en esta enfermedad. En este sentido, observamos que la tasa de progresión de la FF era más elevada en pacientes mayores de 25 años, mientras que se encontraba estable en menores de 25 años.

Una de las características de la sustitución grasa en los pacientes con enfermedades musculares hereditarias, es que ésta no se produce al unisono en todos los músculos, sino que, parece existir un patrón de afectación progresiva que varía de una enfermedad en otra. Por ejemplo, existen enfermedades donde los músculos cuádriceps se afectan de forma precoz, como por ejemplo el déficit de disferlina, mientras que hay otras donde los cuádriceps se afectan de forma tardía, como en la enfermedad de Nonaka producida por mutaciones en el gen GNE¹⁰⁰. No sé conoce cuales son las causas que llevan a algunos músculos a afectarse antes que otros en las enfermedades hereditarias. Conocer la historia natural "radiológica" de estas enfermedades ha permitido describir patrones que son útiles para el diagnóstico, pero al mismo tiempo plantean la pregunta de qué cuál es el mejor músculo para seguir la progresión de la enfermedad.

Para seleccionar el músculo a utilizar en el seguimiento de los pacientes con EP decidimos analizar a los pacientes en función de la cantidad de grasa intramuscular que tenían en la visita basal. En el primer grupo de pacientes con valores bajos de FF inferiores al 15%; todos ellos pre-sintomáticos; los *músculos paravertebrales* muestran una tasa de progresión constante, a pesar de que ninguno de los pacientes de este grupo refirió síntomas ó tuvo debilidad muscular durante el seguimiento. En el segundo grupo con valores de FF entre 15% - 30% el músculo que mayor incremento de FF mostró fue el *bíceps femoral-cabeza larga*. Los músculos paravertebrales y aductor mayor ya tenían valores altos de FF al inicio del estudio. En el tercer grupo con valores de FF entre 31% - 45% los músculos que mostraron mayor incremento fueron el *bíceps femoral-cabeza corta*, *vasto intermedio* y *vasto lateral*. Los

músculos paravertebrales, aductor mayor, semimembranoso, semitendinoso y bíceps femoral-cabeza corta ya tenían valores altos de en la visita basal. Finalmente, en el último grupo de pacientes con valores de FF mayores al 45%, el único músculo que mostro una progresión uniforme y constante fue el *vasto lateral*. Todos los pacientes que conforman los últimos 3 grupos son sintomáticos.

Estos hallazgos son importantes para diseñar un estudio de seguimiento de pacientes con enfermedad de Pompe, dado que, si decidimos estudiar músculos con alto porcentaje de grasa basal, es muy probable que no observemos cambios en el tiempo ya que la FF no subiría significativamente. Por el contrario, si elegimos músculos que no se afectan hasta fases muy avanzadas de la enfermedad, como es el caso del vasto lateral, igualmente no identificaremos cambios, aunque la FF se incremente en otros músculos no analizados.

Desde un punto de vista radiológico hemos observado que los músculos paravertebrales son los primeros en ser afectados en la EP, probablemente, esto este, relacionado con síntomas frecuentemente reportados como escoliosis en pacientes juveniles y dolor lumbar o cambios en el patrón de la marcha en pacientes adultos. El músculo aductor mayor también está involucrado tempranamente en la progresión de la enfermedad y de hecho hemos observado que estos dos músculos ya están completamente reemplazados por grasa en la mayoría de nuestros pacientes sintomáticos. Por tanto, consideramos que estos músculos son buenos candidatos para el seguimiento en fases iniciales de la enfermedad. Los músculos del compartimiento posterior de los muslos son afectados más tardíamente y entonces pueden ser considerados buenos candidatos para monitorizar la fracción de grasa fases intermedias. Finalmente, los músculos vastos están involucrados en las fases más avanzados. De hecho, solo dos pacientes de nuestra corte tenían clara debilidad de la musculatura cuádriceps, el vasto lateral a la luz de nuestros resultados es un buen candidato para monitorizar la progresión de la FF en pacientes que están en un estadio clínico avanzado.

A los pocos meses del primer año de seguimiento (visita 1), 4 pacientes pre-sintomáticos manifestaron debilidad muscular e iniciaron tratamiento con TRE. Tuvimos la oportunidad de observar los cambios en la progresión de FF antes y después del inicio del tratamiento. Durante el primer año de seguimiento (pre-TRE) el incremento medio de FF fue de 3,39 %. Tras el inicio del tratamiento observamos un incremento medio de 1,7% sugiriendo que la TRE podría ser efectiva en retrasar la progresión del deterioro muscular. No obstante, al tratarse de una muestra muy reducida de pacientes estos resultados deben ser considerados con cautela.

Durante el estudio observamos que la cuantificación de la grasa en el músculo mediante la secuencia Dixon, tenía algunas limitaciones. La primera, los pacientes pre-sintomáticos menores de 25 años no mostraron incremento significativo de la FF. La segunda, dos pacientes menores de 20 años desarrollaron debilidad muscular, uno durante el estudio (de 19 años) y otro paciente inmediatamente al finalizar el estudio (de 12 años). No identificamos sustitución grasa en la RM muscular de ninguno de los dos a pesar de las manifestaciones clínicas. Podría ser que en las formas juveniles la acumulación de glucógeno interfiera en la contracción de la fibra muscular y esa sea la causa de la debilidad, a diferencia de los pacientes con formas del adulto donde la sustitución de la fibra muscular por grasa parece ser el responsable de la debilidad muscular.

Podemos concluir que la estimación de la fracción grasa es un buen indicador de la severidad y progresión de la enfermedad en pacientes con LOPD. La RM ha probado ser útil en identificar cambios en la cantidad FF a nivel muscular incluso antes que las pruebas funcionales se alteren, además hemos demostrado una correlación a los 3 años entre los cambios en las pruebas funcionales y los resultados identificados en la RM muscular, corroborando la sensibilidad y validez de la RM como una medida de seguimiento en estos pacientes. Sin embargo, nuestro trabajo nos deja dos interrogantes que deberán ser estudiadas en estudios posteriores:

La primera, en pacientes pre-sintomáticos, el proceso de daño muscular y sustitución grasa ya ha comenzado a pesar de no manifestarse en los estudios funcionales. No tenemos una idea clara de si esta progresión será estable o no en el tiempo, por lo que sería importante obtener datos de un mayor número de pacientes mediante RM para establecer este hecho y conocer los factores que pueden asociarse al inicio de acúmulo grasa. Por otra parte, estos datos sugieren que la RM muscular puede ser útil en el seguimiento de estos pacientes en la clínica diaria ya que si evidenciamos un aumento considerable del acúmulo grasa en un paciente pre-sintomático podemos plantearnos el inicio del tratamiento antes que los síntomas se manifiesten.

