



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

APORTACIÓN DEL INMUNOMARCAJE DE BIOPSIAS  
MUSCULARES AL ESTUDIO DE MIOPATIAS  
RELACIONADAS CON EL COLÁGENO VI

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Ferrero Micó, Ana

Tutor/a: Yenush, Lynne Paula

Cotutor/a externo: VILCHEZ PADILLA, JUAN JESUS

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

**Título del proyecto:** APORTACIÓN DEL INMUNOMARCAJE DE BIOPSIAS MUSCULARES AL ESTUDIO DE MIOPATIAS RELACIONADAS CON EL COLÁGENO VI.

**Resumen:**

A partir de biopsias de pacientes con distrofias musculares con un fenotipo compatible con miopatías relacionadas con el colágeno VI, se ha llevado a cabo el estudio de la alteración de esta proteína. Hasta el momento, se ha realizado el análisis genético mediante estudios de secuenciación masiva (NGS), pero, debido al alto porcentaje de variantes encontradas en los genes del colágeno VI, junto con la herencia dominante, es necesario corroborar con el inmunomarcaje que hay alteración o déficit en la muestra del paciente y así poder afirmar que la variante es patogénica.

El inmunomarcaje del colágeno VI y de la laminina en los criocortes de las biopsias musculares de estos pacientes, nos ha permitido comparar su expresión con una proteína que no se altera en este tipo de patologías. Al analizar las imágenes obtenidas, se ha conseguido evaluar el patrón de localización de la proteína: algunos de los individuos presentan un patrón similar al control, donde el colágeno VI se encuentra en la lámina basal junto con la laminina y otros individuos, presentan una distribución donde el colágeno VI se ve alterada, y aparece en el conectivo entre las fibras. Por tanto, se puede concluir que la técnica de inmunofluorescencia es útil para identificar si existe un patrón patogénico en la localización del colágeno VI en pacientes que presentan un fenotipo o una mutación compatible con este tipo de miopatías.

**Palabras clave:** Miopatías, colágeno VI, Laminina, mutaciones, inmunomarcaje.

**Autora:** Dña. Ana Ferrero Micó

**Tutora externa:** Dra. Inmaculada Azorín Villena

**Tutora UPV:** Prof. Dña Lynne Paula Yenush

Valencia, junio de 2022.

El TFG no es confidencial

**Project title:** CONTRIBUTION OF IMMUNOMARKING OF MUSCLE BIOPSIES TO THE STUDY OF MYOPATHIES RELATED TO COLLAGEN VI.

**Summary:**

From biopsies of patients with muscular dystrophies with a phenotype compatible with myopathies related to collagen VI, the study of the alteration of this protein has been carried out. To date, genetic analysis has been carried out by means of massive sequencing studies (NGS), but, due to the high percentage of variants found in the genes of collagen VI, together with the dominant inheritance, it is necessary to corroborate with immunolabeling that there are disorders or deficit in the patient's sample and thus be able to affirm that the variant is pathogenic.

The immunolabeling of collagen VI and laminin in the cryosections of the muscle biopsies of these patients has allowed us to compare their expression with a protein that is not altered in this type of pathology. When analyzing the images obtained, it has been possible to evaluate the localization pattern of the protein: some of the individuals present a pattern like the control, where collagen VI is found in the basal lamina together with the lamina and other individuals, presenting a distribution where collagen VI is altered, and appears in the connective between the fibers. Therefore, it can be concluded that the immunofluorescence technique is useful for identifying whether there is a pathogenic pattern in the location of collagen VI in patients with a phenotype or mutation compatible with this type of myopathies.

**Keywords:** Myopathies, collagen VI, Laminin, respective, immunolabelling.

## AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar, agradecer al Dr. Juan Vílchez, por brindarme la oportunidad de formar parte de su laboratorio y por tutorizarme durante todo este trabajo. A la Dra. Inmaculada Azorín, por todo el tiempo, la paciencia y el cariño que me ha dedicado, las ganas con las que ha trabajado conmigo y la implicación con la que me ha guiado en todo el proceso. Al resto del laboratorio 5.22 y 5.23 del IIS La Fe: Marta, Lorena, Javi, Roger y Pilar, habéis hecho que mi primera vez en un laboratorio de verdad sea de lo más fácil y amena. Gracias por acogerme como una compañera más y haber acabado tratándome como una amiga, además de demostrarme que incluso con todas las dificultades a las que os enfrentáis, no se os acaban las ganas de seguir trabajando por la ciencia.

A mi familia, y en especial a mis padres, por permitirme llegar hasta donde estoy y apoyarme e impulsarme en todas mis decisiones. A mis amigas de la carrera, porque habéis sido la mejor parte de estos 4 años y encontraros ha sido un regalo. Aunque cada una tomamos un camino distinto, siempre estaré aquí para acompañaros en las malas rachas y celebrar vuestros éxitos. Y, por último, a Guillem y a Carmen, que han sido mi casa durante este proceso, respaldando mis esfuerzos y estando en lo malo para hacerlo bueno y en lo bueno para hacerlo increíble.

# I. ÍNDICE:

<b>1. INTRODUCCIÓN:</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. MIOPATIAS:</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. EL COLÁGENO VI:</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3. COL6A1, COL6A2 y COL6A3: expresión génica del colágeno VI.</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4. MIOPATIAS CAUSADAS POR DEFECTOS DEL COLÁGENO:</b> .....	<b>5</b>
<b>1.5. DIAGNÓSTICO DE LAS COL6-CMDs:</b> .....	<b>7</b>
<b>2. OBJETIVOS:</b> .....	<b>8</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS:</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1. RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS:</b> .....	<b>9</b>
<b>3.2. CRITERIOS DE ELECCIÓN DE LOS PACIENTES:</b> .....	<b>10</b>
<b>3.2. ANÁLISIS GENÉTICO:</b> .....	<b>13</b>
<b>3.4. PREPARACIÓN DE LOS CORTES:</b> .....	<b>14</b>
<b>3.5. INMUNOFLOURESCENCIA</b> .....	<b>15</b>
<b>3.6. ANÁLISIS Y ESTUDIO DE LAS MUESTRAS:</b> .....	<b>16</b>
<b>4. RESULTADOS:</b> .....	<b>17</b>
<b>4.1. DESCRIPCIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LAS BIOPSIAS MUSCULARES:</b> .....	<b>17</b>
<b>4.2. DESCRIPCIÓN DE LOS GRUPOS DE PACIENTES SEGÚN LA IMAGEN OBTENIDA:</b> .....	<b>18</b>
<b>GRUPO 1: colágeno VI localizado en el tejido conectivo de forma parcheada o de forma irregular.</b> .....	<b>19</b>
<b>GRUPO 2: colágeno con un patrón normal.</b> .....	<b>20</b>
<b>GRUPO 3: pacientes con otras distrofias diagnosticadas diferentes a las COL6-CMDs.</b> ..	<b>22</b>
<b>4.3. DESCRIPCIÓN DE LOS GRUPOS DE PACIENTES SEGÚN LOS 3 CRITERIOS: genético, clínico e imagen.</b> .....	<b>26</b>
<b>5. DISCUSIÓN:</b> .....	<b>27</b>
<b>6. CONCLUSIÓN:</b> .....	<b>29</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA:</b> .....	<b>30</b>

## II. ÍNDICE DE FIGURAS:

<i>FIGURA 1. Esquema de las diferentes proteínas que forman parte del DGC en la matriz intracelular, la membrana plasmática y la matriz extracelular de las fibras del músculo esquelético.....</i>	<i>1</i>
<i>FIGURA 2. Esquema de las diferentes subunidades del colágeno VI. ....</i>	<i>3</i>
<i>FIGURA 3. Representación del ensamblaje de estas proteínas. ....</i>	<i>3</i>
<i>FIGURA 4. Inmunofluorescencia del colágeno VI en rojo y de la laminina <math>\gamma</math>1 en verde de un paciente control. ....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 5. Representación de los genes de COL6A1, COL6A2 y COL6A3 con los dominios proteicos que se forman y sus posibles mutaciones. ....</i>	<i>5</i>
<i>FIGURA 6. Imagen de resonancia magnética del muslo del paciente 1. ....</i>	<i>11</i>
<i>FIGURA 7. Tinción de HE de secciones de biopsias musculares. ....</i>	<i>17</i>
<i>FIGURA 8. Doble inmunofluorescencia de músculo esquelético de pacientes para el colágeno VI y la laminina a 10X. ....</i>	<i>18</i>
<i>FIGURA 9. Doble inmunofluorescencia del músculo esquelético de pacientes para el colágeno VI y la laminina a 20X. ....</i>	<i>19</i>
<i>FIGURA 10. Doble inmunofluorescencia del tejido muscular esquelético de pacientes para el colágeno VI, la laminina y DAPI para los núcleos a 10X. ....</i>	<i>20</i>
<i>FIGURA 11. Doble inmunofluorescencia del tejido muscular esquelético de un paciente para el colágeno VI, la laminina y DAPI para los núcleos. ....</i>	<i>21</i>
<i>FIGURA 12. Inmunofluorescencia del colágeno VI en pacientes que presentan una miopatía no relacionada con colágeno VI.....</i>	<i>22</i>
<i>FIGURA 13. Inmunofluorescencia de la laminina y el colágeno VI en pacientes con COL6-CMDs y pacientes que no presentan una miopatía relacionada con colágeno VI.....</i>	<i>23</i>
<i>FIGURA 14.1. Inmunofluorescencia del <math>\alpha</math>-dístroglicano, el <math>\beta</math>-sarcoglicano, la distrofina 2 y la merosina en verde en pacientes con miopatías no relacionadas con la alteración del colágeno VI. ....</i>	<i>24</i>
<i>FIGURA 14.2. Inmunofluorescencia del <math>\alpha</math>-dístroglicano, el <math>\beta</math>-sarcoglicano, la distrofina 2 y la merosina en verde en pacientes con miopatías no relacionadas con la alteración del colágeno VI. ....</i>	<i>25</i>

### III. ÍNDICE DE TABLAS:

<b>TABLA 1. Listado de los distintos fenotipos de los 10 pacientes seleccionados para realizar este estudio.....</b>	<b>10</b>
<b>TABLA 2. Diagnóstico clínico de los pacientes que se incluyen dentro de los pacientes con fenotipos relacionados con las COL6-CMDs.....</b>	<b>12</b>
<b>TABLA 3. Listado de los 4 pacientes control que se han utilizado en este estudio.....</b>	<b>13</b>
<b>TABLA 4. Listado de los 4 individuos con miopatías diferentes a las COL6-CMDs que se han utilizado en este estudio. ....</b>	<b>13</b>
<b>TABLA 5. Listado de los 10 pacientes con la mutación identificada a partir del estudio genético mediante NGS. ....</b>	<b>14</b>
<b>TABLA 6. Lista de los 3 anticuerpos primarios utilizados, la casa comercial, la especie a la que pertenecen y la dilución utilizada. ....</b>	<b>15</b>
<b>TABLA 7. Lista de los 4 anticuerpos secundarios la casa comercial, la emisión de la fluorescencia y la dilución utilizada. ....</b>	<b>15</b>
<b>TABLA 8. Listado de los 10 pacientes que se han utilizado en este estudio y su descripción... </b>	<b>26</b>

## ABREVIATURAS:

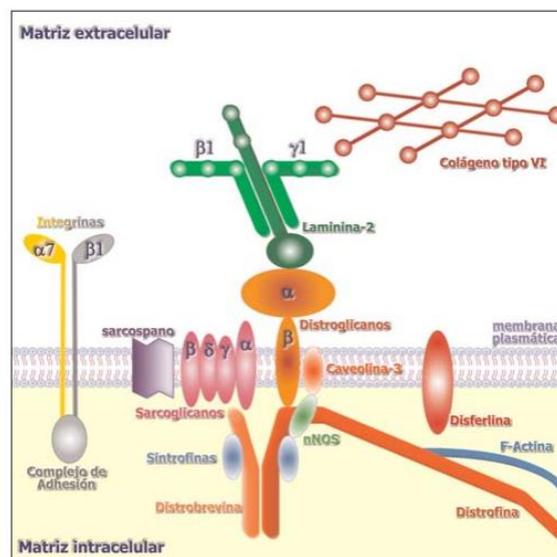
BM	( <i>Bethlem myopathy</i> ) Miopatía de Bethlem
BMD	( <i>Becker muscular dystrophy</i> ) Distrofia muscular Becker ( <i>Bovine Serum albumin</i> ) Albúmina de suero bovino
BSA	
C (1-4)	Individuos control
C <sub>5</sub> H <sub>12</sub>	( <i>Isopentane</i> ) Isopentano
COL6A1	Gen que codifica la cadena α1
COL6A2	Gen que codifica la cadena α2
COL6A3	Gen que codifica la cadena α3
COL6A4	Gen que codifica la cadena α4
COL6A5	Gen que codifica la cadena α5
COL6A6	Gen que codifica la cadena α6 ( <i>Collagen-VI Congenital Muscular Dystrophy</i> ) Distrofias musculares congénitas relacionadas con el colágeno VI
COL6-CMDs	( <i>Dystrophin glycoprotein complex</i> ) Complejo de distrofina-glicoproteína
DGC	( <i>Duchenne muscular dystrophy</i> ) Distrofia muscular de Duchenne
DMD	Pacientes que padecen otra miopatía diferente al colágeno VI
E (1-4)	
ECM	( <i>Extracellular matrix</i> ) Matriz extracelular
HE	( <i>Hematoxylin and eosin</i> ) Hematoxilina y eosina ( <i>Inclusion body myositis</i> ) Miositis por cuerpos de inclusión
IBM	( <i>Messenger Ribonucleic Acid</i> ) Ácido ribonucleico mensajero
mRNA	( <i>Next Generation Sequencing</i> ) Estudio de secuenciación masiva
NGS	
OCT	<i>Cryoblock</i> Pacientes que sufren una miopatía relacionada con el colágeno VI
P (1-10)	( <i>Phosphate-buffered saline</i> ) Tampón fosfato salino
PBS	( <i>Magnetic resonance imaging</i> ) Resonancia magnética
RM	( <i>Ullrich Congenital Muscular Dystrophy</i> ) Distrofia muscular congénita de Ulrich
UCMD	
UV	( <i>Ultraviolet</i> ) Luz ultravioleta ( <i>Variant of uncertain significance</i> ) Variantes de significado incierto
VOUS o VUS	( <i>Von Willebran factor</i> ) Factor de Von Willebrand
vWF	

# 1. INTRODUCCIÓN:

## 1.1. MIOPATIAS:

Las miopatías o distrofias musculares son un grupo de enfermedades genéticas raras con una incidencia baja en la población de entre 19.8-25.1 por cada 100000 nacimientos (Earle & Bevilacqua, 2018). El fenotipo característico es la aparición de una degeneración progresiva del músculo esquelético y cardíaco y de un aspecto distrófico en las biopsias musculares de los pacientes que las padecen (Mercuri *et al.*, 2019). La causa de este grupo tan heterogéneo de enfermedades es una gran variedad de mutaciones en genes que codifican proteínas que forman parte del sarcolema, la matriz extracelular (ECM), la membrana nuclear y el aparato sarcomérico (Biressi *et al.*, 2020).

