

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

# Nuevas estrategias terapéuticas en la Distrofia Miotónica tipo 1 basadas en los mecanismos moleculares del envejecimiento y del cáncer

Mikel García Puga

Tesis Doctoral

2020



# Nuevas estrategias terapéuticas en la Distrofia Miotónica tipo 1 basadas en los mecanismos moleculares del envejecimiento y del cáncer

Mikel García Puga

2020

Directores: Dr. Ander Matheu y Dr. Adolfo López de Munain

Memoria presentada para optar al título de Doctor por la  
Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea

Tesis Doctoral

2020



# ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

3T3	<i>3-day transfer inoculum 3×10<sup>5</sup> cells</i> (Transferencia de 3 días, inóculo de 3×10 <sup>5</sup> células)
<b>A</b>	
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AHK	Ahulken
AHK6	Ahulken 6
AHK7	Ahulken 7
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i> (Proteína quinasa activada por AMP)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASO	<i>Antisense oligonucleotides</i> (Oligonucleótido antisentido)
ATG	Adenina-Tirosina-Guanina
ATP	Adenosina trifosfato
<b>B</b>	
BCA	Ácido bicinconínico
bp	<i>Base pair</i> (Pares de bases)
<b>C</b>	
CCG	Citosina-Citosina-Guanina
CCTG	Citosina-Citosina-Timina-Guanina
CM	<i>Conditioned medium</i> (Medio condicionado)
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CTC	Citosina-Timina-Citosina
CTG	Citosina-Timina-Guanina
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de cobre II
<b>D</b>	
D	Dasatinib
DDR	<i>DNA Damage Response</i> (Respuesta de Daño en el ADN)
DEPC	Dietil pirocarbonato
DM	Distrofia Miotónica
DM1	Distrofia Miotónica tipo 1
DM2	Distrofia Miotónica tipo 2
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
<b>E</b>	
ECAR	<i>Extracellular Acidification Rate</i> (Ratio de acidificación extracelular)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido Etileno Diamino Tetracético)
EdU	<i>5-ethynyl-2'-deoxyuridine</i> (5-etinilo 2'-deoxiuridina)
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Factor de crecimiento epidérmico)
<b>F</b>	
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Suero Bovino Fetal)
FCCP	<i>Carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazone</i> (Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona)
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> (factor de crecimiento de fibroblastos)

FSC	<i>Forware Scatter</i> (Detector de dispersión frontal)
<b>G</b>	GFP <i>Green Fluorescent Protein</i> (Proteína verde fluorescente)
	GGC Guanina-Guanina-Citosina
<b>H</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Peróxido de hidrógeno
	HBSS <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (Solución salina de Hank)
	HCl Ácido clorhídrico
	IgG <i>Immunoglobulin G</i> (Inmunoglobulina G)
	HRP <i>Horseradish peroxidase</i> (Peroxidasa de rábano)
	HSA <i>Human Skeletal <math>\alpha</math>-Actin</i> (Actina esquelética humana alfa)
<b>I</b>	IF Inmunofluorescencia
<b>K</b>	KO <i>Knock-Out</i>
<b>M</b>	M-199 <i>Medio de cultivo 199 suplementado con las sales de Earle</i>
	MGB <i>Minor groove binder</i> (Sonda de unión al surco menor del ADN)
	MIRS Muscular Impairment Rating Scale (Escala de discapacidad muscular)
	MOI <i>Multiplicity Of Infection</i> (Multiplicidad de infección)
	MTT Bromuro 3-(4,5 dimetil 2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio
<b>N</b>	N Navitoclax
	NaCl Cloruro de sodio
	NADH <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i> (Nicotinamida adenina dinucleótido)
	NaF Fluoruro de sodio
	NP-40 Nonyl phenoxypolyethoxyethanol
	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Pirofosfato de sodio
	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> Ortovanadato de sodio
<b>O</b>	OCR <i>Oxygen Consumption Rate</i> (Ratio de consumo de oxígeno)
	OMIM <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> (Base de datos Online de Herencia Mendeliana en Humanos)
	OXPHOS <i>Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System</i> (Fosforilación Oxidativa Mitocondrial)
<b>P</b>	PBMC <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (Células mononucleares de sangre periférica)
	PBS <i>Phosphate buffered saline</i> (Tampón fosfato salino)
	PCR <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
	PDL <i>Population Doubling Level</i> (Nivel de duplicación de la población)
	pH Potencial de hidrógeno
	PH3 <i>Phospho Histone H3</i> (Fosfo histona H3)
	PMSF <i>Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride</i> (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo)
<b>Q</b>	Q Quercetina
	qRT-PCR <i>Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (Transcripción reversa - Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)
<b>R</b>	RAN <i>Non-conventional repeat-associated non-ATG translation</i> (Traducción no convencional asociada a un inicio no ATG)
	RIN <i>RNA Integrity Value</i> (Valor de la Integridad del ARN)

ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Especies reactivas de oxígeno)
RT	<i>Reverse Transcription</i> (Transcripción Reversa)
RTL	<i>Relative Telomere Length</i> (Longitud Telomérica Relativa)
<b>S</b>	
SASP	<i>Senescence Associated Secretory Phenotype</i> (Fenotipo secretor asociado a la senescencia)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> (Error estándar de la media)
SIR	<i>Standardized Incidence Ratio</i> (Ratio Estandarizado de Incidencia)
SNC	Sistema Nervioso Central
SSC	<i>Side Scattered</i> (Detector de dispersión lateral)
<b>T</b>	
TBS-T	<i>Tris Buffered Saline with Tween 20</i> (Solución salina tamponada con Tris y con Tween 20)
Tris	Trisaminometano
TTAGGG	Timina-Timina-Adenica-Guanina-Guanina-Guanina
<b>U</b>	
UTR	<i>Untranslated region</i> (Región no traducida)
<b>W</b>	
WB	<i>Western-Blot</i>
<b>X</b>	
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