La segunda, como ya describimos previamente, la secuencia Dixon no sería la técnica de elección en el seguimiento de pacientes con formas juveniles, al no detectar cambios significativos en la infiltración de grasa muscular. Quizás podrían beneficiarse de otras técnicas que monitoricen el glucógeno intramuscular como la espectroscopia de ^{13}C y el GlycoCEST, lastimosamente estas técnicas sólo están disponibles en centros especializados por lo que sería deseable aplicar una técnica de RM accesible, capaz de identificar cambios relacionados con la acumulación de glucógeno intramuscular.

Esta última interrogante nos conduce a nuestro segundo proyecto de investigación plasmado en el **artículo 2** en el que nos propusimos identificar y cuantificar cambios relacionados con el glucógeno mediante la técnica de transferencia de magnetización.

La TM comparte principios físicos con la técnica GlycoCest, pero a diferencia de ella no requiere un software específico y el procesamiento es más sencillo. Mediante esta técnica podemos generar mayor contraste entre tejidos realzando los cambios patológicos, como por ejemplo en la esclerosis múltiple donde ha demostrado que mejora la visualización de las lesiones agudas¹⁰¹. Por otro lado, también podemos cuantificarla obteniendo una tasa de transferencia de magnetización,

que se corresponde con la señal de los componentes macromoleculares de un tejido. Como la TM aún no ha sido probada en la enfermedad de Pompe, decidimos estudiar 29 pacientes con enfermedad de Pompe de inicio tardío (23 con TRE y 6 pre-sintomáticos) comparados con 29 controles sanos, además decidimos incluir a 2 pacientes ya diagnosticados de enfermedad de McArdle en este estudio. A diferencia del primer trabajo, este fue un estudio transversal en el que analizamos cuatro músculos: vasto lateral, aductor mayor, sartorio y bíceps femoral-cabeza larga. Decidimos estudiar estos cuatro músculos en particular para tener músculos con diferentes estadios evolutivos, es decir músculo sin grasa, músculos con sustitución parcial de grasa y músculo casi o completamente reemplazados por grasa en los que pensamos que podrían tener alto contenido de glucógeno.

En todos los pacientes y controles sanos se realizaron dos secuencias de RM en los muslos. Una secuencia 3D-Dixon FFE con los siguientes parámetros: TE 1.8/4 ms, TR 5.78 ms, flip-angle: 15°, en la cual calculamos la fracción de grasa muscular utilizando la herramienta PRIDE. Una segunda secuencia 3D-Dixon FFE a cuál aplicamos un pulso especial de Transferencia de Magnetización con los siguientes parámetros: TE 1.8/4 ms, TR 32 ms, flip-angle: 15°, en esta última secuencia calculamos el valor de MTR que se expresa en porcentaje, mediante la fórmula: $MTR = \frac{M_0 - M_{Sat}}{M_0}$. La decisión de utilizar un pulso de transferencia de magnetización en una secuencia Dixon fue para evitar las interferencias que la señal de la grasa produce cuando se calcula el valor de MTR mediante técnicas de saturación convencionales (SPIR)¹⁰².

En los pacientes sintomáticos con enfermedad de Pompe el MTR es bajo respecto al grupo de pre-sintomáticos. Los músculos que mostraron valores más bajos de MTR fueron el músculo *aductor mayor* y el *bíceps femoral-cabeza larga*. Posiblemente porque son músculos que se afectan en fases tempranas e intermedias de la enfermedad. La sustitución grasa muscular fue superior en pacientes sintomáticos respecto a los pre-sintomáticos, los músculos con una FF más elevada fueron

el *aductor mayor*, el *biceps femoral* y el *vasto lateral*. Hemos observamos una correlación negativa entre el valor de MTR y la FF. Cuanto mayor es la sustitución grasa del músculo, menor es el valor de MTR, por tanto, MTR refleja pérdida de masa muscular.

Comparamos los resultados de MTR con las pruebas físicas, encontrando una buena correlación con la fuerza y función muscular. Estos hallazgos sugieren que la transferencia de magnetización podría ser útil en el seguimiento. Nuestros resultados están en línea con las publicaciones de esta técnica en otras miopatías como en la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth ó en la miositis por cuerpos de inclusión, donde valores bajos de MTR se correlacionaban con el deterioro muscular¹⁰².

Por tanto, la transferencia de magnetización es un indicador de la integridad muscular y podría ser útil el seguimiento los pacientes con enfermedad de Pompe tanto en la práctica diaria como en ensayos clínicos.

No encontramos diferencias significativas entre el valor de MTR entre pre-sintomáticos y controles sanos, no obstante, al analizar los músculos por separado, nos llamó la atención que el músculo aductor mayor de los pacientes pre-sintomático con una FF menor al 20% mostraban valores bajos de MTR respecto a controles. Dos pacientes desarrollaron debilidad muscular tan pronto como se adquirieron las imágenes. Un estudio de pacientes con distrofia de cinturas (LGMD)⁹⁹ identificó valores bajos de MTR en músculos aún no remplazados por grasa. Podría ser que la transferencia de magnetización sea sensible en detectar daño el muscular antes que la sustitución grasa ocurra.

Uno de nuestros objetivos iniciales fue que la TM podía ser una medida indirecta de glucógeno intramuscular. El glucógeno es una molécula hidratada y como los pacientes con EP acumulan glucógeno entre sus fibras musculares, esperábamos que el valor de MTR sea alto debido a mayor señal por el agua ligada al glucógeno.

En nuestro estudio observamos que la grasa reduce los valores de MTR considerablemente enmascarando la señal de otros componentes minoritarios de la célula muscular. Al comparar músculos con baja cantidad de grasa, no encontramos diferencias del MTR respecto a los controles. En los dos pacientes de McArdle incluidos en el estudio, tampoco evidenciamos cambios en el valor de MTR, ambos pacientes tenían FF inferiores al 10%. Por consiguiente, no hemos podido demostrar que la TM sea capaz de evidenciar cambios en la concentración de glucógeno. Pensamos que puede deberse a dos razones. Primero, es posible que la cantidad de glucógeno sea muy baja al tratarse de pacientes con formas del adulto, por tanto, la señal del glucógeno no sería lo suficientemente potente para ser reconocida por esta técnica. Segundo, la grasa al ser hidrófila actúa como factor confusor reduciendo los valores de MTR. Antes de descartar del todo la utilidad de esta técnica sería interesante estudiarla en pacientes sin grasa muscular y que acumulen grandes cantidades de glucógeno como en las formas infantiles de la enfermedad de Pompe.



RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN



En la enfermedad de Pompe de inicio tardío la acumulación progresiva de glucógeno en el sarcoplasma termina dañando irreversiblemente el aparato contráctil de la célula. La pérdida gradual de masa muscular contráctil y sustitución por tejido adiposo, derivan en un cuadro de debilidad muscular de evolución crónica progresiva. La terapia de reemplazo enzimático (TRE), ha probado ser eficaz en estabilizar los síntomas, a pesar de que, todo parece indicar que el deterioro muscular no se detiene. Las evaluaciones clínicas mediante pruebas físicas como la escala MRC, miometría, 6MT y espirometría, han demostrado, no ser siempre capaces de identificar cambios en aquellos pacientes que reciben tratamiento. Resulta evidente que necesitamos nuevos marcadores de seguimiento que nos permitan identificar cambios tempranos en la estructura de la fibra muscular. En este contexto la resonancia magnética muscular ha demostrado ser capaz de identificar acúmulos de grasa antes que la debilidad muscular sea evidente, siendo una herramienta útil en el seguimiento de las enfermedades neuromusculares como la enfermedad de Pompe.

En el primer trabajo de investigación, se siguió una cohorte de 36 pacientes con LOPD, tanto sintomáticos como pre-sintomáticos por un periodo de 4 años, utilizando la secuencia 2 punto-Dixon para cuantificar la fracción de grasa intramuscular. Identificamos un incremento progresivo de la fracción grasa muscular desde el primer año de estudio y antes que se alteren las pruebas funcionales. Este incremento de grasa se mantuvo estable durante los 3 años de seguimiento, independientemente de que los pacientes recibiesen o no tratamiento con terapia de reemplazo enzimático. Nuestros resultados están en línea a lo descrito en la literatura, demostrando que la cuantificación de grasa muscular mediante la RM constituye una buena herramienta de seguimiento en esta enfermedad.

Como puede apreciarse en la tabla 1 del anexo, nuestro trabajo, es uno de los pocos estudios en la enfermedad de Pompe de inicio tardío, que consigue reunir un gran número de pacientes con un seguimiento a largo plazo. Hemos demostrado que la

RM es más sensible en identificar modificaciones en la estructura muscular antes que las manifestaciones clínicas sean evidentes, y lo más importante, que a los 3 años de seguimiento, los cambios en las pruebas funcionales terminan correlacionado con los resultados identificados en la RM muscular, demostrando así, que la RM es un factor predictor del deterioro muscular, ya que, si demostramos un incremento de grasa en un paciente determinado, este paciente está a riesgo de desarrollar ó empeorar su función muscular. Estos resultados aportan validez a la Resonancia Magnética, situándola como biomarcador evolutivo en enfermedades neuromusculares de lenta evolución como es el caso de la enfermedad de Pompe.

Adicionalmente, hemos identificado factores que, podrían estar relacionados con una progresión más rápida de la sustitución grasa a nivel muscular, como un inicio precoz de los síntomas, mayor tiempo en tratamiento con terapia de reemplazo enzimático o un peor rendimiento muscular en la visita basal, así como mayor fracción grasa al inicio del estudio.

Dentro de las limitaciones de nuestro estudio observamos que la cuantificación de la fracción grasa mediante la secuencia Dixon, requiere alto grado de especialización y consume mucho tiempo de análisis por paciente, lo que cuestiona su aplicabilidad en la práctica diaria. Por ello, en nuestro trabajo decidimos identificar qué músculos ó grupos musculares serían los mejores candidatos para realizar el seguimiento y de esta forma disminuir el tiempo de análisis. En los pacientes pre-sintomáticos los músculos paravertebrales serían los mejores candidatos de seguimiento ya que se afectan en fases iniciales. A medida que progresa la enfermedad se afectan los músculos del compartimiento posterior del muslo como los isquiotibiales y finalmente el músculo vasto lateral que no se ve afectado hasta fases muy avanzadas de la enfermedad.

Durante el estudio identificamos dos pacientes con enfermedad de Pompe, forma juvenil, ambos menores de 20 años, en los cuales no detectamos incrementos de la fracción grasa mediante la técnica Dixon, a pesar de que desarrollaron síntomas de debilidad muscular. Probablemente se deba a que, en las formas juveniles, se acumulan mayores cantidades de glucógeno tanto en los lisosomas como entre las miofibrillas contráctiles, y eso afecte de forma importante el mecanismo contráctil del músculo, resultando en debilidad muscular, antes de que se induzca la necrosis celular y el reemplazo graso. De las observaciones previas, en pacientes con formas juveniles el seguimiento de la grasa muscular mediante la técnica Dixon no sería el método de elección. Estos pacientes se beneficiarían de métodos específicos que monitoricen la cantidad de glucógeno intramuscular. La transferencia de magnetización es un método que comparte principios básicos con la técnica Glyco-CEST, una secuencia que detecta glucógeno en tejidos vivos.

El músculo esquelético muestra un efecto pronunciado de transferencia de magnetización y ya se ha demostrado que la TM es una medida sensible de daño muscular en pacientes con enfermedades neuromusculares, las cuales se caracterizan por pérdida progresiva de fibras musculares y remplazamiento por tejido adiposo. La TM ha sido utilizada en el estudio de otras enfermedades neuromusculares, pero no así en la enfermedad de Pompe, hasta la realización de este estudio.

En nuestro segundo artículo, nos planteamos que la transferencia de magnetización podría identificar cambios estructurales en fases iniciales de la enfermedad de Pompe de inicio tardío, relacionados con la acumulación de glucógeno a nivel muscular antes que la sustitución por tejido adiposo se lleve a cabo. Para ello, realizamos un estudio trasversal de casos y controles, entre 29 pacientes con enfermedad de Pompe de inicio tardío y 29 controles sanos. También incluimos en nuestro estudio dos pacientes con enfermedad de McArdle, una glucogenosis caracterizada por acumular grandes cantidades de glucógeno en los tejidos.

La imagen por transferencia de magnetización explora la interacción entre el agua ligada a macromoléculas y el agua libre en un tejido. La cantidad de transferencia de magnetización puede cuantificarse obteniendo el valor de MTR mediante la fórmula: $Mo - M \text{ Sat} / Mo$. Siendo una medida indirecta del comportamiento de las macromoléculas. En nuestro estudio, pensamos que el valor de MTR esta relación con el glucógeno intramuscular.

Hemos identificado que la transferencia de magnetización es una medida indirecta del daño muscular en pacientes con enfermedad de Pompe de inicio tardío. Además, existe una buena correlación entre la cantidad de grasa muscular y el valor de MTR, sugiriendo que los valores de MTR disminuyen en relación con la pérdida progresiva de fibras musculares que terminan siendo reemplazadas por tejido graso.