Entre las miopatías más frecuentes que aparecen en la edad adulta se encuentran las distrofinopatías, que se deben a la alteración del complejo distrofina-glicoproteínas (DGC). Entre sus funciones, cabe destacar que es imprescindible para mantener la estructura de las fibras y la señalización a través de la membrana. Como se observa en la Figura 1, este complejo está formado por diversas proteínas como la distrofina, que conecta el DGC con el citoesqueleto, los sarcoglicanos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) o el  $\alpha$  y  $\beta$ -distroglicano, que forman parte de la membrana. El  $\alpha$ -distroglicano se une a la  $\alpha 2$ -laminina o merosina, la cual se encuentra en la ECM junto con el colágeno VI (Erazo-Torricelli, 2004).



**FIGURA 1.** Esquema de las diferentes proteínas que forman parte del DGC en la matriz intracelular, la membrana plasmática y la matriz extracelular de las fibras del músculo esquelético (Erazo-Torricelli, 2004).

Uno de los tipos más comunes y, a su vez, más grave de las distrofias que afectan a estas proteínas es la distrofia muscular de Duchenne (DMD), con una incidencia de aproximadamente 1 de cada 5000 varones recién nacidos. Otra forma más rara (con una prevalencia de 1 de cada 20000 varones nacidos) es la distrofia muscular de Becker (BMD) (Biressi *et al.*, 2020). No obstante, este trabajo se centra en el papel del colágeno VI y su implicación en ciertas distrofias musculares.

## 1.2. EL COLÁGENO VI:

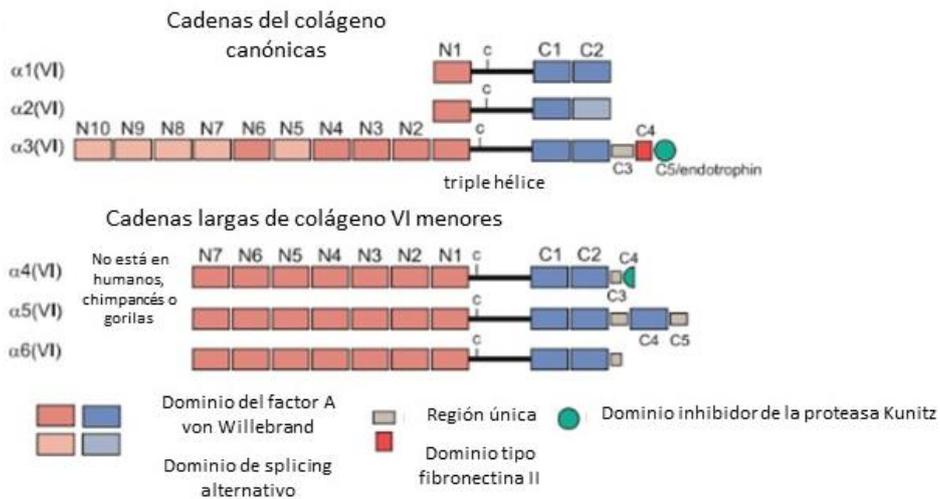
El colágeno VI se encuentra dentro del conjunto de proteínas del colágeno, donde se pueden agrupar un total de 28 glicoproteínas, que tienen una gran presencia en los mamíferos. Entre las características más relevantes de este grupo, cabe destacar que se basan en la repetición de 3 aminoácidos: Gly-X-Y, siendo ocupadas las posiciones X e Y por el aminoácido prolina y su forma hidroxilada (Sorushanova *et al.*, 2019).

En cuanto a su estructura, esta clase de proteínas están formadas por una triple hélice dextrógira compuesta, a su vez, por tres cadenas  $\alpha$ . No obstante, existe una gran variedad estructural entre los diferentes tipos: por ejemplo, puede estar formado por homotrímeros, es decir, las tres cadenas son idénticas; o por el contrario, estar formado por heterotrímeros donde pueden haber dos o más tipos de cadenas distintas (Gelse *et al.*, 2003).

Según la estructura de estas proteínas y su organización se pueden dividir en proteínas formadoras de fibrillas, asociadas a fibrillas, formadoras de redes, proteínas de anclaje, transmembrana o de membrana basal; siendo las más comunes las formadoras de fibrillas, como por ejemplo el colágeno tipo I (Gelse *et al.*, 2003). Cada uno de estos tipos cumplen funciones diversas y se encuentran en diferentes tejidos del cuerpo.

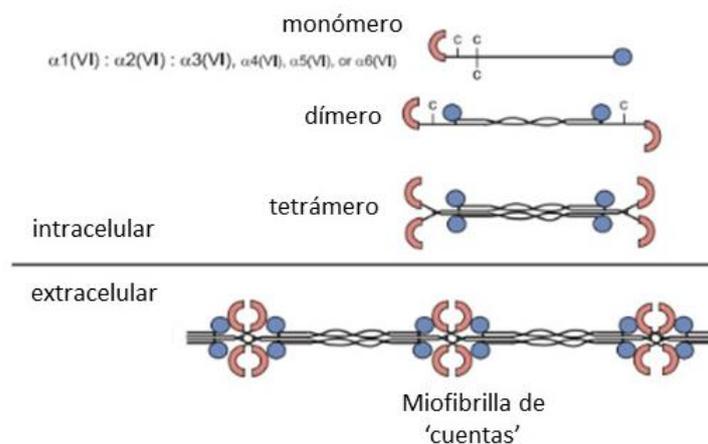
La biosíntesis de estas proteínas se lleva a cabo mediante numerosos pasos que deben estar regulados para que tengan lugar en el momento y la localización adecuada. El proceso para generar estos polipéptidos varía, ya que existen diversas clases e isoformas codificados por genes distintos. Además, esta variabilidad estructural también se debe a algunas modificaciones post-traduccionales como la hidroxilación o la glicosilación, que son vitales para su estabilidad térmica y estructural. (Sorushanova *et al.*, 2019).

No obstante, el objetivo de este estudio es el colágeno VI (Figura 2). Esta proteína se genera a partir de tres cadenas:  $\alpha 1(VI)$ ,  $\alpha 2(VI)$  y  $\alpha 3(VI)$  que forman una triple hélice. La cadena  $\alpha 3$  puede sustituirse por otras tres cadenas:  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  (Solomon-Degefa *et al.*, 2020). Además, la triple hélice está rodeada por algunos dominios globulares, homólogos a los dominios del factor A de Von Willebrand (Briñas *et al.*, 2010). El factor A de Von Willebrand (en inglés, vWF) es una glucoproteína de la sangre que permite que las plaquetas se aglutinen y se unan en los vasos sanguíneos, de forma que tiene un papel importante para que el proceso de coagulación se lleve a cabo de forma adecuada (Mojiri *et al.*, 2013).



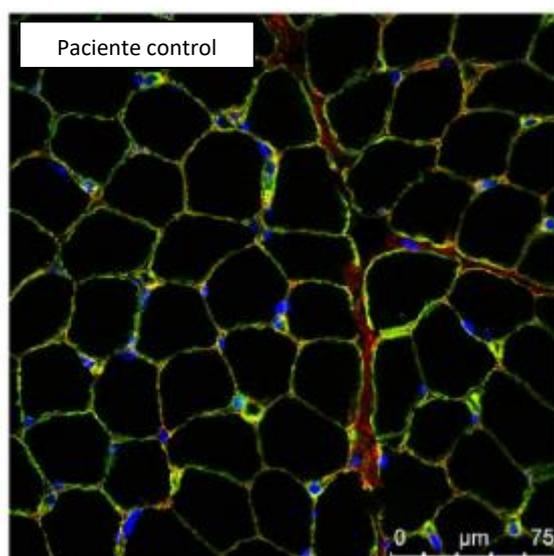
**FIGURA 2. Esquema de las diferentes subunidades del colágeno VI.** En primer lugar, las cadenas más abundantes  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  (más larga que las anteriores). Después, aparecen esquematizadas  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$ , presentes en una menor proporción. Se representan sus dominios N y C terminales (Lamandé, 2021).

La biosíntesis y el ensamblaje del colágeno VI es un proceso intracelular (Figura 3): se generan grandes agregados de aproximadamente el tamaño de un ribosoma, que después serán secretados. Para generar estos agregados, en primer lugar, se forma la triple hélice heterotrimérica (monómero) gracias a la unión de las tres cadenas alfa ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y una cadena larga). Posteriormente, se asocian en dímeros gracias a puentes disulfuro antiparalelos. A continuación, se forman los tetrámeros con la unión de dos dímeros. Dicha unión también dependerá de estos puentes disulfuro. En este momento, se produce su salida al espacio extracelular, donde finalmente se genera la red de microfilamentos característica de la ECM (Cescon *et al.*, 2015).



**FIGURA 3. Representación del ensamblaje de estas proteínas.** En primer lugar, se genera un monómero, donde se unen  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  en una proporción 1:1:1 y, además, una de las otras 3 cadenas. Después se forma el dímero, el tetrámero y este, es secretado. En el espacio extracelular se forma la microfibrilla de 'cuentas' (Lamandé, 2021).

Aunque forma parte de varios tejidos y lleva a cabo un papel fundamental en ellos, este trabajo se centra en su papel en el músculo esquelético. Como se observa en la Figura 4, en los individuos sanos, esta proteína se encuentra en la membrana basal que rodea las fibras, en los capilares y en los nervios intramusculares. También forma parte del endomisio que rodea la célula y el perimisio que envuelve los fascículos musculares (Rodríguez, 2016). Esta proteína cumple una gran variedad de funciones dentro del músculo, ya que es capaz de interactuar a través de sus distintos dominios con diversos componentes de la ECM. Entre estos componentes, cabe destacar el colágeno IV y el perlecán, así como otros tipos de colágenos como el de tipo I, II y XIV. Esta asociación permite conectar a las células con el tejido conectivo que la rodea y organizar la estructura tridimensional del tejido muscular esquelético. También es importante para la fibronectina y para la señalización intracelular, ya que interactúa con ciertos receptores transmembranales. (Cescon *et al.*, 2015).

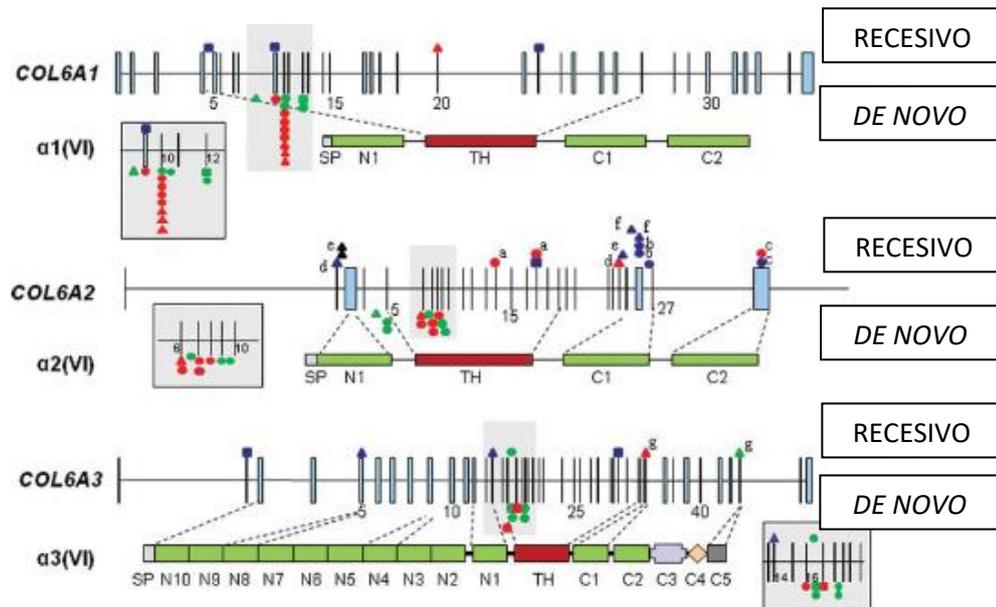


**FIGURA 4.** Inmunofluorescencia del colágeno VI en rojo y de la laminina  $\gamma 1$  en verde de un paciente control. Se ve que el colágeno VI se localiza principalmente en la membrana basal alrededor de las fibras y se superpone a la laminina por lo que se ve una coloración amarilla. (Mohassel *et al.*, 2018).

### 1.3. COL6A1, COL6A2 y COL6A3: expresión génica del colágeno VI.

En los humanos, los genes que codifican estas cadenas son COL6A1, COL6A2 (situados en el cromosoma 21q22.3) y COL6A3 (en el cromosoma 2q37). Además, se han identificado más genes que codifican las cadenas homólogas a la  $\alpha 3$  ( $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ). Estas cadenas son codificadas por COL6A4, COL6A5, COL6A6 (localizados en el cromosoma 3q22.1), respectivamente (Allamand *et al.*, 2011). Cabe destacar que, en el caso de los humanos, el gen COL6A4 no es funcional, debido a una inversión en dicho cromosoma. El mRNA del gen COL6A5 solo se expresa en tejidos muy concretos como los pulmones, los testículos, el colon y la piel, donde es crucial para asegurar su resistencia. Respecto al COL6A6, su mRNA se encuentra en varios tejidos, tanto adultos como fetales. En el músculo esquelético, se encuentra localizado en el endomisio y perimisio, sin estar asociada con las membranas basales, a diferencia de la cadena  $\alpha 3$ , que sí lo está. (Sabatelli *et al.*, 2012).