## Nomenclatura de los genes más importantes

53BP1	<i>Tumor protein p53 binding protein 1</i> (Proteína tumoral 1 de unión a p53)
<b>B</b> BMI1	<i>Proto-oncogene, Polycomb ring finger protein</i> (Proteína proto-oncogénica del tipo "dedo de anillo" perteneciente al complejo Polycomb)
BRCA1	<i>BRCA1 DNA repair associated</i> (Proteína asociada a la reparación del ADN)
<b>C</b> CUGBP	<i>CUGBP Elav-like family proteins</i> (Familia de proteínas de tipo Elav)
<b>D</b> DMPK	<i>Dystrophia Myotonica-Protein Kinase</i> (Proteína Quinasa de la Distrofia Miotónica)
DMWD	<i>Myotonica-containing WD repeat motif protein</i> (Proteína de la Distrofia Miotónica que contiene secuencias repetidas del tipo WD)
DRP1	<i>Dynamin 1 like protein</i> (Proteína Dinamina del tipo 1)
<b>G</b> GPx1	<i>Glutathione Peroxidase 1</i> (Glutatión peroxidasa 1)
<b>H</b> $\gamma$ -H2AX	<i>Variante fosforilada de la familia de histonas H2A</i>
<b>I</b> IL-6	<i>Interleukin 6</i> (Interleucina 6)
KI-67	<i>Marker of proliferation Ki-67</i> (Marcador de proliferación KI-67)
<b>M</b> MBNL	<i>Muscleblind like splicing regulator family proteins</i> (Familia de proteínas de Muscleblind reguladoras del <i>splicing</i> )
MFN	<i>Mitofusin</i> (Mitofusina)
<b>O</b> OPA1	<i>Mitochondrial dynamin like GTPase</i> (Dinamina mitocondrial de tipo GTPasa)
<b>P</b> p14 <sup>ARF</sup>	<i>Alternate Reading Frame protein of Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i> (Proteína alternativa del inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina)
p16 <sup>INK4a</sup>	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i> (Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina)
p21 <sup>CIP1</sup>	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i> (Inhibidor 1A de quinasa dependiente de ciclina)
p27 <sup>KIP1</sup>	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1B</i> (Inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina)
p38 MAPK	<i>p38 Mitogen-Activated Protein Kinase</i> (Proteína quinasa p38 activada por mitógenos)
PGC1- $\alpha$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha</i> (Receptor gamma y co-activador 1 alfa de peroxisoma que se activa por proliferación)
<b>S</b> SIX5	<i>SIX homeobox 5 transcription factor</i> (Factor de transcripción homeobox 5)
<b>T</b> TFAM	<i>Mitochondrial transcription factor A</i> (Factor de transcripción mitocondrial A)
TOMM20	<i>Translocase of outer mitochondrial membrane 20</i> (Translocador 20 de la membrana mitocondrial externa)
<b>Z</b> ZEB	<i>Zinc finger E-box binding homeobox proteins</i> (Proteínas homeobox con dedo de zinc de unión a E-box)



## **ANGLICISMOS**

Se ha procurado evitar aquellos términos que tienen un equivalente adecuado en castellano y permanecen aquellos que por su amplia difusión en la comunidad científica resultan más adecuados para la correcta comprensión del texto.

**Splicing:** Con este término nos referimos al proceso mediante el cual los intrones son escindidos del transcrito de ARN mensajero primario y los exones se unen para generar un ARN mensajero maduro.

**Knock-out:** Con este término hacemos referencia a un organismo, un ratón o una mosca, modificado por ingeniería genética para que uno o más de sus genes estén inactivados mediante la técnica de bloqueo de genes.



## **RESUMEN**

La distrofia miotónica (DM) es un desorden neuromuscular multisistémico transmitido con herencia autosómica dominante, del que se distinguen dos tipos en base a su diferente origen molecular. La DM1 está causada por la expansión del trinucleótido CTG en la región 3' no traducida del gen *DMPK* localizado en el cromosoma 9, y la DM2 está causada por la expansión del tretranucleótido CCTG en el gen *CNBP* localizado en el cromosoma 3. En términos generales, aunque ambas distrofias presentan un catálogo de síntomas y signos superponibles, la DM1 presenta un fenotipo más grave que la DM2. Además, en la DM1 el tamaño de la expansión CTG se asocia con la gravedad de la enfermedad, de manera que un individuo sano posee hasta 35-50 repeticiones, mientras que los individuos gravemente afectados presentan entre 100 y 3.000 repeticiones CTG. A pesar de que la DM1 es una enfermedad neuromuscular rara, en la región de Guipúzcoa la prevalencia es superior a 26 casos cada 100.000 habitantes.

Desde un punto de vista clínico, los pacientes con DM1 experimentan un proceso degenerativo multisistémico que cursa con atrofia y debilidad muscular, miotonía, cardiomiopatía, cataratas, alopecia, síndrome metabólico con resistencia a la insulina, mayor riesgo a desarrollar neoplasias y una afectación del sistema nervioso central, entre otros. Todo ello conlleva una reducción en su esperanza de vida y una importante pérdida en su calidad de vida. Desafortunadamente, a día de hoy, no existe ningún tratamiento eficaz contra la DM1.

La mayoría de estas manifestaciones clínicas se podrían considerar manifestaciones de un envejecimiento fisiológico precoz, por lo que las alteraciones presentes en el envejecimiento podrían estar jugando un papel importante en el desarrollo de la DM1. En este contexto, los objetivos de esta tesis son el análisis de los procesos moleculares propios del envejecimiento celular en los pacientes con

DM1, el estudio del riesgo a desarrollar cáncer en la cohorte de pacientes con DM1 de Guipúzcoa y el testado de diferentes compuestos con función anti envejecimiento como posible nueva estrategia terapéutica frente a la DM1.