Para considerar la TM como marcador de seguimiento, comparamos los valores de MTR con pruebas funcionales. Observamos una correlación significativa entre el valor medio de MTR y los resultados de las pruebas físicas, incluyendo fuerza y función muscular (MRC, miometría, 6MWT, 10MWR). Los movimientos más comprometidos fueron la abducción de la cadera y flexión de la rodilla, coincidiendo con que los músculos involucrados en estos movimientos presentaban valores bajos de MTR.

Al analizar músculos de pacientes con enfermedad de Pompe con una fracción de grasa inferior al 20% no encontramos diferencias del valor de MTR respecto a los controles. A excepción de un músculo en particular, el aductor mayor. Podría ser que la TM detecte cambios en la estructura muscular antes que la sustitución de grasa ocurra, como se sugirió en un estudio previo⁹⁹.

En uno de nuestros objetivos iniciales nos planteamos que la TM podía ser una medida indirecta de glucógeno intramuscular. El glucógeno es una molécula hidratada, entonces los músculos con alto contenido de glucógeno acumularían más

moléculas de agua, y en consecuencia los valores de MTR serían altos. En nuestro estudio no encontramos diferencias entre los valores de MTR de pacientes Pompe con FF bajas, respecto a los controles. Al analizar los músculos de dos pacientes con enfermedad de McArdle, tampoco encontramos diferencias significativas del MTR respecto a los controles. Por consiguiente, no hemos podido demostrar que la TM sea capaz de evidenciar cambios en la concentración de glucógeno. Pensamos que puede deberse a dos razones. Primero, es sabido que las formas de enfermedad de Pompe del adulto no acumulan mucha cantidad de glucógeno entre sus fibras musculares. Segundo, la grasa al ser hidrófila actúa como factor confusor reduciendo los valores de MTR. Antes de descartar del todo la utilidad de esta técnica sería interesante estudiarla en pacientes sin grasa muscular y que acumulen grandes cantidades de glucógeno como en las formas infantiles de la EP. Además, sería importante compararla con algunas otras técnicas más sensibles en la detección de glucógeno como la espectroscopia de carbono 13 o el GlycoCEST.

Basados en nuestros resultados concluimos que las secuencias cuantitativas de resonancia magnética muscular son útiles en el seguimiento de los pacientes con LOPD, tanto en pacientes sintomáticos tratados con terapia de reemplazo enzimático como en pre-sintomáticos, y debería ser incluida en las pruebas rutinarias tanto en ensayos clínicos como en la historia natural de la enfermedad.



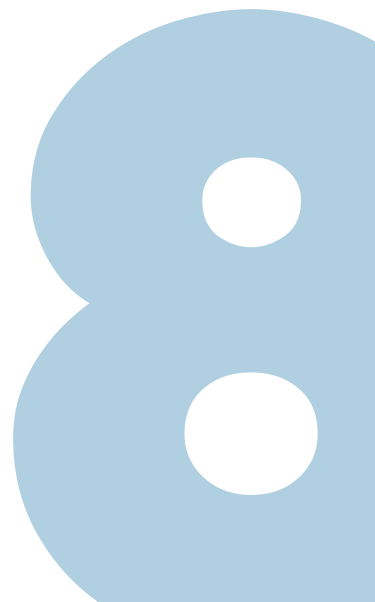
CONCLUSIONES



- 1.** Identificamos un incremento de la cantidad de grasa muscular (FF) en pacientes con enfermedad de Pompe del adulto. El incremento de la FF muscular persistió a largo plazo, independientemente que los pacientes recibiesen o no tratamiento con TRE, sugiriendo que la cuantificación de grasa mediante la secuencia 2 punto-Dixon es útil en el seguimiento en estos pacientes.
- 2.** Comprobamos que existe una correlación significativa entre la cantidad de grasa muscular y el estado funcional de los pacientes con enfermedad de Pompe del adulto. A los tres años de seguimiento los cambios en las pruebas funcionales se correlacionaron con los cambios de la RM muscular, demostrando así, que la RM es un biomarcador en enfermedades de lenta evolución como es el caso de la enfermedad de Pompe.
- 3.** La transferencia de magnetización identifica cambios en la estructura muscular, relacionados con la pérdida de tejido contráctil de pacientes con enfermedad de Pompe del adulto. Existe una buena correlación entre los cambios de la TM y los resultados de las pruebas funcionales. En fases iniciales de la enfermedad de Pompe la TM no ha demostrado ser una medida indirecta de glucógeno intramuscular.



LINEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN



Durante los últimos años, hemos sido testigos de la importante evolución tecnológica en el campo de diagnóstico por la imagen, la Tomografía Axial Computarizada (TAC), la Ecografía (US) y Resonancia Magnética (RM), han permitido facilitar el diagnóstico de diversas enfermedades, además de conocer sus características y poder realizar un seguimiento en su historia natural.

En muchas patologías poco conocidas como es el caso de las enfermedades neuromusculares hereditarias, a día de hoy su diagnóstico, tratamiento y evolución son poco claros. Los tratamientos desarrollados hasta la fecha están encaminados a disminuir la progresión o aliviar los síntomas. Los avances de las nuevas terapias de tratamiento, como la terapia génica, abren un camino de esperanza para la continuidad de nuevos estudios de investigación que irá en beneficio de los pacientes.

Trabajo en un Hospital de tercer nivel donde se realiza resonancia magnética muscular, pero en el campo de la investigación nos vemos limitados por la sobrecarga asistencial, algo que es necesario cambiar, para poder realizar y continuar nuevas investigaciones a futuro. Como radióloga en el área de musculoesquelético, soy consciente que debemos actualizar los protocolos de obtención de imágenes para el estudio de las miopatías. En este sentido me gustaría seguir profundizando en el estudio de las enfermedades neuromusculares, como, por ejemplo, aplicar nuevas secuencias y métodos de adquisición tanto para la identificación de la grasa muscular como para detectar la presencia de edema, que sea sugerido que puede ser un marcador de inflamación aguda en estos pacientes. La utilización de la espectroscopia dirigida a la identificación y monitorización de metabolitos relacionados con el músculo como, el fósforo 31, el glucógeno, el carbono 13, son objetivos deseables, que espero que podamos implementar en próximos estudios.