Como se observa en la Figura 5, existe un amplio espectro de mutaciones en los genes COL6A1, COL6A2 y COL6A3 que pueden provocar diversas miopatías (Briñas *et al.*, 2010)



**Figura 5. Representación de los genes de COL6A1, COL6A2 y COL6A3 con los dominios proteicos que se forman y sus posibles mutaciones.** Los exones se muestran en forma de unos rectángulos azules. Los dominios que se forman a partir de dichos exones se esquematizan abajo: TH = dominio triple hélice; N10-N1 = dominio N-terminal; C1-C5 = dominio C terminal. Las mutaciones recesivas están representadas en la parte superior del esquema mientras que las mutaciones *de novo* se encuentran representadas abajo. Las mutaciones sin sentido aparecen en el esquema en color azul, las mutaciones con cambio de sentido en rojo, las deleciones sin cambio en la pauta de lectura en verde y, por último, las inserciones en la pauta de lectura en negro. Los símbolos indican el fenotipo de los pacientes: el fenotipo severo se representa con un cuadrado, el fenotipo progresivo como un círculo y el leve como un triángulo. (Briñas *et al.*, 2010).

#### 1.4. MIOPATIAS CAUSADAS POR DEFECTOS DEL COLÁGENO:

Mutaciones en los genes que codifican esta proteína pueden causar varias distrofias musculares congénitas relacionadas con el colágeno VI (COL6-CMDs). Entre estas distrofias, la distrofia muscular congénita de Ulrich (UCMD) es la que presenta una mayor gravedad en los pacientes que la sufren. Su prevalencia es de unos 0,13 casos por cada 100000 habitantes (Suárez *et al.*, 2018).

Suele manifestarse en los recién nacidos en forma de debilidad significativa e hipotonía muscular. De forma simultánea, también sufren laxitud de las articulaciones distales (dedos, muñecas y tobillos). Empiezan a aparecer contracturas que evolucionan a rigidez espinal. Además, aparecen anomalías en la piel como por ejemplo la formación de cicatrices hipertróficas y queloides. Se produce una pérdida de la movilidad durante la infancia, o no se consigue llegar a ser independiente. Así mismo, pueden sufrir insuficiencia respiratoria debido a la debilidad del diafragma y puede ser necesario la suplementación nutricional (Bushby *et al.*, 2014). La UCMD se debe a mutaciones, ya sean recesivas o dominantes, tanto en COL6A1, COL6A2 o en COL6A3. La principal consecuencia biológica de estas mutaciones suele ser la imposibilidad del ensamblaje y formación del tetrámero funcional (Aguti *et al.*, 2020).

Un segundo ejemplo de estas patologías sería la distrofia de Bethlem (BM), que es menos grave que la anterior. Esta variante suele progresar de forma más lenta y las primeras manifestaciones aparecen a partir de los 50 y 60 años. Los pacientes empiezan a necesitar apoyo ambulatorio a partir de esta edad, pero su sistema cardíaco está intacto y el sistema respiratorio no empieza a estar afectado hasta la quinta o sexta década. No obstante, también puede tener algunas manifestaciones congénitas como la disminución de los movimientos fetales, hipotonía neonatal o artrogriposis, entre otros. (Bushby *et al.*, 2014). Se considera que esta miopatía es causada por mutaciones en los genes COL6A1, COL6A2 y COL6A3 con una herencia autosómica dominante y con muy pocos casos descritos con herencia recesiva, a diferencia de UCMD, que presenta ambos tipos de herencia (Caria *et al.*, 2019).

A parte de las dos miopatías principales, se han descrito otros tipos menos comunes, como por ejemplo la mioesclerosis autosómica recesiva, que ha sido relacionada con el colágeno VI (Bushby *et al.*, 2014). Es un caso muy concreto de dos hermanos con dos padres con consanguinidad, que presentan ciertos de los síntomas de esta enfermedad como contracturas en los tendones, dificultad para andar desde la infancia, etc. Después de llevar a cabo un screening para las mutaciones presentes en los genes del colágeno VI, se observa que los pacientes presentan una mutación sin sentido en el gen COL6A2, de forma que el transcrito resultante está truncado, ya que le falta el dominio C2. Los monómeros con la cadena truncada son capaces de ensamblarse en dímeros, pero no son capaces de formar los tetrámeros funcionales. Debido a esto, la cantidad de colágeno VI secretada es mucho menor que la esperada. Además, no se sitúa en las membranas basales de las fibras musculares ni en la pared de los capilares (Merlini *et al.*, 2008).

## 1.5. DIAGNÓSTICO DE LAS COL6-CMDs:

En 1975, Sanger introdujo el concepto de la secuenciación de ADN. No obstante, con los años esta tecnología ha sido sustituida por las NGS, que han resultado tener un gran impacto en el ámbito de la genómica y han brindado nuevas oportunidades en la investigación biomédica, ya que permiten el análisis de un volumen de información mucho mayor (Behjati & Tarpey, 2013).

Esta tecnología permite realizar un análisis genético más barato y rápido, así como la detección de mutaciones *de novo*, lo cual ha favorecido al estudio y de enfermedades genéticas de diagnóstico complejo como las COL6-CMDs. Sin embargo, la investigación de estas miopatías también se ha visto afectada por las limitaciones de la técnica: en algunos casos resulta complicado categorizar las variantes como patogénicas cuando éstas se asocian a genes que nunca se habían relacionado con una enfermedad o que desencadenaban un fenotipo totalmente diferente al observado (Fernandez-Marmiesse *et al.*, 2018). Estas variantes son las denominadas variables de significado incierto (VOUS o VUS), que se definen como variaciones de una secuencia genética que pueden causar una enfermedad o aumentar el riesgo de padecerla (NCI *dictionary of genetics terms*, 2012).

En el caso de las COL6-CMDs, la aparición de estas variantes también resultan un problema por lo que el análisis genético de estos pacientes se suele complementar con otros métodos de diagnóstico: resonancia magnética muscular, biopsias musculares para su análisis histológico (Suárez *et al.*, 2018), cultivo de fibroblastos o el inmunomarcaje (Briñas *et al.*, 2010).

## **2. OBJETIVOS:**

El objetivo principal es validar la utilidad de las técnicas de inmunomarcaje en biopsias musculares de pacientes que presentan un fenotipo o mutación vinculada con alguna miopatía relacionada con el colágeno VI identificados previamente mediante un estudio de NGS.

El estudio también pretende relacionar el patrón del marcate del colágeno VI con los patrones clínico, genéticos y radiológicos como objetivo específico.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS:

#### 3.1. RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS:

La obtención de las muestras se llevó a cabo mediante una biopsia del músculo deltoides de 18 individuos: 10 pacientes (P1-P10) del estudio, 4 individuos control (C1-4) y 4 individuos que padecen otras miopatías no relacionadas con el colágeno (E1-4). Estas biopsias se realizaron en el Servicio de Neurología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Valencia, España), después de que los pacientes dieran su consentimiento informado para participar en el estudio. La recogida de muestras de los pacientes enfermos se llevó a cabo entre el 2005 y el 2021. Las biopsias de los pacientes control se realizaron entre enero y abril de 2022.

Una vez la muestra llegó al laboratorio, fue congelada con nitrógeno líquido. Para ello, se utilizó un vaso de precipitado con isopentano ( $C_5H_{12}$ ) situado sobre un tanque de nitrógeno líquido. Este montaje sirve para que el nitrógeno líquido enfríe el isopentano. Este compuesto se suele usar junto con el nitrógeno líquido para formar un baño termostático, ya que es un buen conductor del frío, de forma que permite homogeneizar la bajada de la temperatura una vez la muestra entra en contacto, y así se consigue evitar la formación de artefactos. Para comprobar que el isopentano se encuentra a la temperatura adecuada ( $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) se conectó a un termómetro. Una vez se logró esto, se procedió a congelar la biopsia en el isopentano enfriado con nitrógeno líquido mediante su introducción en el vaso de precipitados durante 30 segundos. Después de estos 30 segundos, la muestra se sumergió en el nitrógeno líquido con unas pinzas.

Una vez la muestra se congeló, se procedió a su almacenaje. Para ello, se introdujeron en *cassetes*, correctamente numerados y se guardaron en nitrógeno líquido hasta su utilización.

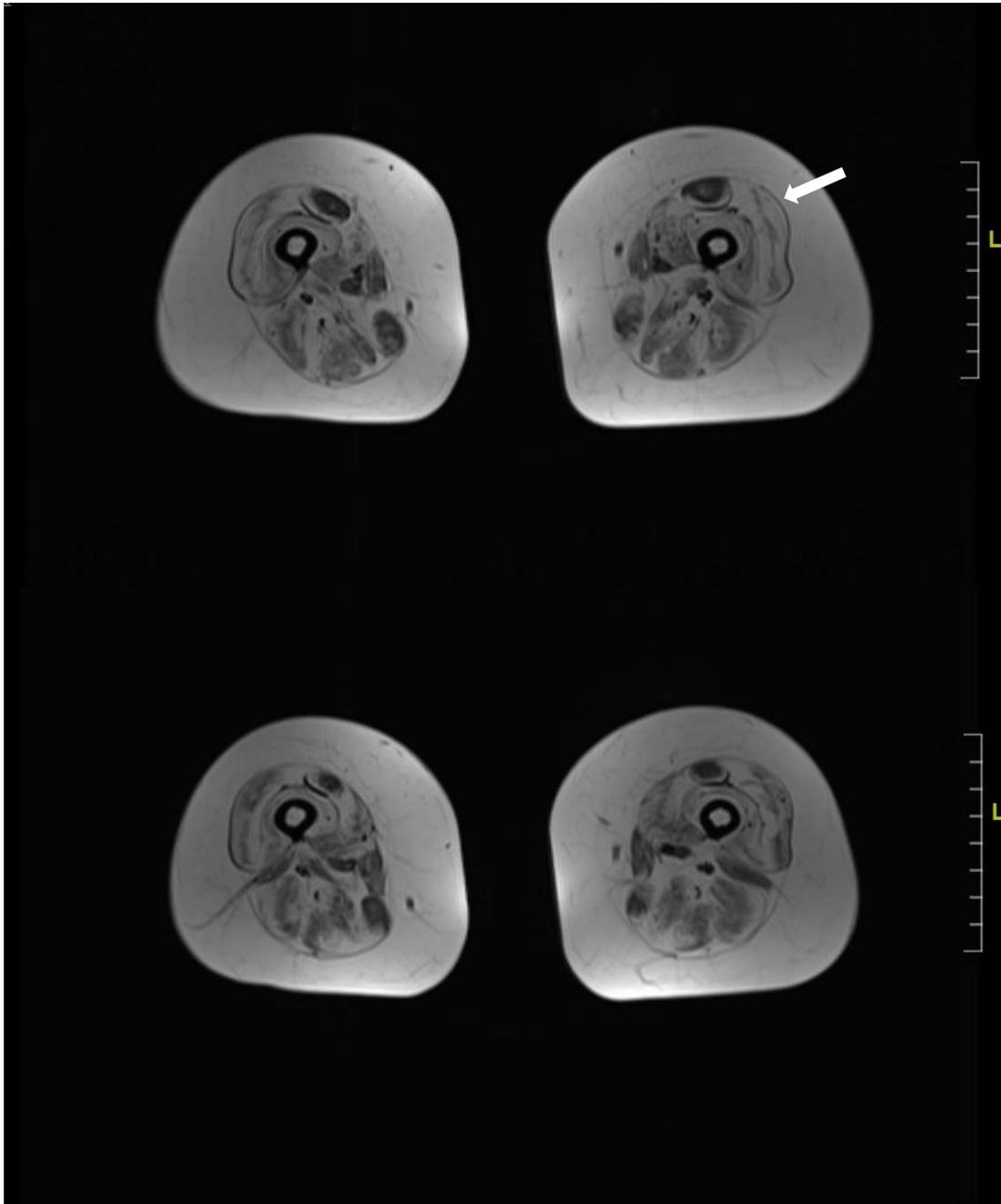
### 3.2. CRITERIOS DE ELECCIÓN DE LOS PACIENTES:

Para seleccionar los 10 pacientes del estudio (Tabla 1), se siguieron los siguientes criterios: se buscó un fenotipo clínico compatible con las COL6-CMDs (Tabla 2), se evaluó también la imagen obtenida en la resonancia magnética (RM) y la presencia de mutaciones en los genes que codifican la proteína del colágeno VI. En cuanto a los criterios de selección de los controles (Tabla 3), se usaron 3 individuos con una miopatía mitocondrial y 1 individuo con una miopatía metabólica, ya que en estos casos la membrana basal no se ve afectada. Además, se incluyeron en el estudio 4 individuos con otras miopatías donde se ve alterada otra proteína de la membrana (distrofina, merosina...) con la finalidad de comparar la localización del colágeno VI en tejidos de músculo esquelético con una arquitectura muy deteriorada (Tabla 4).

**TABLA 1. Listado de los distintos fenotipos de los 10 pacientes seleccionados para realizar este estudio. Se identifica al paciente, su sexo, su edad, el tipo de fenotipo que presenta (compatible con las COL6-CMDs, no compatible o parcialmente compatible) y descripción de la imagen obtenida con la RM.**

IDENTIFICACIÓN PACIENTE	SEXO	EDAD	FENOTIPO	ANÁLISIS DE LA IMAGEN DE RM
P1	Femenino	44	Fenotipo <b>compatible</b> : miopatía congénita	Imagen compatible con el diagnóstico (Figura 6)
P2	Femenino	73	Fenotipo <b>compatible</b> : miopatía congénita	Imagen dudosa
P3	Masculino	33	Fenotipo <b>no compatible</b> : Miopatía mitocondrial oftalmoplejia	-
P4	Femenino	53	Fenotipo <b>compatible</b> : BM	Imagen dudosa
P5	Masculino	69	Fenotipo <b>compatible</b> , aunque el primer diagnóstico fue de tipo inflamatorio (IBM)	Imagen compatible con el diagnóstico
P6	Femenino	12	Fenotipo <b>compatible</b> : UCMD	Imagen compatible con el diagnóstico
P7	Femenino	38	Fenotipo <b>parcialmente compatible</b> , pero se incluye como una BM	-
P8	Masculino	23	Fenotipo <b>compatible</b>	-
P9	Masculino	25	Fenotipo <b>no compatible</b> : hiperckaemia	Imagen dudosa
P10	Femenino	56	Fenotipo <b>parcialmente compatible</b>	Imagen compatible con el diagnóstico

Además de estos 10 pacientes se encontraron en el momento de la búsqueda 2 pacientes más que tenían un fenotipo que interesaba para el estudio, pero el estado de las biopsias no permitió realizar la inmunofluorescencia, debido a que tenían una gran antigüedad, y se excluyeron del trabajo.