En esta tesis describimos, mediante un análisis transcriptómico en fibroblastos primarios derivados de pacientes con DM1, que los procesos de regulación del ciclo celular, de división celular y de respuesta al daño en el ADN están disminuidos en fibroblastos, además de en células sanguíneas de PBMC de dichos pacientes, y que estas alteraciones serían un requisito necesario para el desarrollo de una senescencia prematura, donde la vía de BMI1 – p16<sup>INK4a</sup> ejerce un papel importante. Por otra parte, demostramos una disminución en el metabolismo y actividad mitocondrial en los fibroblastos derivados de pacientes con DM1. Adicionalmente, estos resultados han sido validados en muestras sanguíneas confirmando que las alteraciones en procesos clave que ocurren durante el envejecimiento fisiológico se dan de una manera prematura y exacerbada en la DM1.

En línea con esta idea, observamos, mediante un estudio longitudinal, que las PBMC derivadas de pacientes con DM1 sufren un acortamiento telomérico más acentuado que las de los controles con el paso del tiempo. Dado que el cáncer y el envejecimiento están estrechamente relacionados, la alteración de estos mismos procesos moleculares podría explicar la observación clínica de que los pacientes con DM1 presentan un mayor riesgo para desarrollar neoplasias, siendo este riesgo mayor en mujeres que en hombres en la cohorte de pacientes establecida en el Hospital Universitario Donostia.

En resumen, los pacientes con DM1 presentan una alteración en la regulación de la proliferación celular, en la respuesta al daño en el ADN, en el desarrollo de una senescencia prematura y en el metabolismo mitocondrial, junto con un acortamiento telomérico exacerbado, todos ellos procesos moleculares y

patologías vinculadas al envejecimiento y al riesgo oncogénico, lo que refuerzan la hipótesis de considerar a la DM1 como una enfermedad caracterizada por un envejecimiento prematuro de los sistemas biológicos.

Por último, esta tesis ha querido investigar de manera preclínica el potencial efecto terapéutico tanto de compuestos nuevos y de fármacos reposicionados como terapias antienvjecimiento. Se han testado los compuestos senolíticos (quercetina, dasatinib y navitoclax) y la metformina, así como una nueva serie de compuestos de desarrollo propio, denominados ahulkenoides (AHK). Todas estas estrategias tuvieron un efecto beneficioso muy potente en cultivos celulares *in vitro* y también *in vivo* en el modelo de DM1 en *Drosophila melanogaster*.

En definitiva, en esta tesis aportamos datos experimentales robustos que avalan que los pacientes con DM1 poseen alteraciones en varios procesos clave del envejecimiento fisiológico y que dichas alteraciones se pueden revertir mediante distintas aproximaciones antienvjecimiento, constituyendo éstas una nueva aproximación terapéutica para los pacientes con DM1.









# **ÍNDICE DE CONTENIDOS**

<b>ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS .....</b>	<b>I</b>
<b>SIGNIFICADO DE LOS GENES.....</b>	<b>IV</b>
<b>ANGLICISMOS.....</b>	<b>V</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>VII</b>

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
---------------------------	----------

<b>1. Distrofia Miotónica .....</b>	<b>3</b>
-------------------------------------	----------

1.1. Concepto. Historia de la entidad. Nosología. DM1 y DM2 .....	3
1.2. Epidemiología .....	5
1.3. Bases genéticas de la enfermedad.....	8
1.4. Manifestaciones clínicas .....	11
1.5. Subtipos clínicos de DM1 .....	19
1.6. Diagnóstico .....	23
1.7. Mecanismos moleculares de la enfermedad .....	24
1.8. Modelos animales para el estudio de la DM1 .....	30
1.9. Tratamiento actual y aproximaciones terapéuticas en curso.....	35

<b>2. Distrofia Miotónica tipo 1 y envejecimiento .....</b>	<b>38</b>
---	-----------

2.1. El concepto de envejecimiento .....	38
2.2. Manifestaciones de envejecimiento en la DM1 a nivel sistémico.....	39
2.3. Fisiología molecular del envejecimiento en la DM1.....	42
2.4. El calcio durante el envejecimiento.....	45
2.5. Rasgos moleculares alterados en el envejecimiento y en el cáncer .....	46
2.5.1. Acortamiento telomérico en cáncer y envejecimiento .....	47
2.5.2. Senescencia celular en cáncer y envejecimiento .....	49

<b>3. Bases racionales para una terapia antienvjecimiento en la DM1 .....</b>	<b>52</b>
3.1. Nuevas aproximaciones basadas en compuestos anti envejecimiento...	52
3.1.1. Metformina .....	53
3.1.2. Compuestos senolíticos .....	54
3.2. Aproximaciones orientadas a mejorar la homeostasis del calcio .....	57
 <b>HIPÓTESIS.....</b>	 <b>59</b>
 <b>OBJETIVOS .....</b>	 <b>63</b>
 <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	 <b>69</b>
1. Muestras y líneas celulares humanas .....	71
1.1. Consideraciones éticas .....	71
1.2. Muestras de sangre y aislamiento de PBMC .....	71
1.3. Aislamiento y cultivo de fibroblastos primarios .....	72
1.4. Cultivo de mioblastos primarios .....	73
2. Modelos animales .....	75
2.1. Modelo en mosca .....	75
2.2. Modelo en ratón .....	76
3. Ensayos funcionales en cultivos celulares.....	77
3.1. Ensayo de proliferación .....	77
3.2. Ensayo 3T3 de inducción de senescencia.....	77
3.3. Ensayo de $\beta$ -Galactosidasa .....	77
3.4. Ensayo de viabilidad celular MTT .....	78
3.5. Medida de la producción de peróxido de hidrógeno .....	79
3.6 Determinación del potencial de membrana mitocondrial, cantidad de mitocondrias y cantidad de ROS producido por mitocondrias .....	80
3.7. Estudio del metabolismo mitocondrial .....	81
3.8. Estudio de la glicolisis .....	86
3.9. Modulación de la expresión génica mediante infección lentiviral .....	89