BIBLIOGRAFÍA



1. van der Ploeg AT, Reuser AJ. Pompe's disease. *Lancet*. 2008;372(9646):1342-53.
2. Diagnostic criteria for late-onset (childhood and adult) Pompe disease. *Muscle Nerve*. 2009;40(1):149-60.
3. Tang H, Feuchtbaum L, Sciortino S, Matteson J, Mathur D, Bishop T, et al. The First Year Experience of Newborn Screening for Pompe Disease in California. *Int J Neonatal Screen*. 2020;6(1):9.
4. Sawada T, Kido J, Nakamura K. Newborn Screening for Pompe Disease. *Int J Neonatal Screen*. 2020;6(2):31.
5. Bodamer OA, Scott CR, Giugliani R. Newborn Screening for Pompe Disease. *Pediatrics*. 2017;140(Suppl 1): S4-s13.
6. Alonso-Pérez J, Segovia S, Domínguez-González C, Olivé M, Mendoza Grimón MD, Fernández-Torrón R, et al. Spanish Pompe registry: Baseline characteristics of first 49 patients with adult onset of Pompe disease. *Med Clin (Barc)*. 2020;154(3):80-5.
7. Meena NK, Raben N. Pompe Disease: New Developments in an Old Lysosomal Storage Disorder. *Biomolecules*. 2020;10(9).
8. Bembi B, Cerini E, Danesino C, Donati MA, Gasperini S, Morandi L, et al. Diagnosis of glycogenosis type II. *Neurology*. 2008;71(23 Suppl 2): S4-11.
9. Taverna S, Cammarata G, Colomba P, Sciarrino S, Zizzo C, Francofonte D, et al. Pompe disease: pathogenesis, molecular genetics and diagnosis. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(15):15856-74.
10. Patino SC, Orrick JA. *Biochemistry, Glycogenesis*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.
11. Thurberg BL, Lynch Maloney C, Vaccaro C, Afonso K, Tsai AC, Bossen E, et al. Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Lab Invest*. 2006;86(12):1208-20.
12. Shea L, Raben N. Autophagy in skeletal muscle: implications for Pompe disease. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2009;47 Suppl 1(Suppl 1):S42-7.
13. Raben N, Danon M, Gilbert AL, Dwivedi S, Collins B, Thurberg BL, et al. Enzyme replacement therapy in the mouse model of Pompe disease. *Mol Genet Metab*. 2003;80(1-2):159-69.
14. Margeta M. Autophagy Defects in Skeletal Myopathies. *Annu Rev Pathol*. 2020; 15:261-85.
15. Nishino I. Autophagic vacuolar myopathy. *Semin Pediatr Neurol*. 2006;13(2):90-5.
16. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(11):931-7.
17. Peruzzo P, Pavan E, Dardis A. Molecular genetics of Pompe disease: a comprehensive overview. *Ann Transl Med*. 2019;7(13):278.
18. Kroos MA, Pomponio RJ, Hagemans ML, Keulemans JL, Phipps M, DeRiso M, et al. Broad spectrum of Pompe disease in patients with the same c.-32-13T->G haplotype. *Neurology*. 2007;68(2):110-5.

19. de Faria DOS, t Groen S, Hoogeveen-Westerveld M, Nino MY, van der Ploeg AT, Bergsma AJ, et al. Update of the Pompe variant database for the prediction of clinical phenotypes: Novel disease-associated variants, common sequence variants, and results from newborn screening. *Hum Mutat.* 2021;42(2):119-34.
20. Kroos M, Hoogeveen-Westerveld M, van der Ploeg A, Reuser AJ. The genotype-phenotype correlation in Pompe disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2012;160c(1):59-68.
21. Niño MY, In 't Groen SLM, Bergsma AJ, van der Beek N, Kroos M, Hoogeveen-Westerveld M, et al. Extension of the Pompe mutation database by linking disease-associated variants to clinical severity. *Hum Mutat.* 2019;40(11):1954-67.
22. Reuser AJJ, van der Ploeg AT, Chien YH, Llerena J, Jr., Abbott MA, Clemens PR, et al. GAA variants and phenotypes among 1,079 patients with Pompe disease: Data from the Pompe Registry. *Hum Mutat.* 2019;40(11):2146-64.
23. Schüller A, Wenninger S, Strigl-Pill N, Schoser B. Toward deconstructing the phenotype of late-onset Pompe disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2012;160c(1):80-8.
24. Toscano A, Rodolico C, Musumeci O. Multisystem late onset Pompe disease (LOPD): an update on clinical aspects. *Ann Transl Med.* 2019;7(13):284.
25. ATS/ERS Statement on respiratory muscle testing. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(4):518-624.
26. Yang CF, Niu DM, Jeng MJ, Lee YS, Taso PC, Soong WJ. Late-onset Pompe disease with left-sided bronchomalacia. *Respir Care.* 2015;60(2): e26-9.
27. Güngör D, de Vries JM, Hop WC, Reuser AJ, van Doorn PA, van der Ploeg AT, et al. Survival and associated factors in 268 adults with Pompe disease prior to treatment with enzyme replacement therapy. *Orphanet J Rare Dis.* 2011; 6:34.
28. Johnson EM, Roberts M, Mozaffar T, Young P, Quartel A, Berger KI. Pulmonary function tests (maximum inspiratory pressure, maximum expiratory pressure, vital capacity, forced vital capacity) predict ventilator use in late-onset Pompe disease. *Neuromuscul Disord.* 2016;26(2):136-45.
29. Mormina E, Musumeci O, Tessitore A, Ciranni A, Tavilla G, Pitrone A, et al. Intracranial aneurysm management in patients with late-onset Pompe disease (LOPD). *Neurol Sci.* 2021;42(6):2411-9.
30. Montagnese F, Granata F, Musumeci O, Rodolico C, Mondello S, Barca E, et al. Intracranial arterial abnormalities in patients with late onset Pompe disease (LOPD). *J Inherit Metab Dis.* 2016;39(3):391-8.
31. van den Berg LE, Zandbergen AA, van Capelle CI, de Vries JM, Hop WC, van den Hout JM, et al. Low bone mass in Pompe disease: muscular strength as a predictor of bone mineral density. *Bone.* 2010;47(3):643-9.
32. Vanherpe P, Fieuws S, D'Hondt A, Bleyenheuft C, Demaerel P, De Bleecker J, et al. Late-onset Pompe disease (LOPD) in Belgium: clinical characteristics and outcome measures. *Orphanet J Rare Dis.* 2020;15(1):83.
33. Ausems MG, Lochman P, van Diggelen OP, Ploos van Amstel HK, Reuser AJ, Wokke JH. A diagnostic protocol for adult-onset glycogen storage disease type II. *Neurology.* 1999;52(4):851-3.