**FIGURA 6.** Imagen de resonancia magnética del muslo del paciente 1. En el músculo vasto externo de la pierna, se ve el signo del sándwich, marcado con la flecha blanca: entre la aponeurosis (parte más externa) se ve una señal blanca hipointensa (grasa), luego hay una señal normal de color gris (músculo) y después otra señal blanca (grasa) de más profundidad.

**TABLA 2. Diagnóstico clínico de los pacientes que se incluyen dentro de los pacientes con fenotipos relacionados con las COL6-CMDs.** De cada paciente se especifica su edad, su sexo (F: femenino; M: masculino), su aparición, que tipo de debilidad presenta, si presenta afectación cardíaca, pérdida de la deambulación, hiperlaxicidad o retracciones, espina rígida, afectación respiratoria o en la piel. Dentro de la pérdida de la deambulación se describe la Escala de Vignos, que sirve para llevar a cabo un análisis de la marcha en pacientes con distrofias musculares. Con esta escala se evalúa la capacidad de subir escaleras, levantarse de una silla o mantenerse en pie, entre otros aspectos.

	P1	P2	P4	P5	P6	P7	P8	P10
<b>EDAD ACTUAL</b>	44	75	62	68	8	38	23	55
<b>SEXO</b>	F	F	F	M	M	F	M	M
<b>APARICIÓN</b>	Infantil	Congénita	Adulta	Adulta	Infantil	Infantil	Infantil	Adulta
<b>DEBILIDAD</b>	Proximal, axial y distal	Proximal y distal	Proximal, distal y axial	Pelviana, distal y proximal	Proximal	Distal y proximal	Escapular y pelviana	Distal y proximal
<b>AFECTACIÓN CARDÍACA</b>	No	Arritmia	No	No	No	No	No	No
<b>PÉRDIDA DE LA DEAMBULACIÓN</b>	Escala de Vignos:5	A partir de los 65 años	Escala Vignos: 4,5	No	No	No	No	Sí
<b>HIPERLAXICIDAD/ RETRACCIONES</b>	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
<b>ESPINA RÍGIDA</b>	Sí	No	No	No	No	Sí	Sí	No
<b>AFECTACIÓN RESPIRATORIA</b>	Sí	No	No	No	No	Sí (moderada)	Sí	No
<b>AFECTACIÓN EN LA PIEL</b>	No	No	No	No	No	No	No	No

**TABLA 3. Listado de los 4 pacientes control que se han utilizado en este estudio. Se indica su sexo (F: femenino; M: masculino), edad y diagnóstico clínico.**

IDENTIFICACIÓN PACIENTE	SEXO	EDAD	DIAGNÓSTICO CLÍNICO
C1	F	21	MIOPATÍA MITOCONDRIAL
C2	M	57	MIOPATÍA MITOCONDRIAL
C3	M	47	MIOPATÍA MITOCONDRIAL
C4	F	29	MIOPATÍA METABÓLICA CON RABDOMIALES

**TABLA 4. Listado de los 4 individuos con miopatías diferentes a las COL6-CMDs que se han utilizado en este estudio. Se indica su sexo (F: femenino; M: masculino), edad y diagnóstico clínico.**

IDENTIFICACIÓN PACIENTE	SEXO	EDAD	DIAGNÓSTICO CLÍNICO
E1	F	35	MIOPATÍA CONGÉNITA
E2	F	42	MIOPATÍA CONGÉNITA
E3	M	55	DISTROFINOPATÍA
E4	F	67	DISTROFIA DE CINTURAS

### 3.2. ANÁLISIS GENÉTICO:

Respecto a las mutaciones presentes en los genes que codifican esta proteína, se generaron 3 grupos de pacientes: pacientes con mutación patogénica (o *likely* patogénica), pacientes con mutación de significado incierto y pacientes que no presentaban ninguna mutación, pero encajaban en el grupo de los pacientes con un fenotípico clínico típico (Tabla 5).

Para llevar a cabo esta selección de pacientes se realizó un estudio genético mediante NGS. Para este análisis se diseñaron paneles de genes específicos para enfermedades neuromusculares. A continuación, se generaron las librerías de las muestras seleccionadas y se secuenciaron. Los archivos FASTQ generados se procesaron y se analizaron con *ALISSA INTERPRET* versión 5.2.6 (*Agilent Technologies Inc.*, Santa Clara, CA). Este programa permite llevar a cabo la anotación de los genes y una filtración de las variantes genéticas, de forma que se definen y se clasifican en patogénicas o de significado dudoso.

**TABLA 5. Listado de los 10 pacientes con la mutación identificada a partir del estudio genético mediante NGS. Se especifica el sexo del paciente, su edad y la mutación que presenta.**

IDENTIFICACIÓN PACIENTE	SEXO	EDAD	MUTACIÓN
P1	F	44	COL6A1 c.8686 G>A
P2	F	73	COL6A1 c.1855G>A
P3	M	33	COL6A2 c.1405G>A
P4	F	53	COL6A2 c.955-3 C>G
P5	M	69	COL6A2 c.2818 G>C + c.1975 C>T
P6	F	12	COL6A3 c.6029T>A+c.7447 A>G
P7	F	38	No padece mutación
P8	M	23	No padece mutación
P9	M	25	COL6A3 c.5341 A>G
P10	F	56	No padece mutación

### 3.4. PREPARACIÓN DE LOS CORTES:

Una vez realizado el estudio genético y la clasificación de los pacientes, se procedió a realizar el estudio del colágeno VI en las biopsias. Para ello, se realizaron los cortes utilizando el criostato modelo 505 MICROM HIM. El criostato debe tener una temperatura de -25 °C, por lo que para atemperar la muestra se debe incluirla en OCT o *cryoblock*. El OCT es un compuesto basado en glicoles y resinas disueltos en agua que aporta una matriz protectora a las muestras cuando van a ser seccionadas en un criostato a -10 °C o temperaturas inferiores.

Para llevar a cabo los cortes, la muestra se posicionó transversalmente al soporte y se colocó en el mango del criostato. A continuación, se desbastó la muestra, se profundizó en la misma y se recogieron los cortes de 7 micras de grosor en un portaobjetos. En cada portaobjetos, se situaron 2 cortes seriados y se nombraron con el código que identifica la biopsia. Para terminar, la muestra se retiró del criostato, se volvió a introducir en los *cassetes* y se almacenó de nuevo en el nitrógeno líquido.

### 3.5. INMUNOFLUORESCENCIA

La inmunofluorescencia es una técnica muy común en la investigación clínica, que utiliza anticuerpos primarios marcados con un fluorocromo específicos para ciertos antígenos. Se puede utilizar la inmunofluorescencia directa, que consiste en utilizar anticuerpos primarios marcados con fluorescencia que se unen directamente a su antígeno específico. También existe la posibilidad de realizar la inmunofluorescencia mediante el método indirecto. En este caso, se utiliza un anticuerpo primario que se une a su antígeno correspondiente, pero que no generará una señal visible ya que no está etiquetado con fluorescencia. A continuación, se necesita un anticuerpo secundario que se una a la parte constante del anticuerpo primario y que esté marcado con un fluoróforo. De esta forma, se detecta si el anticuerpo primario se ha unido a su diana haciendo incidir luz ultravioleta (UV) (Odell & Cook, 2013).

Para este trabajo, se utilizó el método de inmunofluorescencia indirecta. Después de una serie de pruebas donde se puso a punto la técnica, se concluyó que los anticuerpos necesarios y sus diluciones son los que aparecen plasmadas en la Tabla 6 y Tabla 7.

**TABLA 6. Lista de los 3 anticuerpos primarios utilizados, la casa comercial, la especie a la que pertenecen y la dilución utilizada.**

ANTICUERPO PRIMARIO	CASA COMERCIAL	ESPECIE	DILUCIÓN UTILIZADA
<i>Rb x human collagen type VI</i>	Millipore	<i>Rabbit</i>	1/1000
<i>Laminin <math>\alpha</math>-2, rat monoclonal</i>	Sigma	<i>Rat</i>	1/500
<b>NCL-DYS3 (distrofina 3)</b>	Novocastra	<i>Mouse</i>	1/50
<b>NCL <math>\beta</math>-sarcoglicano</b>	Novocastra	<i>Mouse</i>	1/50

**TABLA 7. Lista de los 4 anticuerpos secundarios la casa comercial, la emisión de la fluorescencia y la dilución utilizada.**

ANTICUERPO SECUNDARIO	CASA COMERCIAL	FLUORESCENCIA	DILUCIÓN UTILIZADA
<b>ALEXA Fluor 555 goat anti-rabbit IgG</b>	Invitrogen	Rojo	1/500
<b>ALEXA Fluor 488 goat anti-rat IgG</b>	Invitrogen	Verde	1/50
<b>Hoechst 33342</b>	ThermoFisher	Azul	1/1000

Para llevar a cabo este procedimiento, se utilizaron 4 portaobjetos de cada biopsia y 4 portaobjetos de uno de los controles. Estos 4 portaobjetos se utilizaron para 4 tinciones diferentes: la detección simple de laminina, detección simple del colágeno VI, detección doble de la laminina y del colágeno VI y un control negativo. En el caso de los pacientes de las otras miopatías, se realizaron 5 tinciones simples: la distrofina 2, el  $\beta$ -sarcoglicano, la  $\alpha$ -distrofina, la laminina y el colágeno VI.

En primer lugar, se fijaron los cortes de los portaobjetos con paraformaldehído al 4%. Se utilizó este fijador porque es capaz de conservar las estructuras celulares a la vez que mantiene la antigenicidad para que los anticuerpos se puedan unir. Después, se bloquearon los sitios de unión inespecífica del tejido usando albúmina de suero bovino (BSA al 1% en tampón fosfato salino) durante 30 minutos.

Durante este tiempo, se lleva a cabo la preparación de las diluciones de los anticuerpos primarios con un tiempo de incubación de 1 hora y media. A continuación, se realizaron dos lavados con BSA al 1% en tampón fosfato salino (PBS) de 10 minutos cada uno. Durante los lavados, se prepararon las diluciones de los anticuerpos secundarios con un tiempo de incubación estándar de 1 hora.

Por último, se realizaron 2 lavados en PBS y, en algunas de las biopsias, se utilizó la tinción Hoechst para marcar los núcleos de las células. Finalmente, se quitó el excedente del líquido de los cortes del tejido muscular y se procedió al montaje con cubreobjetos utilizando *Vectashield* (Vector).

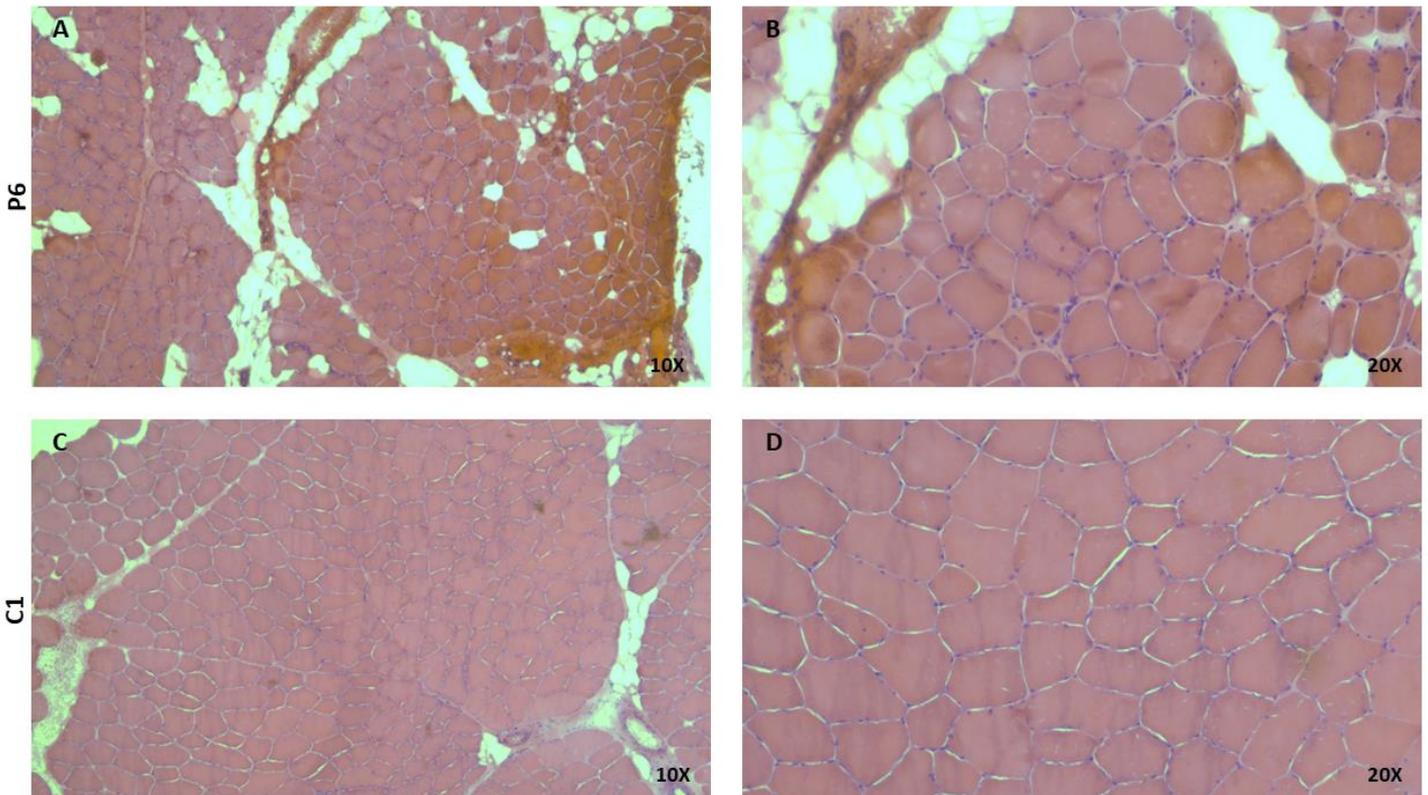
### **3.6. ANÁLISIS Y ESTUDIO DE LAS MUESTRAS:**

Para el análisis de las muestras se utilizó el microscopio OLYMPUS BX41 con una lámpara de UV OLYMPUS U-RFL-T. Para establecer los criterios de clasificación de los pacientes, se procedió a realizar fotos de los cortes de tejido muscular obtenidos a partir de las biopsias con la cámara Nikon Digital Site y el software Nis Element BR 5.30.0064 bit. El análisis de estas imágenes para la clasificación de los pacientes se llevó a cabo por 3 personas que no conocían las mutaciones que padecía cada uno para realizar una evaluación imparcial.