4. Análisis de la expresión proteica .....	90
4.1. Extracción y cuantificación de proteínas .....	90
4.2. Western-Blot .....	91
4.3. Inmunofluorescencia .....	93
4.4 Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH) .....	96
5. Array de citoquinas .....	97
6. Análisis de la expresión génica .....	98
6.1. Extracción del ARN total.....	98
6.2. Transcripción reversa .....	99
6.3. PCR cuantitativa a tiempo real .....	99
6.4. Análisis de <i>splicing</i> alternativo .....	101
6.5. Microarrays de expresión génica .....	102
6.5. RNA-Seq .....	102
7. Análisis estadístico .....	103

**RESULTADOS ..... 105**

CAPÍTULO 1: Cancer risk in DM1 is sex-related and linked to miRNA-200/141 downregulation ..... 105

CAPÍTULO 2: Leukocyte telomere length in patients with Myotonic Dystrophy type I: a pilot study ..... 133

CAPÍTULO 3: Whole transcriptome analysis and functional studies reveal that senescence plays a pivotal role in Myotonic Dystrophy ..... 153

CAPÍTULO 4: Myotonic Dystrophy type 1 cells display impaired metabolism and mitochondrial dysfunction that are reversed by metformin..... 205

CAPÍTULO 5: Novel family of AHK compounds: a novel therapeutic strategy against Myotonic Dystrophy ..... 243

**DISCUSIÓN GENERAL ..... 269**

**CONCLUSIONES ..... 303**

**BIBLIOGRAFÍA..... 309**

<b>ANEXOS .....</b>	<b>339</b>
Anexo 1. Resolución CEIC. ....	341
Anexo 2. Consentimiento Informado .....	343
Anexo 3. Hoja de Información al Paciente .....	349
Anexo 4. Escala MIRS.....	351
Anexo 5. Listado de muestras .....	353
<b>PUBLICACIONES .....</b>	<b>357</b>





## ***INTRODUCCIÓN***

---





## **1. DISTROFIA MIOTÓNICA**

### **1.1 CONCEPTO. HISTORIA DE LA ENTIDAD. NOSOLOGÍA. DISTROFIA MIOTÓNICA TIPO 1 Y TIPO 2**

La Distrofia Miotónica (DM) fue descrita por primera vez por el médico alemán Hans Steinert en 1909 (Mishra *et al.*, 2018). Sin embargo, ya había sido documentado algún caso aislado por Frederick Eustace Batten y Heinrich Curschmann, su mentor, pero ninguno de ellos había asociado los síntomas a una enfermedad concreta. Es por ello por lo que también se le denomina enfermedad de Curschmann-Steinert-Batten (Olbrych-Karpinska and Tutaj, 1981; Wagner and Steinberg, 2008). En su artículo original, Steinert describió 6 casos de la enfermedad, incluyendo desde pacientes con inicio de la enfermedad en la infancia hasta pacientes con debut en la edad adulta, tanto con antecedentes familiares como sin ellos. Muchos de estos pacientes recapitulaban de manera bastante fiel lo que hoy en día entendemos como DM. Fue el fallecimiento de uno de sus pacientes lo que le dio a Steinert la oportunidad de estudiar en detalle gran parte de la musculatura que se encuentra afectada en la enfermedad. Sin embargo, no fue hasta 83 años después, en 1992, cuando se identificó la causa molecular de la enfermedad (Brook *et al.*, 1992; Wagner and Steinberg, 2008).

A día de hoy se ha acumulado un gran conocimiento sobre la fisiopatología de la enfermedad, de la que se conoce que es multisistémica, transmitida por herencia autosómica dominante, y con un fenotipo clínico variable y complejo. Entre los síntomas más característicos de la enfermedad se encuentran la miotonía progresiva, la degeneración y debilidad muscular, la pérdida de masa muscular, los defectos en la conducción y el ritmo cardiaco, las cataratas iridiscentes subcapsulares posteriores y los trastornos endocrinos, entre otros. Por tanto, aunque la DM se clasifica dentro de las enfermedades neuromusculares, afecta a

## INTRODUCCIÓN

tantos sistemas que debe visualizarse realmente como una condición multisistémica (Harper, 2002).

Se distinguen dos tipos de distrofia miotónica con bases moleculares diferentes: la DM tipo 1 (DM1, OMIM #160900) y la DM tipo 2 (DM2, OMIM #602668) (**Tabla I1**). Ambos tipos presentan un conjunto de rasgos clínicos semejantes, pero tienen una causa genética diferente y, aunque ambas enfermedades se consideran afecciones degenerativas de progresión lenta, generalmente la DM1 es clínicamente más grave que la DM2 (Thornton, 2014).

La DM1 está causada por la expansión de un trinucleótido "CTG" en la región 3' UTR del gen de la proteína quinasa de la distrofia miotónica, denominado *DMPK*. En cambio, la DM2 está causada por la expansión del tetranucleótido "CCTG" en el intrón 1 del gen *CNBP*, que codifica una proteína de unión a ADN y a ARN de tipo "dedos de zinc". El tamaño de la expansión del nucleótido también difiere entre las dos distrofias, siendo mucho mayor en el caso de la DM1. Otra diferencia relevante es el hecho de que en la DM1 la longitud de la expansión correlaciona de manera negativa con la edad de inicio y con la gravedad de la enfermedad, lo que no se observa en la DM2 (Meola *et al.*, 2015; De Antonio *et al.*, 2016).