34. Kishnani PS, Amartino HM, Lindberg C, Miller TM, Wilson A, Keutzer J. Methods of diagnosis of patients with Pompe disease: Data from the Pompe Registry. *Mol Genet Metab.* 2014;113(1-2):84-91.
35. Gelb MH, Scott CR, Turecek F. Newborn screening for lysosomal storage diseases. *Clin Chem.* 2015;61(2):335-46.
36. van der Ploeg AT, Kruijshaar ME, Toscano A, Laforêt P, Angelini C, Lachmann RH, et al. European consensus for starting and stopping enzyme replacement therapy in adult patients with Pompe disease: a 10-year experience. *Eur J Neurol.* 2017;24(6):768-e31.
37. Cupler EJ, Berger KI, Leshner RT, Wolfe GI, Han JJ, Barohn RJ, et al. Consensus treatment recommendations for late-onset Pompe disease. *Muscle Nerve.* 2012;45(3):319-33.
38. Kishnani PS, Corzo D, Leslie ND, Gruskin D, Van der Ploeg A, Clancy JP, et al. Early treatment with alglucosidase alpha prolongs long-term survival of infants with Pompe disease. *Pediatr Res.* 2009;66(3):329-35.
39. Kuperus E, Kruijshaar ME, Wens SCA, de Vries JM, Favejee MM, van der Meijden JC, et al. Long-term benefit of enzyme replacement therapy in Pompe disease: A 5-year prospective study. *Neurology.* 2017;89(23):2365-73.
40. Harlaar L, Hogrel JY, Perniconi B, Kruijshaar ME, Rizopoulos D, Taouagh N, et al. Large variation in effects during 10 years of enzyme therapy in adults with Pompe disease. *Neurology.* 2019;93(19):e1756-e67.
41. Semplicini C, De Antonio M, Taouagh N, Béhin A, Bouhour F, Echaniz-Laguna A, et al. Long-term benefit of enzyme replacement therapy with alglucosidase alfa in adults with Pompe disease: Prospective analysis from the French Pompe Registry. *J Inherit Metab Dis.* 2020;43(6):1219-31.
42. Fukuda T, Ahearn M, Roberts A, Mattaliano RJ, Zaal K, Ralston E, et al. Autophagy and mistargeting of therapeutic enzyme in skeletal muscle in Pompe disease. *Mol Ther.* 2006;14(6):831-9.
43. Zhu Y, Jiang JL, Gumlaw NK, Zhang J, Bercury SD, Ziegler RJ, et al. Glycoengineered acid alpha-glucosidase with improved efficacy at correcting the metabolic aberrations and motor function deficits in a mouse model of Pompe disease. *Mol Ther.* 2009;17(6):954-63.
44. Zhu Y, Li X, McVie-Wylie A, Jiang C, Thurberg BL, Raben N, et al. Carbohydrate-remodelled acid alpha-glucosidase with higher affinity for the cation-independent mannose 6-phosphate receptor demonstrates improved delivery to muscles of Pompe mice. *Biochem J.* 2005;389(Pt 3):619-28.
45. McVie-Wylie AJ, Lee KL, Qiu H, Jin X, Do H, Gotschall R, et al. Biochemical and pharmacological characterization of different recombinant acid alpha-glucosidase preparations evaluated for the treatment of Pompe disease. *Mol Genet Metab.* 2008;94(4):448-55.
46. Pena LDM, Barohn RJ, Byrne BJ, Desnuelle C, Goker-Alpan O, Ladha S, et al. Safety, tolerability, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and exploratory efficacy of the novel enzyme replacement therapy avalglucosidase alfa (neoGAA) in treatment-naïve and alglucosidase alfa-treated patients with late-onset Pompe disease: A phase 1, open-label, multicenter, multinational, ascending dose study. *Neuromuscul Disord.* 2019;29(3):167-86.

47. Diaz-Manera J, Kishnani PS, Kushlaf H, Ladha S, Mozaffar T, Straub V, et al. Safety and efficacy of avalglucosidase alfa versus alglucosidase alfa in patients with late-onset Pompe disease (COMET): a phase 3, randomised, multicentre trial. *Lancet Neurol.* 2021;20(12):1012-26.
48. Parenti G, Fecarotta S, la Marca G, Rossi B, Ascione S, Donati MA, et al. A chaperone enhances blood α -glucosidase activity in Pompe disease patients treated with enzyme replacement therapy. *Mol Ther.* 2014;22(11):2004-12.
49. Schoser B, Roberts M, Byrne BJ, Sitaraman S, Jiang H, Laforêt P, et al. Safety and efficacy of cipaglucosidase alfa plus miglustat versus alglucosidase alfa plus placebo in late-onset Pompe disease (PROPEL): an international, randomised, double-blind, parallel-group, phase 3 trial. *Lancet Neurol.* 2021;20(12):1027-37.
50. Unnisa Z, Yoon JK, Schindler JW, Mason C, van Til NP. Gene Therapy Developments for Pompe Disease. *Biomedicines.* 2022;10(2).
51. Schoser B, Laforêt P, Kruijshaar ME, Toscano A, van Doorn PA, van der Ploeg AT. 20th ENMC International Workshop: Formation of a European Network to develop a European data sharing model and treatment guidelines for Pompe disease Naarden, The Netherlands, 26-28 September 2014. *Neuromuscul Disord.* 2015;25(8):674-8.
52. Lachmann R, Schoser B. The clinical relevance of outcomes used in late-onset Pompe disease: can we do better? *Orphanet J Rare Dis.* 2013; 8:160.
53. Straub V, Bertoli M. Where do we stand in trial readiness for autosomal recessive limb girdle muscular dystrophies? *Neuromuscul Disord.* 2016;26(2):111-25.
54. Geva T. Magnetic resonance imaging: historical perspective. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2006;8(4):573-80.
55. Budinger TF, Lauterbur PC. Nuclear magnetic resonance technology for medical studies. *Science.* 1984;226(4672):288-98.
56. Lauterbur PC. Image formation by induced local interactions. Examples employing nuclear magnetic resonance. 1973. *Clin Orthop Relat Res.* 1989(244):3-6.
57. Oleaga Zufiría L, Lafuente Martínez J. Monografía SERAM: Aprendiendo los fundamentos de la resonancia magnética. Madrid: Editorial Medica Panamericana;2007
58. Bink EJ. Basic MRI Physics: For anyone who does not have a degree in physics. Available from: <https://www.mri-physics.net/>
59. Elster A. Questions and Answers in MRI [Available from: <https://www.mriquestions.com/index.html>].
60. Edzes HT, Samulski ET. Cross relaxation and spin diffusion in the proton NMR of hydrated collagen. *Nature.* 1977;265(5594):521-3.
61. Navon G, Eliav U, Demco DE, Blümich B. Study of order and dynamic processes in tendon by NMR and MRI. *J Magn Reson Imaging.* 2007;25(2):362-80.
62. Hou J, Wong VW, Jiang B, Wang YX, Wong GL, Chan AW, et al. Macromolecular proton fraction mapping based on spin-lock magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med.* 2020;84(6):3157-71.