## 4. RESULTADOS:

### 4.1. DESCRIPCIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LAS BIOPSIAS MUSCULARES:

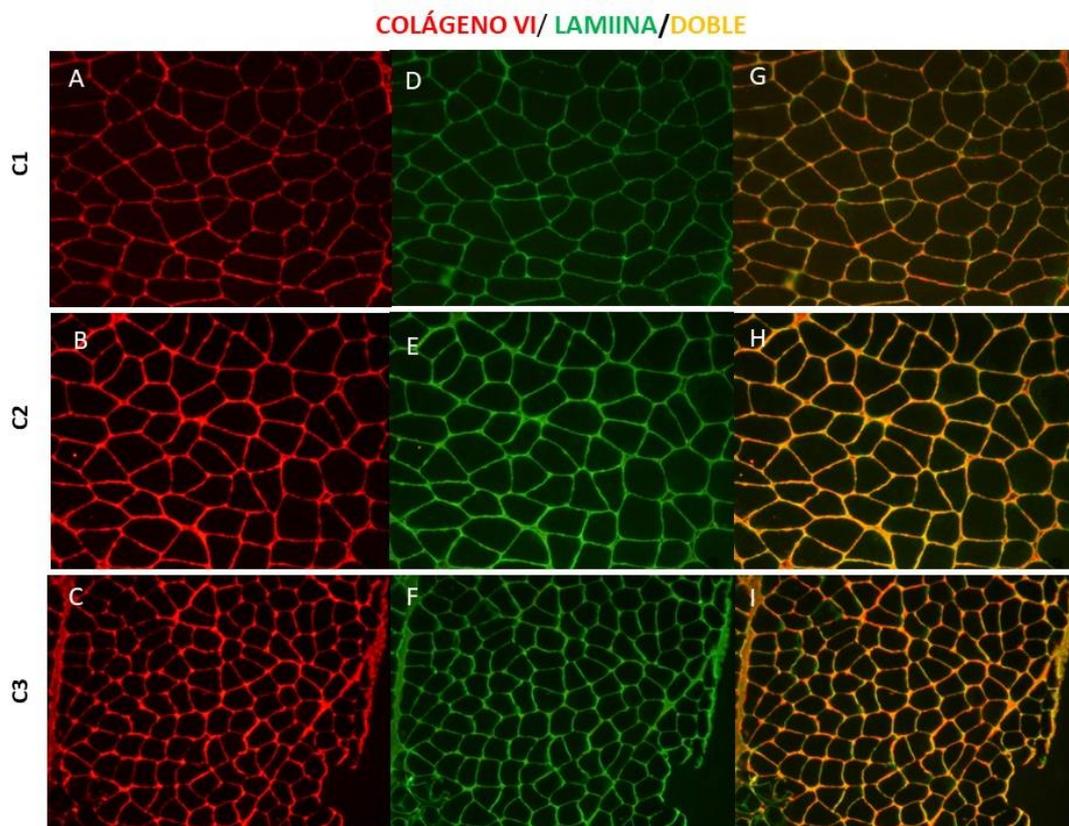
El análisis de las tinciones de hematoxilina y eosina (HE) permite analizar la morfología de los cortes de las biopsias musculares. El tamaño de las fibras en individuos sanos es bastante homogéneo, y cada una de ellas se encuentra rodeada por una capa de tejido conectivo denominado endomisio. No obstante, cuando se produce la infiltración de tejido graso o conectivo debido a alguna patología el tamaño de las fibras se ve alterado. Además, éstas presentan muchos núcleos que se encuentran localizados alrededor de las mismas (Frontera & Ochala, 2015). No obstante, en el caso de los pacientes del estudio se observa un tamaño de fibras variable debido a la fibrosis endomisial (el tejido conectivo se ve ensanchado), la infiltración del tejido graso, los núcleos están situados en el centro de las células... En definitiva, presentan una morfología distrófica como se observa en la Figura 7.



**FIGURA 7.** Tinción de HE de secciones de biopsias musculares. (A, B) Biopsia muscular de un paciente con un fenotipo relacionada con COL6-CMDs. (C, D) Biopsia muscular de un paciente con un fenotipo relacionada con COL6-CMDs.

#### 4.2. DESCRIPCIÓN DE LOS GRUPOS DE PACIENTES SEGÚN LA IMAGEN OBTENIDA:

A partir del análisis de las imágenes, se ha dividido a los pacientes según el estado del colágeno VI en el tejido muscular esquelético. Para ello, se han comparado los pacientes con los individuos control y con individuos que padecen otro tipo de miopatía (distrofinopatías, miopatías de cinturas...). Los individuos control presentan unas fibras musculares con una arquitectura bastante conservada, de morfología y tamaños de fibras bastante regulares. En estos pacientes el colágeno VI se encuentra colocalizando con la laminina en la membrana basal (Figura 8).

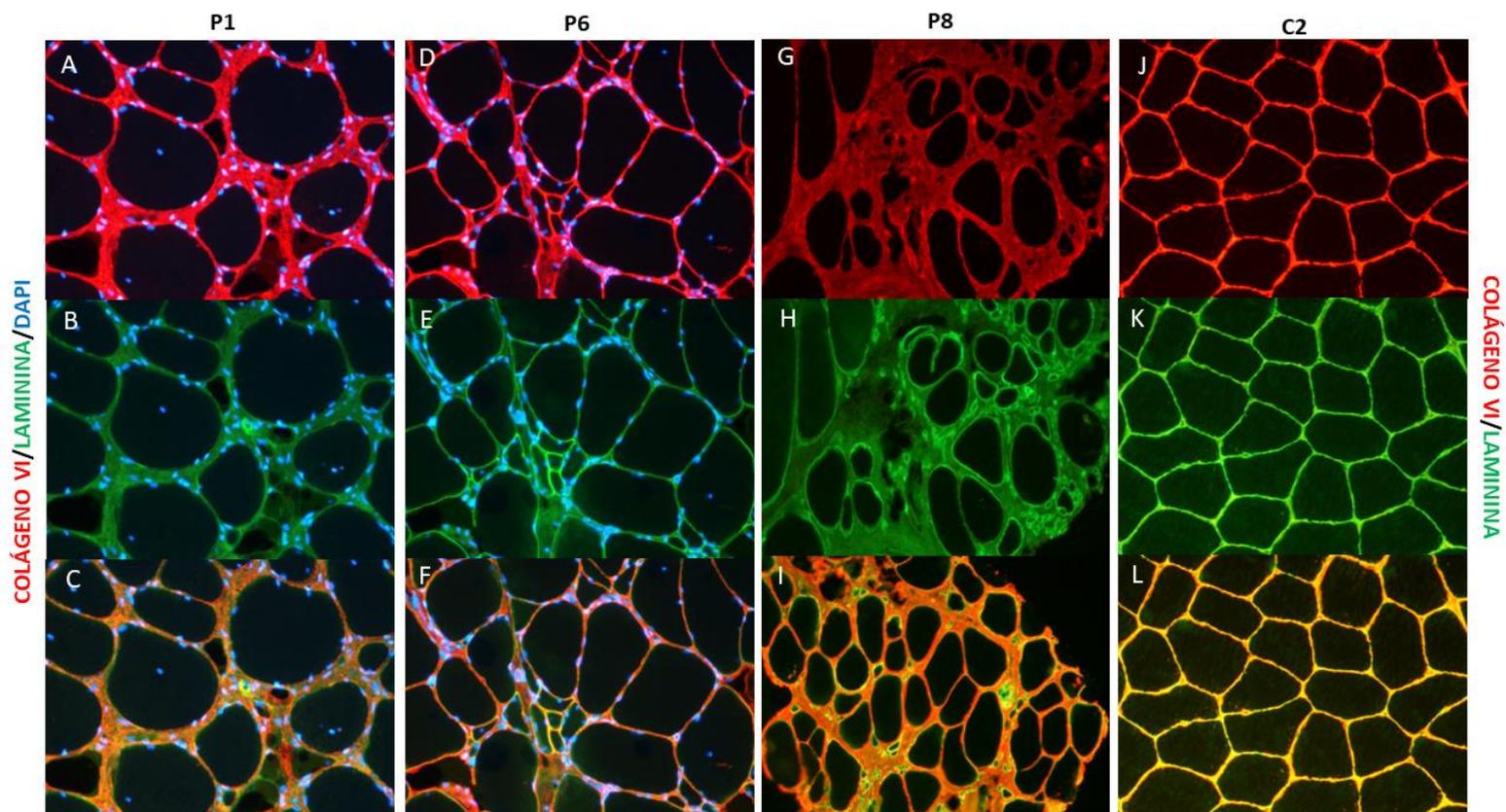


**FIGURA 8.** Doble inmunofluorescencia de músculo esquelético de pacientes para el colágeno VI y la laminina a 10X. (A,D,G) Individuo control 1. (B,E,H) Individuo control 2. (C,F,I) Individuo control 3. (A-C) Inmunofluorescencia del colágeno VI en rojo. (D-F) Inmunofluorescencia de la laminina en verde. (G-H) Imágenes combinadas.

Después de la comparación con los controles, se han establecido dos tipos de patrones para clasificar a los pacientes según la ubicación del colágeno VI.

**GRUPO 1: colágeno VI localizado en el tejido conectivo de forma parcheada o de forma irregular.**

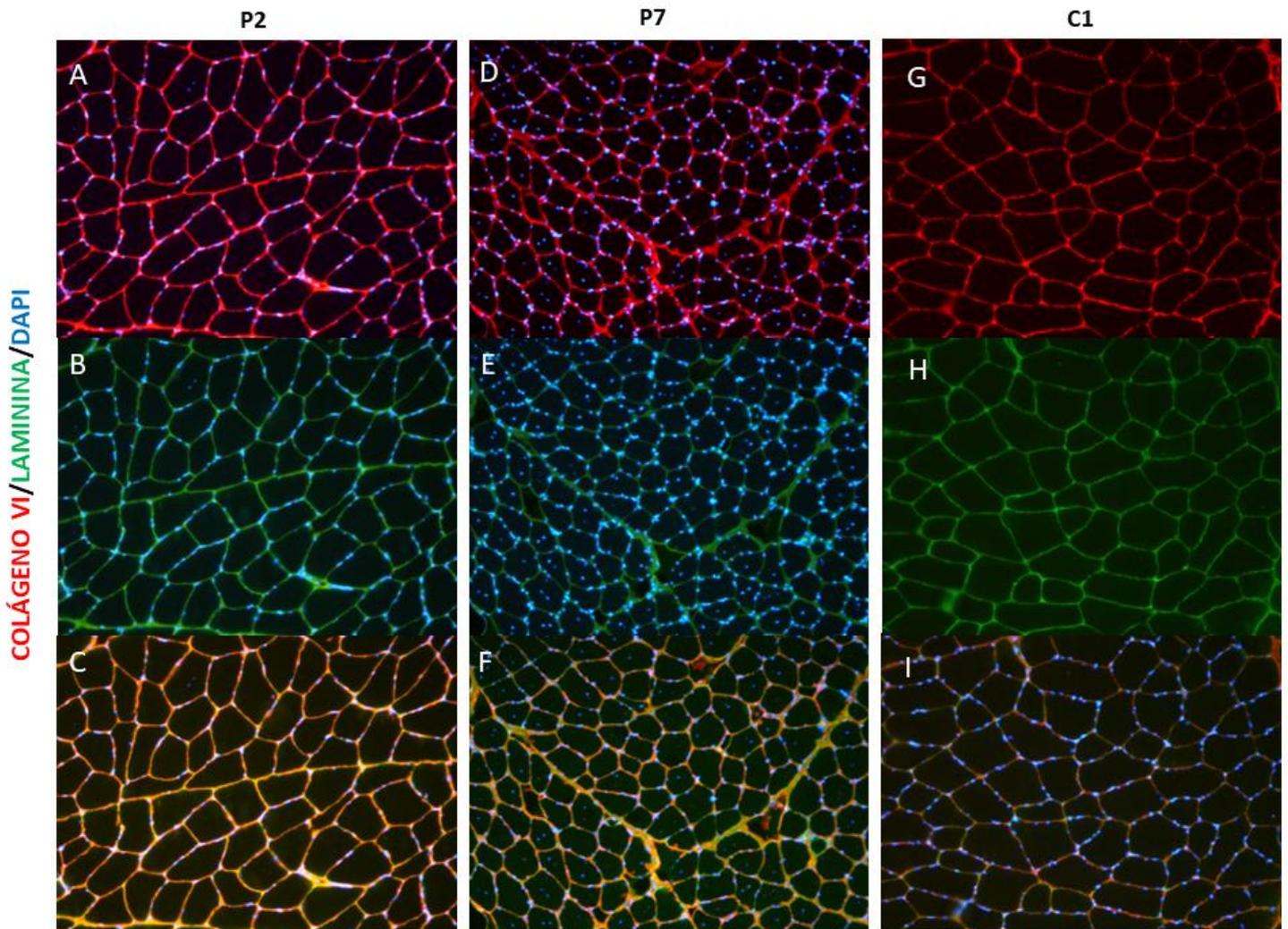
Los pacientes que pertenecen a este grupo tienen un patrón muy distinto al del control. En este caso, se ha producido una reducción del colágeno VI en la lámina basal de las células y se presenta en el conectivo de forma parcheada o con una distribución irregular. El patrón parcheado consiste en la presencia de colágeno en el conectivo solo en algunas fibras y no de forma generalizada en todas. El patrón irregular corresponde a una presencia parcial del colágeno en el conectivo en cada una de las fibras (Figura 9). Además, en aquellas biopsias donde se ha realizado la tinción DAPI, se puede observar la gran cantidad de núcleos que presentan las fibras, muchos de ellos centrales.