Por otra parte, ambas enfermedades también difieren en cuanto a su distribución geográfica. Así, mientras la DM1 se encuentra distribuida ampliamente por todo el mundo, aunque es más frecuente en poblaciones caucásicas y muy rara en África subsahariana, la DM2 tiene una distribución geográfica mucho más restringida, siendo más frecuente en poblaciones originarias del norte de Europa (Meola and Cardani, 2017).

**Tabla 11.** Semejanzas y diferencias entre DM1 y DM2. Modificado de Meola et al. 2015.

	<b>DM1</b>	<b>DM2</b>
<b>Aspectos moleculares</b>		
Gen afectado	<i>DMPK</i> ; Cromosoma 19	<i>CNBP</i> ; Cromosoma 3
Microsatélite repetido	CTG	CCTG
Localización de la expansión	3' UTR	Intrón 1
Tamaño de la expansión	100-3.000	100-10.000
Penetrancia	100%	100%
Inestabilidad somática	Presente	Presente
Anticipación	Presente	En algunos casos
Inestabilidad intergeneracional	Sí	Sí

<b>Aspectos generales</b>		
Distribución	Mundial, a excepción de África	Preferentemente en poblaciones de origen europeo
Prevalencia	12.5-189/100.000	1-9/100.000
Edad de debut	A cualquier edad	En edad adulta
Forma congénita	Presente	Ausente
Esperanza de vida	Reducida	Normal
Músculo afecto	Distal/Proximal	Proximal
Fibras afectas	Tipo 1	Tipo 2

## 1.2. EPIDEMIOLOGÍA

La DM1 es la enfermedad neuromuscular hereditaria más frecuente en la edad adulta. Las tasas de prevalencia detectadas en varios estudios epidemiológicos oscilan entre 2.1 y 189 casos por cada 100.000 habitantes, siendo la prevalencia media mundial estimada de 12.5/100.000 (Harper, 2002; Musova et al., 2009).

Aunque se observa una amplia distribución de la enfermedad en todo el mundo, algunas regiones presentan unas prevalencias especialmente elevadas. La prevalencia más elevada se da en la población francocanadiense de la región del Saguenay-Lac-St-Jean en Quebec (Canadá), con 189 casos por cada 100.000

## INTRODUCCIÓN

habitantes (De Braekeleer, 1991; Mathieu *et al.*, 1990). En dicha región se identificó a 746 pacientes en una población de 285.000 habitantes distribuidos en 88 familias de esta región. En otras regiones del mundo también se presentan prevalencias superiores a la media, como es el caso de la región de Guipúzcoa, con 26.5 casos cada 100.000 habitantes (Lopez de Munain *et al.*, 1993); Finlandia, con 44/100.000 (Suominen *et al.*, 2011); la región de Norrbottens en Suecia, con 36.50/100.000 y la isla de Guam (Micronesia, Pacífico Occidental), con 76.30/100.000, entre otros. Como causa de la elevada prevalencia en Canadá se argumenta la presencia de un efecto fundador con un fuerte aislamiento tanto genético como geográfico de la población, que, a su vez, podría explicar la elevada prevalencia hallada en Guipúzcoa y en Finlandia, debido a que sus poblaciones también presentan un fuerte aislamiento genético y geográfico (Behar *et al.*, 2012; Kaariainen *et al.*, 2017). Se ha determinado que la introducción de la mutación en Quebec se dio en 1657 cuando Noël Simard emigró de Francia a Canadá y allí se casó con Marie-Madeleine Racine, también de origen francés, siendo uno de los dos el que transmitió la enfermedad a su descendencia, documentándose muy rigurosamente la segregación de la mutación durante 14 generaciones (Mathieu *et al.*, 1990).

En otras regiones del mundo se han encontrado prevalencias en torno a la media mundial como es el caso del norte de Italia, con 9.31/100.000 (Siciliano *et al.*, 2001a); Japón con 9.40/100.000 (Nakagawa *et al.*, 1991), Irlanda del Norte, con 11.95/100.000 (Magee and Nevin, 1999) y 17.8/100.000 en la región de Gotemburgo, en Suecia (Lindberg and Bjerkne, 2017). En Israel se han observado prevalencias inferiores a las de Europa, con 2 casos cada 100.000 habitantes (Ashizawa and Epstein, 1991). No obstante, en estudios más recientes en población la judía de Israel se han documentado unas prevalencias de 15.7/100.000, con marcadas diferencias entre comunidades. Así, los judíos Askhenazis poseen la prevalencia más baja, con 5.7/100.000 mientras que los sefardíes/judíos orientales

y los judíos yemeníes presentan una prevalencia destacada, con 20 y 47.3 casos cada 100.000 habitantes, respectivamente (Segel *et al.*, 2003).

En otras regiones del mundo se han hallado las prevalencias más bajas de la enfermedad, como en Hong Kong y Taiwán (con 0.37 y 0.46 casos cada 100.000, respectivamente) (Pan *et al.*, 2001). Además, la presencia de la enfermedad en poblaciones autóctonas tanto de África como de Australia y América, es prácticamente nula, con algunos casos aislados detectados (Ashizawa and Epstein, 1991; Goldman *et al.*, 1996a; Goldman *et al.*, 1994, 1996b).

Es importante mencionar que es probable que la tasa de prevalencia en casi todas las poblaciones esté infraestimada, tanto en las regiones donde encontramos prevalencias bajas, como en las regiones con una alta prevalencia, debido, entre otras causas, a la existencia de individuos presintomáticos o con una sintomatología muy leve, los cuales no se contabilizan en los estudios epidemiológicos. Cabe destacar que en las regiones donde se ha estudiado la evolución de la prevalencia a lo largo del tiempo, como es el caso de Japón, Croacia o Inglaterra, se ha producido un aumento en el diagnóstico de la misma, probablemente debido al mayor conocimiento que se tiene hoy en día de la enfermedad y a las mejoras diagnósticas (Harper, 2002).