63. De Boer R. Magnetization transfer contrast. Part. 1995; 1:64-73
64. Liepinsh E, Otting G. Proton exchange rates from amino acid side chains--implications for image contrast. *Magn Reson Med*. 1996;35(1):30-42.
65. Wolff SD, Balaban RS. Magnetization transfer contrast (MTC) and tissue water proton relaxation in vivo. *Magn Reson Med*. 1989;10(1):135-44.
66. Henkelman RM, Stanisz GJ, Graham SJ. Magnetization transfer in MRI: a review. *NMR Biomed*. 2001;14(2):57-64.
67. Hidalgo-Tobon SS. Theory of Gradient Coil Design Methods for Magnetic Resonance Imaging. *Concepts in Magnetic Resonance*. 2010;36A:223-42.
68. Santos Armentia E, Martín Noguerol T, Suárez Vega V. Advanced magnetic resonance imaging techniques for tumors of the head and neck. *Radiologia (Engl Ed)*. 2019;61(3):191-203.
69. Bydder M, Yokoo T, Hamilton G, Middleton MS, Chavez AD, Schwimmer JB, et al. Relaxation effects in the quantification of fat using gradient echo imaging. *Magn Reson Imaging*. 2008;26(3):347-59.
70. Balaban RS, Ceckler TL. Magnetization transfer contrast in magnetic resonance imaging. *Magn Reson Q*. 1992;8(2):116-37.
71. Knutsson L, Xu J, Ahlgren A, van Zijl PCM. CEST, ASL, and magnetization transfer contrast: How similar pulse sequences detect different phenomena. *Magn Reson Med*. 2018;80(4):1320-40.
72. van Zijl PC, Yadav NN. Chemical exchange saturation transfer (CEST): what is in a name and what isn't? *Magn Reson Med*. 2011;65(4):927-48.
73. Koos MRM, Schulz KHG, Gil RR. Reference-free NOE NMR analysis. *Chem Sci*. 2020;11(36):9930-6.
74. Mercuri E, Pichiecchio A, Allsop J, Messina S, Pane M, Muntoni F. Muscle MRI in inherited neuromuscular disorders: past, present, and future. *J Magn Reson Imaging*. 2007;25(2):433-40.
75. Díaz-Manera J, Llauger J, Gallardo E, Illa I. Muscle MRI in muscular dystrophies. *Acta Myol*. 2015;34(2-3):95-108.
76. Warman-Chardon J, Díaz-Manera J, Tasca G, Straub V. 247th ENMC International Workshop: Muscle magnetic resonance imaging - Implementing muscle MRI as a diagnostic tool for rare genetic myopathy cohorts. Hoofddorp, The Netherlands, September 2019. *Neuromuscul Disord*. 2020;30(11):938-47.
77. Giacomucci G, Monforte M, Díaz-Manera J, Mul K, Fernandez Torrón R, Maggi L, et al. Deep phenotyping of facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2 by magnetic resonance imaging. *Eur J Neurol*. 2020;27(12):2604-15.
78. Gómez-Andrés D, Díaz-Manera J, Alejaldre A, Pulido-Valdeolivas I, González-Mera L, Olivé M, et al. Muscle imaging in laminopathies: Synthesis study identifies meaningful muscles for follow-up. *Muscle Nerve*. 2018;58(6):812-7.
79. Jungbluth H, Davis MR, Müller C, Counsell S, Allsop J, Chattopadhyay A, et al. Magnetic resonance imaging of muscle in congenital myopathies associated with RYR1 mutations. *Neuromuscul Disord*. 2004;14(12):785-90.

80. Carlier RY, Laforet P, Wary C, Mompoin D, Laloui K, Pellegrini N, et al. Whole-body muscle MRI in 20 patients suffering from late onset Pompe disease: Involvement patterns. *Neuromuscul Disord.* 2011;21(11):791-9.
81. Figueroa-Bonaparte S, Segovia S, Llauger J, Belmonte I, Pedrosa I, Alejaldre A, et al. Muscle MRI Findings in Childhood/Adult Onset Pompe Disease Correlate with Muscle Function. *PLoS One.* 2016;11(10):e0163493.
82. Del Gaizo A, Banerjee S, Terk M. Adult onset glycogen storage disease type II (adult onset Pompe disease): report and magnetic resonance images of two cases. *Skeletal Radiol.* 2009;38(12):1205-8.
83. Pichiecchio A, Uggetti C, Ravaglia S, Egitto MG, Rossi M, Sandrini G, et al. Muscle MRI in adult-onset acid maltase deficiency. *Neuromuscul Disord.* 2004;14(1):51-5.
84. Alejaldre A, Diaz-Manera J, Ravaglia S, Tibaldi EC, D'Amore F, Moris G, et al. Trunk muscle involvement in late-onset Pompe disease: study of thirty patients. *Neuromuscul Disord.* 2012;22 Suppl 2:S148-54.
85. Tasca G, Monforte M, Diaz-Manera J, Brisca G, Semplicini C, D'Amico A, et al. MRI in sarcoglycanopathies: a large international cohort study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2018;89(1):72-7.
86. Mercuri E, Lampe A, Allsop J, Knight R, Pane M, Kinali M, et al. Muscle MRI in Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy. *Neuromuscul Disord.* 2005;15(4):303-10.
87. Cruz S, Figueroa-Bonaparte S, Gallardo E, de Becdelièvre A, Gartioux C, Allamand V, et al. Bethlem Myopathy Phenotypes and Follow Up: Description of 8 Patients at the Mildest End of the Spectrum. *J Neuromuscul Dis.* 2016;3(2):267-74.
88. Alonso-Jimenez A, Kroon R, Alejaldre-Monforte A, Nuñez-Peralta C, Horlings CGC, van Engelen BGM, et al. Muscle MRI in a large cohort of patients with oculopharyngeal muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2019;90(5):576-85.
89. Fischer D, Kley RA, Strach K, Meyer C, Sommer T, Eger K, et al. Distinct muscle imaging patterns in myofibrillar myopathies. *Neurology.* 2008;71(10):758-65.
90. Lollert A, Stihl C, Hötker AM, Mengel E, König J, Laudemann K, et al. Quantification of intramuscular fat in patients with late-onset Pompe disease by conventional magnetic resonance imaging for the long-term follow-up of enzyme replacement therapy. *PLoS One.* 2018;13(1):e0190784.
91. Pichiecchio A, Poloni GU, Ravaglia S, Ponzio M, Germani G, Maranzana D, et al. Enzyme replacement therapy in adult-onset glycogenosis II: is quantitative muscle MRI helpful? *Muscle Nerve.* 2009;40(1):122-5.
92. Ravaglia S, Pichiecchio A, Ponzio M, Danesino C, Saeidi Garaghani K, Poloni GU, et al. Changes in skeletal muscle qualities during enzyme replacement therapy in late-onset type II glycogenosis: temporal and spatial pattern of mass vs. strength response. *J Inherit Metab Dis.* 2010;33(6):737-45.
93. Khan AA, Boggs T, Bowling M, Austin S, Stefanescu M, Case L, et al. Whole-body magnetic resonance imaging in late-onset Pompe disease: Clinical utility and correlation with functional measures. *J Inherit Metab Dis.* 2020;43(3):549-57.