**FIGURA 9. Doble inmunofluorescencia del músculo esquelético de pacientes para el colágeno VI y la laminina a 20X. (A-I) Pacientes con diagnóstico clínico relacionado con una patología muscular de fenotipo similar al del colágeno VI. (J-L) Paciente control. (A, D, G, J) Inmunofluorescencia del colágeno VI en rojo. (B, E, H, K) Inmunofluorescencia de la laminina en verde. (C, F, I, L) Imágenes combinadas. (A-C) Colágeno VI con un patrón irregular. (D-F) Colágeno VI con un patrón parcheado e irregular. (G-I) Colágeno VI con un patrón parcheado.**

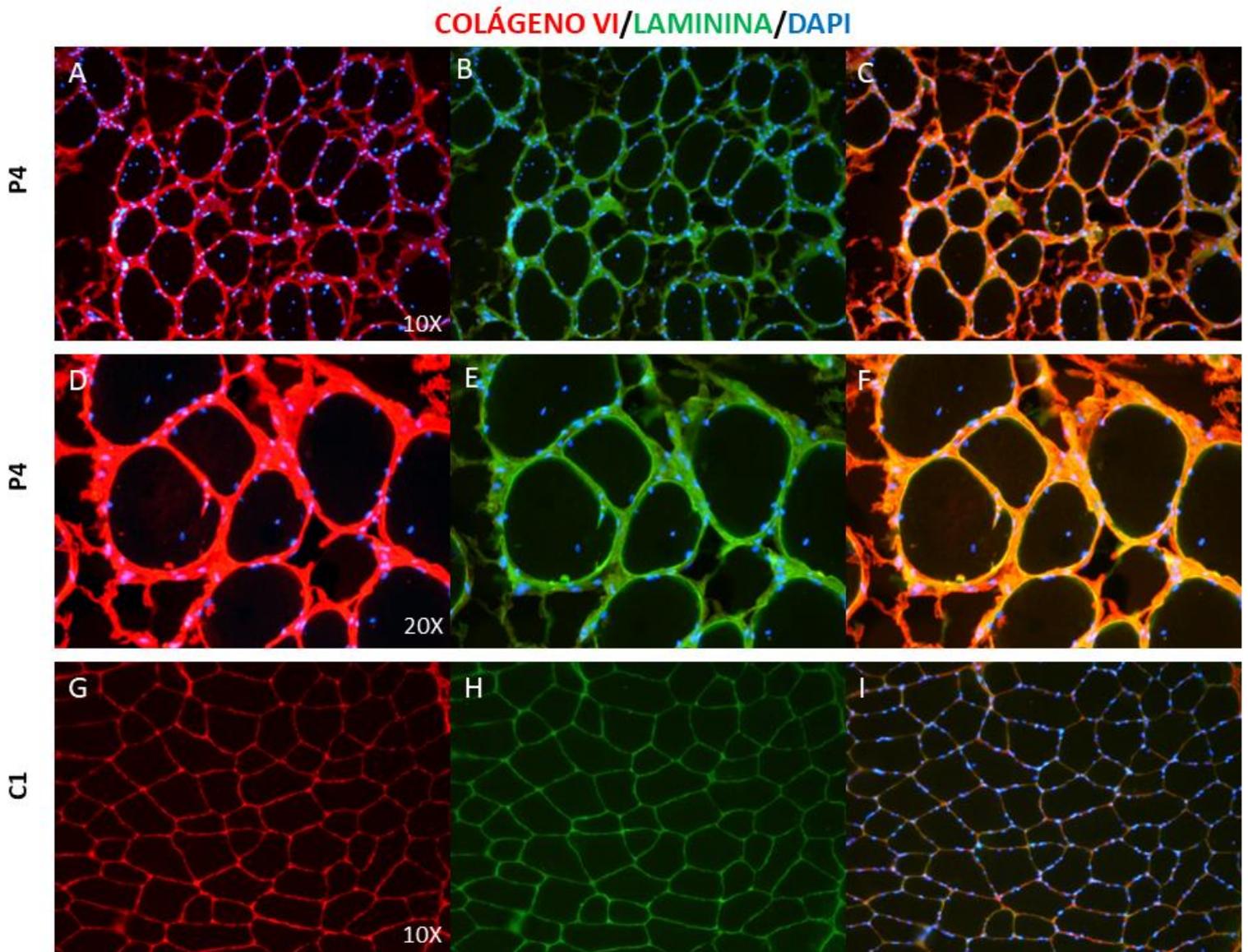
## GRUPO 2: colágeno con un patrón normal.

Este segundo grupo incluye a los pacientes con un patrón muy similar al de los controles evaluados anteriormente. La laminina y el colágeno VI se encuentran colocalizando en la membrana basal de las fibras, y el colágeno VI no difunde hacia el conectivo (Figura 10).



**FIGURA 10.** Doble inmunofluorescencia del tejido muscular esquelético de pacientes para el colágeno VI, la laminina y DAPI para los núcleos a 10X. (A-F) 2 pacientes con diagnóstico clínico relacionado con una patología muscular de fenotipo similar al del colágeno. (G-I) Paciente control. (A, D, G) Inmunofluorescencia del colágeno VI en rojo. (B, E, H) Inmunofluorescencia de la laminina en verde. (C, F, I) Imágenes combinadas.

Dentro de este grupo, se incluye también un paciente con un tejido muy distrófico y con una gran cantidad de núcleos, algunos de ellos centrales. Esta morfología hace que su patrón en la imagen de inmunofluorescencia sea dudoso, ya que el endomisio aparece ensanchado, pero se considera un paciente compatible con el patrón normal, ya que la laminina colocaliza con el colágeno VI (Figura 11).

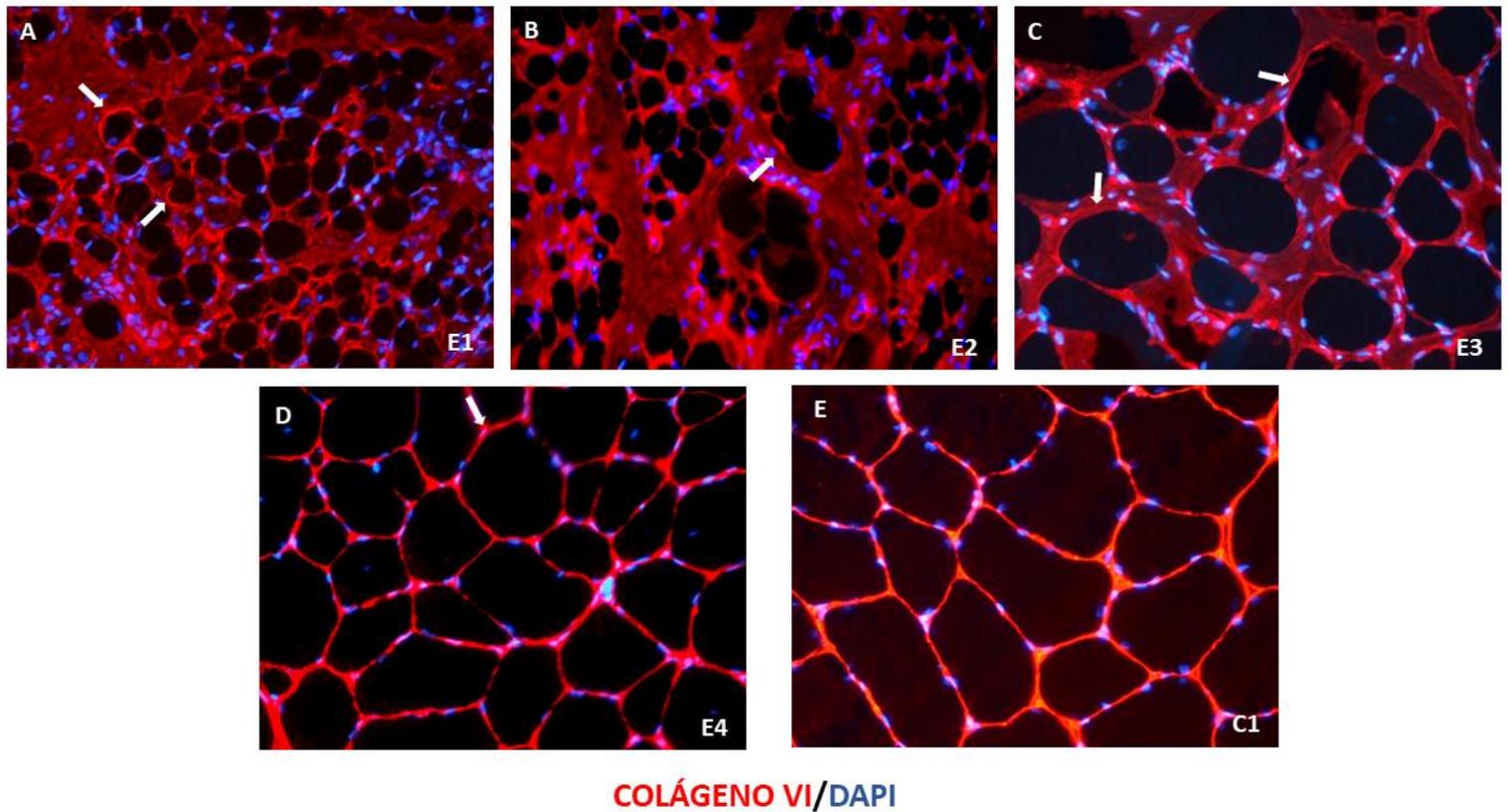


**FIGURA 11.** Doble inmunofluorescencia del tejido muscular esquelético de un paciente para el colágeno VI, la laminina y DAPI para los núcleos. (A-C) Paciente con diagnóstico clínico relacionado con una patología muscular de fenotipo similar al del colágeno en 10X. (D-F) Mismo paciente con diagnóstico clínico relacionado con una patología muscular de fenotipo similar al del colágeno en 20X (G-I) Paciente control. (A, D, G) Inmunofluorescencia del colágeno VI en rojo. (B, E, H) Inmunofluorescencia de la laminina en verde. (C, F, I) Imágenes combinadas.

También se ha realizado el análisis de la distribución del colágeno VI en otros pacientes con otras distrofias diferentes a las COL6-CMDs a partir de las imágenes de su inmunomarcaje.

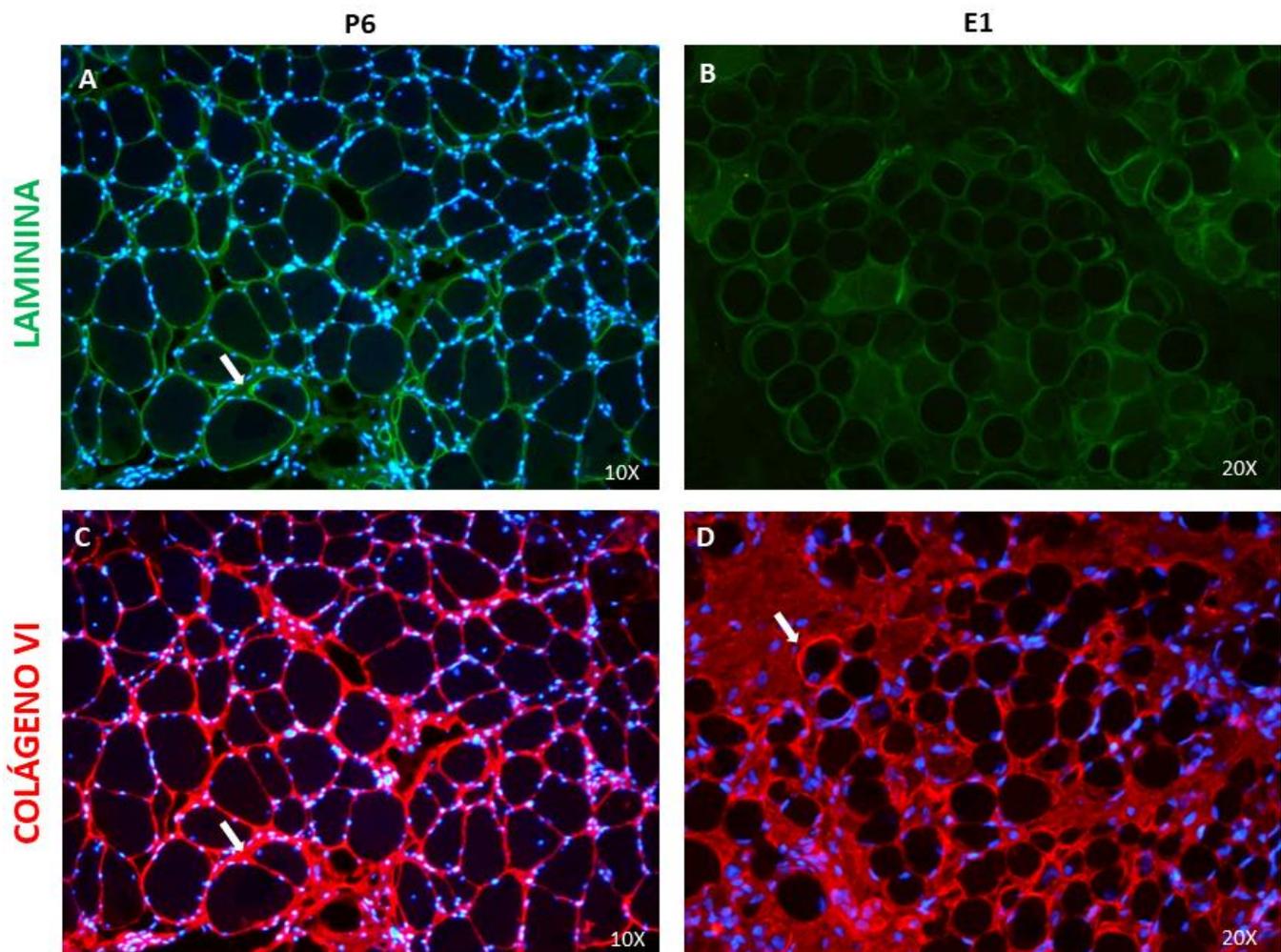
### GRUPO 3: pacientes con otras distrofias diagnosticadas diferentes a las COL6-CMDs.