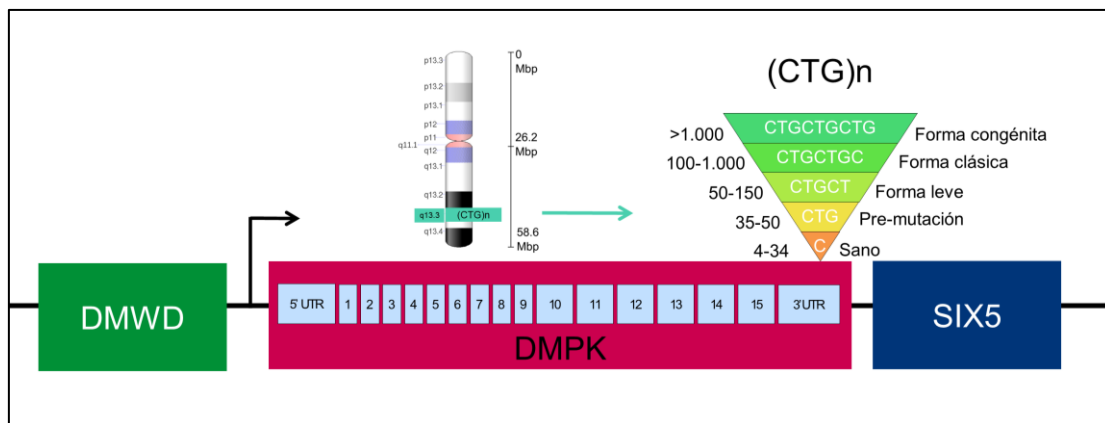
### 1.3. BASES GENÉTICAS DE LA ENFERMEDAD

Como se ha comentado anteriormente, la DM1 está causada por la expansión del microsatélite CTG en el gen de la proteína quinasa de la distrofia miotónica (*DMPK*, del inglés, "*Dystrophia Myotonica Protein Kinase*") (OMIM #605377). Este gen localizado en el cromosoma 19, tiene un tamaño de 3.243 bp y contiene 15 exones, habiéndose identificado hasta 7 variantes de *splicing* que difieren en su extremo 5'. La inserción de este microsatélite se produce en la región 3' no traducida de dicho gen, con lo que no se altera la estructura codificante de la proteína. La inserción del microsatélite va a causar la afectación de los genes adyacentes *SIX5* y *DMWD* (**Figura 11**). El patrón de herencia es autosómico dominante, por lo que los individuos afectados o los portadores, aunque sean oligosintomáticos o asintomáticos, pueden transmitir la enfermedad, sin diferencias en la incidencia ni en el riesgo de transmisión entre ambos sexos.

La DM1 es uno de los aproximadamente 30 desórdenes neurológicos causados por expansiones inestables de repeticiones en tándem, junto con la ataxia de Friedreich o la enfermedad de Huntington, (Jones *et al.*, 2017; McMurray, 2010; Monckton and Caskey, 1995).

En la población sana el número de tripletes varía entre 5 y 37 repeticiones, siendo la transmisión intergeneracional estable, mientras que en los pacientes con DM1 oscila entre 100 y 3.000 repeticiones, siendo la transmisión intergeneracional inestable. El rango de repeticiones tiene un importante impacto en la enfermedad. En este sentido, en un rango de tripletes que oscila entre 35 y 100 repeticiones, la expansión se corresponde a una fase de la enfermedad que se denomina de premutación. En esta situación, los individuos son prácticamente asintomáticos sin una evidencia clínica de enfermedad neuromuscular, pero pueden transmitir el alelo afecto a la descendencia. Este alelo inestable puede expandirse, es decir, aumentar el número de tripletes, de generación en generación, presentándose la DM1 con

una gravedad mayor en las generaciones futuras. Este fenómeno se conoce como anticipación genética (De Temmerman *et al.*, 2004). Se ha demostrado que la presencia de estos alelos inestables se produce tanto en células germinales como en las somáticas, de forma que a mayor número de repeticiones encontramos una mayor inestabilidad del triplete y una mayor probabilidad de una expansión de la mutación (Martorell *et al.*, 1998; Meola and Cardani, 2015; Monckton and Caskey, 1995; Pratte *et al.*, 2015).



**Figura I1.** Representación gráfica del *locus DMPK*, junto con los genes adyacentes *SIX5* y *DMWD*. En la imagen se representa la localización citogenética del gen, así como la localización y tamaño de la expansión CTG, la cual se inserta en la región 3' UTR de *DMPK*, pero también afecta a la región promotora de *SIX5*. En función del tamaño de la expansión se distinguen 4 formas de la enfermedad: premutación, leve, clásica y congénita. Modificado de Turner *et al.* 2014.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que la gravedad de la enfermedad y la edad de debut se asocian con el tamaño de la expansión (Aldenbratt *et al.*, 2017; De Antonio *et al.*, 2016; Landfeldt *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2018; Tsilfidis *et al.*, 1992), lo que se traduce en que a una mayor longitud del triplete los pacientes presenten una sintomatología precoz y más grave (Cumming *et al.*, 2019; De Antonio *et al.*, 2016; Hunter *et al.*, 1992).

## INTRODUCCIÓN

Por otra parte, se ha visto que el sexo del progenitor que transmite la expansión del microsatélite influye en la magnitud de la expansión intergeneracional y también en la probabilidad de que se produzca una contracción.