94. Carlier PG, Azzabou N, de Sousa PL, Hicks A, Boisserie JM, Amadon A, et al. Skeletal muscle quantitative nuclear magnetic resonance imaging follow-up of adult Pompe patients. *J Inherit Metab Dis.* 2015;38(3):565-72.
95. Figueroa-Bonaparte S, Llauger J, Segovia S, Belmonte I, Pedrosa I, Montiel E, et al. Quantitative muscle MRI to follow up late onset Pompe patients: a prospective study. *Sci Rep.* 2018;8(1):10898.
96. Taylor R, Price TB, Rothman DL, Shulman RG, Shulman GI. Validation of ¹³C NMR measurement of human skeletal muscle glycogen by direct biochemical assay of needle biopsy samples. *Magn Reson Med.* 1992;27(1):13-20.
97. van Zijl PC, Jones CK, Ren J, Malloy CR, Sherry AD. MRI detection of glycogen in vivo by using chemical exchange saturation transfer imaging (glycoCEST). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(11):4359-64.
98. Kollmer J, Kessler T, Sam G, Hayes JM, Lentz SI, Heiland S, et al. Magnetization transfer ratio: a quantitative imaging biomarker for 5q spinal muscular atrophy. *Eur J Neurol.* 2021;28(1):331-40.
99. McDaniel JD, Ulmer JL, Prost RW, Franczak MB, Jaradeh S, Hamilton CA, et al. Magnetization transfer imaging of skeletal muscle in autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy. *J Comput Assist Tomogr.* 1999;23(4):609-14.
100. Fatehi F, Advani S, Okhovat AA, Ziaadini B, Shamshiri H, Nafissi S. Thigh and Leg Muscle MRI Findings in GNE Myopathy. *J Neuromuscul Dis.* 2021;8(4):735-42.
101. van Waesberghe JH, Castelijns JA, Lazeron RH, Lycklama à Nijeholt GJ, Barkhof F. Magnetization transfer contrast (MTC) and long repetition time spin-echo MR imaging in multiple sclerosis. *Magn Reson Imaging.* 1998;16(4):351-8
102. Ercan E, Varma G, Dimitrov IE, Xi Y, Pinho MC, Yu FF, et al. Combining inhomogeneous magnetization transfer and multipoint Dixon acquisition: Potential utility and evaluation. *Magn Reson Med.* 2021;85(4):2136-44
103. Morrow JM, Sinclair CD, Fischmann A, Machado PM, Reilly MM, Yousry TA, et al. MRI biomarker assessment of neuromuscular disease progression: a prospective observational cohort study. *Lancet Neurol.* 2016;15(1):65-77.



ANEXO

10

10.1.PUBLICACIÓN

The increasing role of muscle MRI to monitor changes over time in untreated and treated muscle diseases.

Claudia Nuñez-Peralta, Jorge Alonso-Pérez, Jordi Díaz-Manera.

Curr Opin Neurol 2020, 33:611–620 , DOI:10.1097/WCO.0000000000000851

The increasing role of muscle MRI to monitor changes over time in untreated and treated muscle diseases.

Claudia Nuñez-Peralta, Jorge Alonso-Pérez, Jordi Díaz-Manera.

Curr Opin Neurol 2020, 33:611–620 , DOI:10.1097/WCO.0000000000000851

The increasing role of muscle MRI to monitor changes over time in untreated and treated muscle diseases.

Claudia Nuñez-Peralta, Jorge Alonso-Pérez, Jordi Díaz-Manera.

Curr Opin Neurol 2020, 33:611–620 , DOI:10.1097/WCO.0000000000000851

The increasing role of muscle MRI to monitor changes over time in untreated and treated muscle diseases.

Claudia Nuñez-Peralta, Jorge Alonso-Pérez, Jordi Díaz-Manera.

Curr Opin Neurol 2020, 33:611–620 , DOI:10.1097/WCO.0000000000000851

The increasing role of muscle MRI to monitor changes over time in untreated and treated muscle diseases.

Claudia Nuñez-Peralta, Jorge Alonso-Pérez, Jordi Díaz-Manera.

Curr Opin Neurol 2020, 33:611–620 , DOI:10.1097/WCO.0000000000000851

The increasing role of muscle MRI to monitor changes over time in untreated and treated muscle diseases.

Claudia Nuñez-Peralta, Jorge Alonso-Pérez, Jordi Díaz-Manera.

Curr Opin Neurol 2020, 33:611–620 , DOI:10.1097/WCO.0000000000000851

The increasing role of muscle MRI to monitor changes over time in untreated and treated muscle diseases.

Claudia Nuñez-Peralta, Jorge Alonso-Pérez, Jordi Díaz-Manera.

Curr Opin Neurol 2020, 33:611–620 , DOI:10.1097/WCO.0000000000000851

The increasing role of muscle MRI to monitor changes over time in untreated and treated muscle diseases.

Claudia Nuñez-Peralta, Jorge Alonso-Pérez, Jordi Díaz-Manera.

Curr Opin Neurol 2020, 33:611–620 , DOI:10.1097/WCO.0000000000000851

The increasing role of muscle MRI to monitor changes over time in untreated and treated muscle diseases.

Claudia Nuñez-Peralta, Jorge Alonso-Pérez, Jordi Díaz-Manera.

Curr Opin Neurol 2020, 33:611–620 , DOI:10.1097/WCO.0000000000000851

The increasing role of muscle MRI to monitor changes over time in untreated and treated muscle diseases.

Claudia Nuñez-Peralta, Jorge Alonso-Pérez, Jordi Díaz-Manera.

Curr Opin Neurol 2020, 33:611–620 , DOI:10.1097/WCO.0000000000000851