Al analizar las imágenes, se puede observar que el colágeno VI en estos casos se encuentra marcado en la lámina basal de las fibras o se encuentra disminuido. En los pacientes E1, E2 y E3 se observa fibrosis endomisial, pero aun así se observa como la membrana está marcada en la mayoría de las fibras. En el caso del paciente que padece una distrofia de cinturas su patrón de colágeno VI es muy similar al del control (Figura 12).



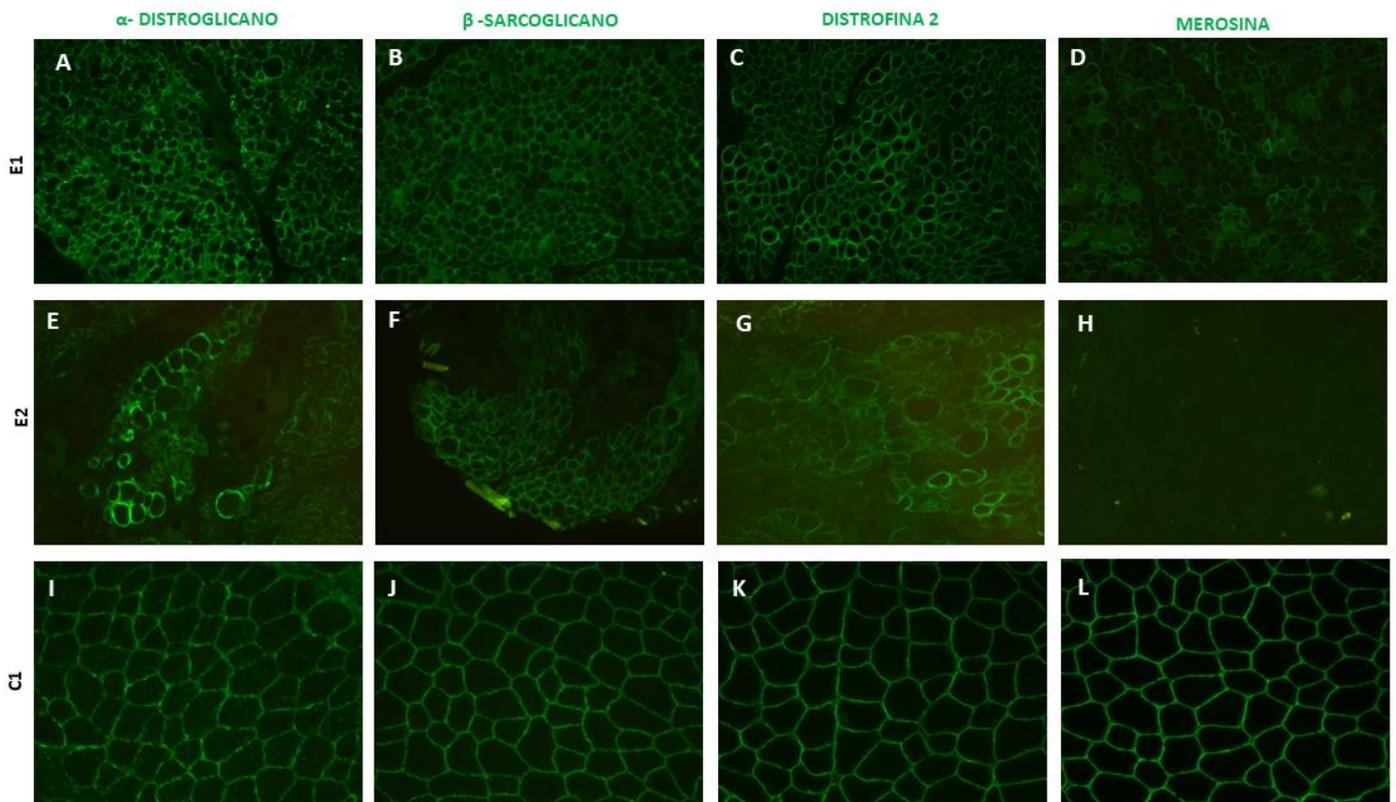
**FIGURA 12.** Inmunofluorescencia del colágeno VI en pacientes que presentan una miopatía no relacionada con colágeno VI. (A) Paciente con miopatía congénita (B) Paciente con miopatía congénita (C) Paciente con distrofia de Duchenne (D) Paciente con distrofia de cinturas (E) Paciente control.

A continuación, se ha comparado la imagen de uno de los pacientes que padecen una COL6-CMDs del grupo 1 descrito anteriormente y de otro individuo que presenta otra patología no relacionada con el colágeno VI. Al comparar los patrones de localización del colágeno VI de los dos tipos de pacientes se observa que en el caso del P6, la proteína se encuentra en el endomisio y no se localiza en la lámina basal. En el caso de E1, se encuentra en la lámina basal en algunas de las fibras, mientras que en algunas se observa su ausencia. No obstante, no aparece ensanchado en el conectivo. Respecto a la laminina, en el caso del P6, está marcada en la lámina basal, mientras que en E1 sólo está marcada en algunas fibras, ya que es un paciente que padece una miopatía congénita de la merosina (laminina  $\alpha 2$ ) (Figura 13).

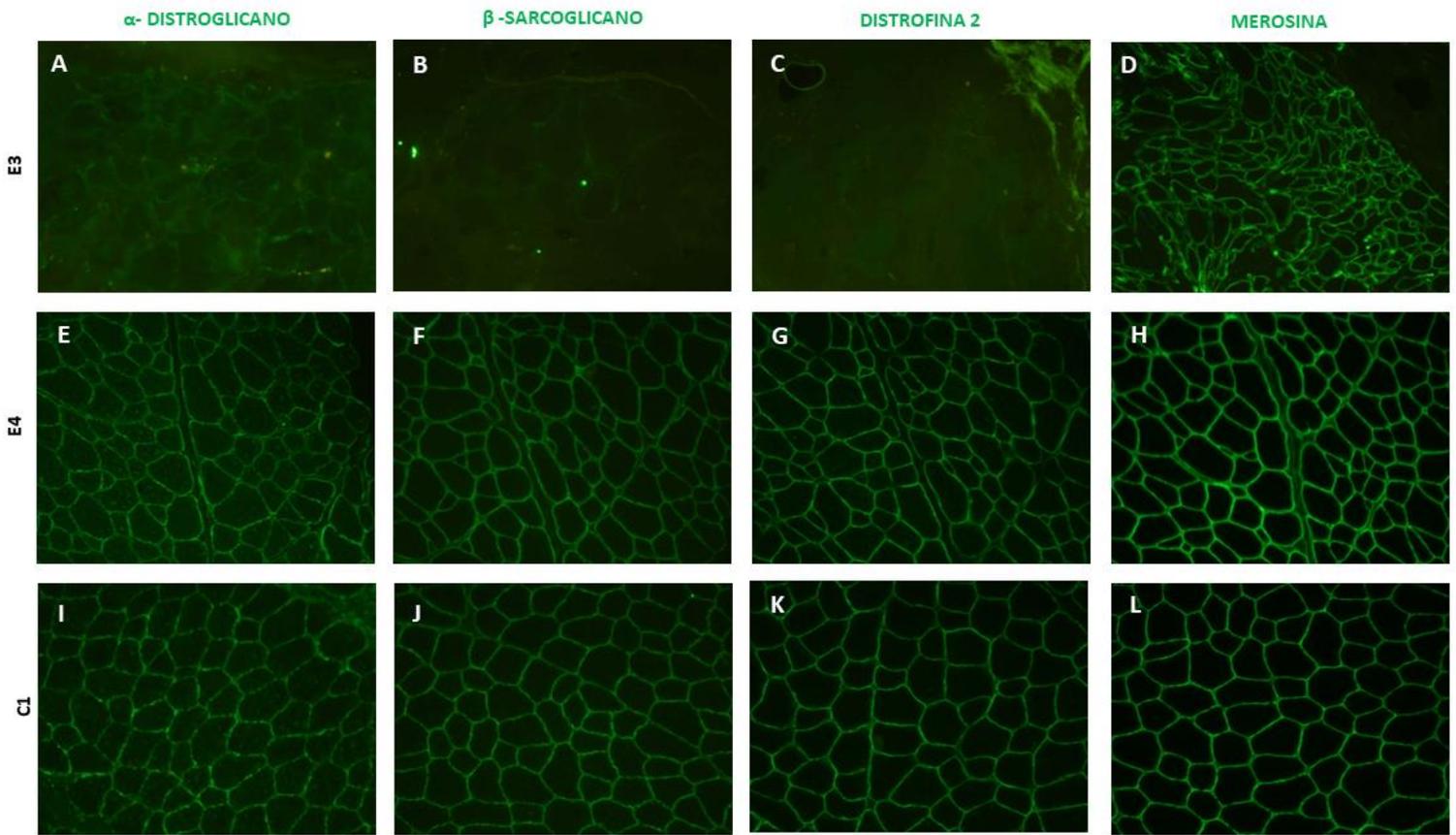


**FIGURA 13.** Inmunofluorescencia de la laminina y el colágeno VI en pacientes con COL6-CMDs y pacientes que no presentan una miopatía relacionada con colágeno VI. (A, C) Paciente con una miopatía relacionada con el colágeno VI. (B, D) Paciente con una miopatía no relacionada con colágeno VI (padece una miopatía congénita). (A-B) Inmunofluorescencia de la laminina en verde. (C-D) Inmunofluorescencia del colágeno VI en rojo.

Como estos pacientes presentan una alteración en alguno de los componentes que forman la membrana basal o el DGC, se ha realizado también el inmunomarcaje de algunas de las siguientes proteínas para evaluar cuál es su afectación:  $\alpha$ -dístroglicano, el  $\beta$ -sarcoglicano, la distrofina 2 y la merosina o laminina  $\alpha$ 2. En la Figura 14.1, quedan plasmadas las imágenes de los pacientes E1 y E2, que padecen una miopatía congénita que afecta a la merosina. En ambos casos, todas las proteínas aparecen bien marcadas en la membrana basal de las fibras, excepto la merosina que está disminuida. En el caso de la Figura 14.2, los pacientes E3 y E4 presentan una DMD y una distrofia de cinturas, respectivamente. En el caso del paciente con DMD, la merosina aparece bien marcada pero el resto de las proteínas aparecen disminuidas e, incluso, negativas como en el caso de la distrofina 2 y del  $\beta$ -sarcoglicano. Sin embargo, en el caso del paciente con distrofia de cinturas, todas estas proteínas presentan un patrón bastante normal.



**FIGURA 14.1.** Inmunofluorescencia del  $\alpha$ -dístroglicano, el  $\beta$ -sarcoglicano, la distrofina 2 y la merosina en verde en pacientes con miopatías no relacionadas con la alteración del colágeno VI. (A-D) Paciente con miopatía congénita. (E-H) Paciente con miopatía congénita. (I-L) Paciente control.



**FIGURA 14.2.** *Inmunofluorescencia del  $\alpha$ -dístroglicano, el  $\beta$ -sarcoglicano, la dístrofina 2 y la merosina en verde en pacientes con miopatías no relacionadas con la alteración del colágeno VI. (A-D) Paciente con distrofia de Duchenne. (E-H) Paciente con distrofia de cinturas. (I-L) Paciente control.*

### 4.3. DESCRIPCIÓN DE LOS GRUPOS DE PACIENTES SEGÚN LOS 3 CRITERIOS: genético, clínico e imagen.

A continuación, se incluye una breve descripción de todos los criterios utilizados para describir a cada paciente como resumen. (Tabla 8).

**TABLA 8.** Listado de los 10 pacientes que se han utilizado en este estudio y su descripción. Se indica el tipo de mutación, su tipo de fenotipo clínico y el grupo donde se incluyen según el análisis de la inmunofluorescencia.

IDENTIFICACIÓN PACIENTE	MUTACIÓN	PATOGENICIDAD DE LA MUTACIÓN	TIPO DE FENOTIPO CLÍNICO	ANÁLISIS DE LA IMAGEN
<b>P1</b>	COL6A1 c.8686 G>A	PATOGÉNICA	FENOTIPO COMPATIBLE	COLÁGENO VI CON PATRÓN IRREGULAR
<b>P2</b>	COL6A1 c.1855G>A	VARIANTE CON SIGNIFICADO INCIERTO	FENOTIPO COMPATIBLE	COLÁGENO VI CON PATRÓN NORMAL
<b>P3</b>	COL6A2 c.1405G>A	VARIANTE CON SIGNIFICADO INCIERTO	FENOTIPO NO COMPATIBLE	COLÁGENO VI CON PATRÓN IRREGULAR Y PARCHEADO
<b>P4</b>	COL6A2 c.955-3 C>G	POSIBLEMENTE PATOGÉNICA NO DESCRITA	FENOTIPO COMPATIBLE	COLÁGENO VI CON PATRÓN NORMAL DUDOSO
<b>P5</b>	COL6A2 c.2818 G>C +c.1975 C>T	VARIANTE CON SIGNIFICADO INCIERTO	FENOTIPO COMPATIBLE	COLÁGENO VI CON PATRÓN IRREGULAR Y PARCHEADO
<b>P6</b>	COL6A3 c.6029T>A+c.7447 A>G	POSIBLEMENTE PATOGÉNICAS	FENOTIPO COMPATIBLE	COLÁGENO VI CON PATRÓN IRREGULAR Y PARCHEADO
<b>P7</b>	No padece mutación	-	FENOTIPO PARCIALMENTE COMPATIBLE	COLÁGENO VI PATRÓN NORMAL
<b>P8</b>	No padece mutación	-	FENOTIPO COMPATIBLE	COLÁGENO VI CON PATRÓN PARCHEADO
<b>P9</b>	COL6A3 c.5341 A>G	VARIANTE CON SIGNIFICADO INCIERTO	FENOTIPO NO COMPATIBLE	COLÁGENO VI PATRÓN NORMAL
<b>P10</b>	No padece mutación	-	FENOTIPO PARCIALMENTE COMPATIBLE	COLÁGENO VI CON PATRÓN IRREGULAR

## 5. DISCUSIÓN:

Las COL6-CMDs son unas de las distrofias musculares congénitas más comunes. Existen dos posibles manifestaciones de estas enfermedades: la UCMD con un fenotipo bastante severo y, con una gravedad menor, BM. Estas miopatías están causadas por mutaciones en los genes que codifican las tres cadenas principales de esta proteína: COL6A1, COL6A2 y COL6A3 (López-Márquez *et al.*, 2022).