En el caso de individuos con premutación –es decir con un tamaño de repeticiones CTG de hasta 100 repeticiones–, se ha observado que las expansiones ocurren en un 92% si la han heredado por vía paterna y en un 44% si la han heredado por vía materna. Además, el aumento relativo de la expansión es mayor cuando se hereda por vía paterna, (Brunner *et al.*, 1993; Martorell *et al.*, 2001; Pratte *et al.*, 2015). En cambio, en el caso de pacientes con más de 100 repeticiones es más probable que el alelo se expanda si se hereda por vía materna. Las mayores expansiones intergeneracionales se dan cuando el alelo transmitido viene de la madre, lo que se conoce como impronta genómica (Tomé and Gourdon, 2020; Lavedan *et al.*, 1993; Salehi *et al.*, 2007). Sin embargo, también hay casos descritos en los que en vez de expansiones se producen contracciones en la longitud del triplete (3-10%, según la vía de herencia materna o paterna). Estos fenómenos son menos frecuentes que las expansiones y se dan preferentemente cuando el alelo patogénico es heredado por vía paterna (Ashizawa *et al.*, 1994).

Más recientemente se han identificado variantes en la secuencia del alelo expandido. Se ha observado que una proporción escasa de pacientes (3-10%) tiene interrumpido el triplete CTG por secuencias CCG, CTC y/o GGC. Estas interrupciones se han asociado a contracciones en la longitud del triplete. Además, los pacientes con DM1 que presentan estas interrupciones tienen rasgos clínicos más leves o manifestaciones clínicas atípicas de la enfermedad, lo que lleva a pensar que la presencia de estas interrupciones podría estar explicando por un lado el fenómeno de contracción, pero también los casos en los que la longitud del triplete no correlaciona con las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Cumming *et al.*, 2018; Pešović *et al.*, 2017; Santoro *et al.*, 2017; Tome *et al.*, 2018).



Finalmente, se ha descrito que un mismo paciente puede tener un número diferente de repeticiones en diferentes tejidos, lo que se conoce como mosaicismo somático (Ashizawa *et al.*, 1993; Lavedan *et al.*, 1993), y que las repeticiones pueden aumentar con el tiempo en un mismo paciente debido a la inestabilidad del triplete (Martorell *et al.*, 1998).

#### **1.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

La DM1 es una enfermedad multisistémica de expresión variable en su presentación clínica y gravedad. Es una enfermedad neuromuscular que se caracteriza principalmente por la presencia de miotonía además de atrofia y debilidad muscular, pero también por la afectación de prácticamente todos los órganos en el cuerpo (**Tabla 12** y **Figura 12**), lo que conlleva a una pérdida importante en la calidad de vida de estos pacientes (Heatwole *et al.*, 2012; Laberge *et al.*, 2009).

Las principales características clínicas han sido agrupadas en afectación del sistema muscular, del sistema cardíaco, del sistema respiratorio, del sistema nervioso central y, finalmente, del sistema endocrino, además de las afectaciones provocadas en otros órganos.

##### **a) Afectación del sistema muscular**

En la DM1, a diferencia de otras distrofias musculares, la debilidad muscular comienza afectando primeramente a la musculatura distal. Dicha debilidad muscular se acompaña de atrofia y de una degeneración muscular progresiva que se puede evaluar mediante la escala MIRS (del inglés, "*Muscular Impairment Rating Scale*", ver **Anexo 4**) (Mathieu *et al.*, 2001).

## INTRODUCCIÓN

Además de la debilidad muscular, la DM1 se caracteriza por la presencia de miotonía, definida como la relajación lenta de los músculos después de la contracción voluntaria o provocada. Esta miotonía es espontánea tras la contracción y se puede provocar por percusión en la lengua (presencia de rodete miotónico que es una contracción transversal) y en la eminencia tenar que es un conjunto de músculos presentes en la mano.

La debilidad se caracteriza por la afectación de la musculatura facial y temporal y de los músculos extensores y flexores del cuello, siendo una de las características más tempranas y constantes de la enfermedad. La ptosis es un descenso permanente del párpado superior que en estos pacientes es generalmente simétrica, siendo uno de los rasgos faciales más llamativos. Por otra parte, la parálisis de las cuerdas vocales es un síntoma de aparición tardía y rara vez es completa. La alta frecuencia de la debilidad facial, maxilar, palatal y de la lengua, junto con la miotonía, provoca problemas en el habla. A todo ello se añade la debilidad en extremidades, de predominio distal, que se puede hacer proximal a lo largo del curso evolutivo de la enfermedad.

Desde el punto de vista histológico, los pacientes con DM1 muestran una atrofia muscular selectiva de las fibras musculares de tipo 1 (Thornton, 2014). También es frecuente la presencia de núcleos en posición central en fibras musculares individuales, un aumento de su diámetro, la presencia de fibras ramificadas e inmaduras y de tejido adiposo (Vihola *et al.*, 2010).

Desde un punto de vista molecular, la miotonía se ha asociado con un *splicing* incorrecto del mensajero del canal de cloro CLCN1, debido a una función anormal tanto de MBNL1 como de CUGBP1 (Cardani *et al.*, 2013), y la debilidad muscular se ha asociado a un *splicing* anormal tanto de *BIN1* (isoforma Ex11-) (Fugier *et al.*, 2011), una proteína implicada en la organización y la biogénesis muscular pero también al canal de calcio *CACNA1S* (isoforma Ex29-) (Tang *et al.*,

2012). En concordancia con las observaciones en los pacientes con DM1, los modelos de ratón que mejor recapitulan la afectación muscular son los modelos donde se han inactivado diferentes miembros de proteínas *MBNL* (Kanadia *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2017), pero también los modelos de mosca donde se han insertado las repeticiones CTG, como es el caso del modelo 480i que presenta una degeneración muscular, además de una menor longevidad (García-López *et al.*, 2008).