Esta proteína es uno de los componentes principales de la ECM de la mayoría de las células, que es esencial para muchos procesos fisiológicos. En el músculo esquelético concretamente, es necesario para conservar su arquitectura ya que se une a otras estructuras y proteínas que envuelven esta matriz (Solomon-Degefa *et al.*, 2020).

La asociación de los fenotipos de las miopatías relacionadas con el colágeno VI con sus genotipos resulta un gran reto debido a la heterogeneidad de las distintas mutaciones y las alteraciones clínicas que pueden padecer los pacientes. Una de las formas que se ha utilizado para tratar de evaluar la afectación del colágeno VI en estos casos es la inmunofluorescencia en cultivos de fibroblastos. Lo que se suele observar es que el colágeno se deposita en menor cantidad con aspecto manchado en la ECM y que también aparece en el interior celular (Butterfield *et al.*, 2013).

No obstante, en este trabajo se utiliza la técnica de inmunofluorescencia en tejido de músculo esquelético con la finalidad de validar su utilidad para caracterizar cada uno de estos casos. Esta elección se debe a que, en el laboratorio de Enfermedades Neuromusculares y Ataxias, donde se ha realizado este trabajo, las técnicas de marcaje de membrana se realizan en criocortes y no en cultivos de fibroblastos, como ocurre en otros laboratorios.

El análisis de las imágenes realizado ha permitido diferenciar a los individuos control de los pacientes enfermos. En la Figura 8, se observa como la expresión de estas dos proteínas se encuentra en la membrana basal en los individuos control, y la fluorescencia doble observada en la imagen es amarilla, resultado de la colocalización de ambas proteínas. Al comparar con los pacientes que padecen alguna COL6-CMDs, se comprueba que su distribución es muy diferente y que el colágeno VI se dispersa en los tejidos.

La comparación de las imágenes de inmunofluorescencia de los pacientes que padecen estas miopatías ha revelado que la técnica es útil para identificar un patrón patogénico de localización de la proteína, en el caso de haberlo. Se ha conseguido diferenciar entre 2 patrones dentro de este grupo de pacientes. En primer lugar, se han encontrado pacientes que presentan un patrón donde el colágeno VI se presenta de forma parcheada o de forma irregular en el tejido conectivo. Esto significa que el colágeno se localiza en el conectivo de algunas fibras, pero no de todas ellas o que, dentro de una misma fibra, solo se encuentra en algunas partes de dicho tejido conectivo. En estos casos, cuando se ha analizado la fluorescencia doble, se puede ver un color más anaranjado debido a la diseminación del colágeno VI (marcado en rojo) y la laminina, que sigue situada en la membrana basal (marcada en verde).

En segundo lugar, también se ha descrito un patrón clasificado como normal, donde esta proteína se encuentra colocalizando con la laminina en la membrana basal, igual que en los controles.

Además, se ha comparado su localización en otros tejidos distróficos para confirmar que el patrón patogénico del colágeno VI descrito en las anteriores pacientes es característico de estas enfermedades, y que no se expresa en otras miopatías distróficas cuando el tejido conectivo también se ve aumentado. Al analizar las imágenes, se ha corroborado que esta proteína se encuentra marcada en la lámina basal de sus fibras, aunque en algunas esté ausente, pero no se marca en el endomisio como en el caso de las colagenopatías.

No obstante, existen algunos casos dudosos, como el del P6 (Figura 11), donde la imagen obtenida con esta técnica no es del todo resolutive debido a que las membranas están muy rotas y el tejido es muy distrófico. En estas situaciones, existen otras posibilidades para completar su análisis como, por ejemplo, el cultivo de fibroblastos y su posterior inmunomarcado o el análisis del transcriptoma mediante RNAseq, por lo que existen varias perspectivas para continuar con este trabajo.

Entre las principales limitaciones que se han encontrado al realizar la parte experimental de este trabajo, ha surgido con el uso de la fluorescencia doble para el colágeno VI y la laminina. Estas dos proteínas se encuentran ambas localizadas en la ECM por lo que los colores de su fluorescencia en la imagen doble pueden entremezclarse y la evaluación de su distribución puede resultar dificultosa. Por ello, se han fotografiado las imágenes por ambos canales de fluorescencia por separado, de forma que esto ha permitido una mejor valoración de su localización.

## **6. CONCLUSIÓN:**

Se puede concluir que las técnicas de inmunomarcaje de biopsias musculares de pacientes que padecen un fenotipo sugerente o una variante genética que se puede vincular con una alteración del colágeno VI, resultan útiles para confirmar la patogenicidad de las VOUS o para seleccionar los casos que precisan análisis posteriores con metodología RNA-seq para identificar variantes intrónicas invisibles a las NGS. En cualquier caso, existe un porcentaje pequeño de pacientes que se mantienen en la incertidumbre y que deberán enfocarse con nuevos métodos en el futuro.

Además, se ha conseguido relacionar el patrón del marcaje del colágeno VI con los patrones clínicos, genéticos y radiológicos clasificando a los pacientes en distintos grupos después de analizar las 3 variables y el inmunomarcaje obtenido.

## 7. BIBLIOGRAFIA:

- Aguti, S., Bolduc, V., Ala, P., Turmaine, M., Bönnemann, C. G., Muntoni, F., & Zhou, H. (2020). Exon-Skipping Oligonucleotides Restore Functional Collagen VI by Correcting a Common COL6A1 Mutation in Ullrich CMD. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 21, 205–216. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.05.029>
- Allamand, V., Briñas, L., Richard, P., Stojkovic, T., Quijano-Roy, S., & Bonne, G. (2011). ColVI myopathies: where do we stand, where do we go? *Skeletal Muscle*, 1(1), 30. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-30>
- Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition*, 98(6), 236–238. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
- Biressi, S., Filareto, A., & Rando, T. A. (2020). Stem cell therapy for muscular dystrophies. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(11), 5652. <https://doi.org/10.1172/JCI142031>
- Briñas, L., Richard, P., Quijano-Roy, S., Gartioux, C., Ledeuil, C., Lacène, E., Makri, S., Ferreiro, A., Maugendre, S., Topaloglu, H., Haliloglu, G., Péniisson-Besnier, I., Jeannet, P. Y., Merlini, L., Navarro, C., Toutain, A., Chaigne, D., Desguerre, I., De Die-Smulders, C., ... Allamand, V. (2010). Early onset collagen VI myopathies: Genetic and clinical correlations. *Annals of Neurology*, 68(4), 511–520. <https://doi.org/10.1002/ana.22087>
- Butterfield, R. J., Foley, A. R., Dastgir, J., Asman, S., Dunn, D. M., Zou, Y., Hu, Y., Donkervoort, S., Flanigan, K. M., Swoboda, K. J., Winder, T. L., Weiss, R. B., & Bönnemann, C. G. (2013). Position of Glycine Substitutions in the Triple Helix of COL6A1, COL6A2, and COL6A3 is Correlated with Severity and Mode of Inheritance in Collagen VI Myopathies. *Human Mutation*, 34(11), 1558–1567. <https://doi.org/10.1002/HUMU.22429>
- Bushby, K. M. D., Collins, J., & Hicks, D. (2014). *Collagen Type VI Myopathies* (pp. 185–199). [https://doi.org/10.1007/978-94-007-7893-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-94-007-7893-1_12)
- Caria, F., Cescon, M., Gualandi, F., Pichiecchio, A., Rossi, R., Rimessi, P., Cotti Piccinelli, S., Gallo Cassarino, S., Gregorio, I., Galvagni, A., Ferlini, A., Padovani, A., Bonaldo, P., & Filosto, M. (2019). Autosomal recessive Bethlem myopathy: A clinical, genetic and functional study. *Neuromuscular Disorders*, 29(9), 657–663. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2019.07.007>
- Cescon, M., Gattazzo, F., Chen, P., & Bonaldo, P. (2015). *Collagen VI at a glance*. <https://doi.org/10.1242/jcs.169748>
- Earle, N., & Bevilacqua, J. A. (2018). Distrofias musculares en el paciente adulto. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 29(6), 599–610. <https://doi.org/10.1016/J.RMCLC.2018.08.006>
- Erazo-Torricelli, R. (2004). Updates in muscular dystrophies. *Revista de Neurología*, 39(9), 860–871. <https://doi.org/10.33588/rn.3909.2004182>
- Fernandez-Marmiesse, A., Gouveia, S., & Couce, M. L. (2018). NGS technologies as a turning point in rare disease research , diagnosis and treatment. *Current Medicinal Chemistry*, 25(3), 404–432. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170718101946>
- Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified Tissue International*, 96(3), 183–195. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>

- Gelse, K., Pöschl, E., & Aigner, T. (n.d.). *Collagens-structure, function, and biosynthesis*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>
- Lamandé, S. R. (2021). Collagen VI Muscle Disorders: Mutation Types, Pathogenic Mechanisms and Approaches to Therapy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1348, 311–323. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-80614-9\\_14/FIGURES/2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-80614-9_14/FIGURES/2)
- López-Márquez, A., Morín, M., Fernández-Peñalver, S., Badosa, C., Hernández-Delgado, A., Benito, D. N., Ortez, C., Nascimento, A., Grinberg, D., Balcells, S., Roldán, M., Moreno-Pelayo, M. Á., & Jiménez-Mallebrera, C. (2022). CRISPR/Cas9-Mediated Allele-Specific Disruption of a Dominant COL6A1 Pathogenic Variant Improves Collagen VI Network in Patient Fibroblasts. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 4410, 23(8), 4410. <https://doi.org/10.3390/IJMS23084410>
- Merlini, L., Martoni, E., Grumati, P., Sabatelli, P., Squarzoni, S., Urciuolo, A., Ferlini, A., Gualandi, F., & Bonaldo, P. (2008). Autosomal recessive myosclerosis myopathy is a collagen VI disorder. *Neurology*, 71(16), 1245–1253. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000327611.01687.5E>
- Mercuri, E., Bönnemann, C. G., & Muntoni, F. (2019). Muscular dystrophies. *The Lancet*, 394(10213), 2025–2038. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32910-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32910-1)
- Mohassel, P., Reghan Foley, A., & Bönnemann, C. G. (2018). Extracellular matrix-driven congenital muscular dystrophies. *Matrix Biology*, 71–72, 188–204. <https://doi.org/10.1016/J.MATBIO.2018.06.005>
- Mojiri, A., Nakhaii-Nejad, M., Phan, W.-L., Kulak, S., Radziwon-Balicka, A., Jurasz, P., Michelakis, E., & Jahroudi, N. (2013). Hypoxia results in upregulation and de novo activation of von Willebrand factor expression in lung endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(6), 1329–1338. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301359>
- NCI dictionary of genetics terms. (2012, julio 20). National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/genetics-dictionary/def/variant-of-unknown-significance>
- Odell, I. D., & Cook, D. (2013). Immunofluorescence techniques. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(1), 1–4. <https://doi.org/10.1038/JID.2012.455/ATTACHMENT/4517147B-C2D1-442F-88C0-3278BCD683DB/MMC4.PPT>
- Rodríguez M.A. (2016). Papel del colágeno VI en la homeostasis del músculo esquelético y el tejido adiposo: Implicaciones en la fisiopatología de las distrofias musculares. (Tesis de Doctorado) Univerisitat de Barcelona. Facultat de Biología. Barcelona. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10803/398992>.
- Sabatelli, P., Gualandi, F., Gara, S. K., Grumati, P., Zamparelli, A., Martoni, E., Pellegrini, C., Merlini, L., Ferlini, A., Bonaldo, P., Maraldi, N. M., Paulsson, M., Squarzoni, S., & Wagener, R. (2012). Expression of collagen VI  $\alpha 5$  and  $\alpha 6$  chains in human muscle and in Duchenne muscular dystrophy-related muscle fibrosis. *Matrix Biology*, 31(3), 187. <https://doi.org/10.1016/J.MATBIO.2011.12.003>
- Solomon-Degefa, H., Gebauer, J. M., Jeffries, C. M., Freiburg, C. D., Meckelburg, P., Bird, L. E., Baumann, U., Svergun, D. I., Owens, R. J., Werner, J. M., Behrmann, E., Paulsson, M., & Wagener, R. (2020). Structure of a collagen VI  $\alpha 3$  chain VWA domain array: adaptability and functional implications of myopathy causing mutations. *The Journal of Biological Chemistry*, 295(36), 12755. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA120.014865>

- Sorushanova, A., Delgado, L. M., Wu, Z., Shologu, N., Kshirsagar, A., Raghunath, R., Mullen, A. M., Bayon, Y., Pandit, A., Raghunath, M., & Zeugolis, D. I. (2019). The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, *31*(1). <https://doi.org/10.1002/ADMA.201801651>
- Suárez, B., Lozano-Arango, A., Araneda, D., Cortés, F., Hervias, C., Calcagno, G., Ortega, X., & Castiglioni, C. (2018). Miopatías relacionadas a colágeno VI. Cuando sospecharlas, cómo identificarlas. Aporte de la resonancia magnética muscular. *Revista Chilena de Pediatría*, *89*(3), 399–408. <https://doi.org/10.4067/S0370-41062018005000305>