## **b) Afectación del sistema cardíaco**

La afectación cardíaca es un hecho frecuente e importante en la DM1 y constituye la segunda causa de muerte (Ashizawa *et al.*, 2018; Groh *et al.*, 2008; Mathieu *et al.*, 1999; Rajdev and Groh, 2015). Se estima que entre el 75-80% de los pacientes presenta algún grado de afectación cardíaca, desde alteraciones leves como bloqueos de la conducción hasta arritmias ventriculares graves que pueden ocasionar muerte súbita (Finsterer *et al.*, 2012; Petri *et al.*, 2012). Se ha demostrado que la edad de inicio del daño cardíaco correlaciona inversamente con el tamaño de la expansión y el grado de debilidad muscular (Antonini *et al.*, 2000). También se ha determinado que la sustitución del tejido cardíaco por tejido fibroadiposo juega un papel importante en la afectación de este sistema (Pelargonio *et al.*, 2002).

Desde un punto de vista molecular, este fenotipo cardíaco se ha asociado con un *splicing* anormal del canal de sodio *SCN5A* (isoforma Ex6A+) (Freyermuth *et al.*, 2016), predominando la isoforma fetal de este gen. Los modelos en ratón que mejor recapitulan los defectos en el sistema cardíaco son aquellos en los que se ha eliminado genéticamente *DMPK* y en consecuencia su función (Reddy *et al.*, 1996) y aquellos en los que se han insertado 960 repeticiones CTG específicamente en cardiomiocitos (Orengo *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007).

**Tabla 12.** Principales síntomas de la Distrofia Miotónica 1. Tomado de Meola *et al.*, 2015.

<b>TEJIDO AFECTADO</b>	<b>SÍNTOMAS</b>	<b>REFERENCIA</b>
<b>Muscular</b>	Debilidad de la musculatura distal	Harper, 2002
	Pérdida de fibras musculares tipo 1	Vihola <i>et al.</i> , 2003
	Miotonía	Harper, 2002
	Ptosis facial	Jameson, 2018
	Fatiga	Kalkman <i>et al.</i> , 2005
	Insuficiencia respiratoria	Jameson, 2018
	Sarcopenia	Malatesta, 2012
<b>Cardíaco</b>	Defectos en la conducción cardíaca	Jameson, 2018
	Arritmias	Pelargonio <i>et al.</i> , 2002
	Fallo cardíaco	Harper, 2002
<b>Respiratorio</b>	Insuficiencia respiratoria	Jameson, 2018
	Infección respiratoria	Harper, 2002
<b>SNC y sistema cognitivo</b>	Trastornos cognitivos	Sistiaga <i>et al.</i> , 2010
	Trastornos de la personalidad	Bungener <i>et al.</i> , 1998
	Ansiedad y depresión	Antonini <i>et al.</i> , 2006
	Somnolencia diurna	Dauvilliers and Laberge, 2012
	Apnea del sueño	Pincherle <i>et al.</i> , 2012
	Leve atrofia cortical	Giorgio <i>et al.</i> , 2006
	Cambios en la materia blanca	Wozniak <i>et al.</i> , 2013
<b>Endocrino</b>	Hiperinsulinemia	Orngreen <i>et al.</i> , 2012
	Disfunción tiroidea	Orngreen <i>et al.</i> , 2012
	Diabetes mellitus	Orngreen <i>et al.</i> , 2012
	Atrofia testicular	Harper, 2002
	Alteraciones en la homeostasis del calcio	Santoro <i>et al.</i> , 2014
	Infertilidad	Matsumura <i>et al.</i> , 2009
<b>Digestivo</b>	Disfagia	Bellini <i>et al.</i> , 2006
	Estreñimiento o diarrea	Bellini <i>et al.</i> , 2006
	Cálculos biliares	Cardani <i>et al.</i> , 2008
	Transaminasas elevadas	Heatwole <i>et al.</i> , 2006
	Esteatosis no alcohólica	Achiron <i>et al.</i> , 1998
	Elevación de enzimas hepáticas	Achiron <i>et al.</i> , 1998
<b>Ocular</b>	Cataratas iridiscentes	Jameson, 2018
<b>Piel</b>	Pilomatricomas	Zampetti <i>et al.</i> , 2015
<b>Todos</b>	Mayor riesgo oncogénico	Empananza <i>et al.</i> , 2018

**c) Afectación del sistema respiratorio**

La afectación respiratoria en la DM1 es frecuente y constituye la primera causa de muerte prematura en estos pacientes (Ashizawa *et al.*, 2018; Hawkins *et al.*, 2019; Mathieu *et al.*, 1999). Es, junto con los déficits del SNC y la debilidad muscular, uno de los factores que más influyen en el deterioro de la calidad de vida de los pacientes con DM1 (Thornton, 2014). En la mayoría de los casos esta afectación es de aparición progresiva y ocurre tardíamente, por lo que muchas veces se diagnostica con retraso.

La afección del sistema respiratorio puede venir acompañada de infecciones respiratorias recurrentes y un mayor riesgo de sufrir neumonía, derivado por las dificultades en la deglución.

En cuanto a las causas que estarían detrás de este fenotipo, por un lado, se atribuye a la afectación muscular y a la miotonía de la musculatura torácica, y, por otro, a la afectación del SNC que conduce a una alteración en el control de la respiración (Poussel *et al.*, 2015; Sansone *et al.*, 2015).

**d) Afectación del sistema nervioso central**

Además del músculo, del sistema cardíaco y del respiratorio, el SNC también se ve comprometido por la enfermedad, llegando a ser esta afectación uno de los mayores problemas para la vida diaria de los pacientes.

Las manifestaciones son sumamente variables e incluyen el déficit cognitivo (Labayru *et al.*, 2019), la apatía, la fatiga y las alteraciones del sueño. Las alteraciones en el sueño son una de las manifestaciones más frecuentes de la enfermedad, presentándose en hasta un tercio de los pacientes. Se caracteriza,

fundamentalmente, por una dificultad para mantenerse despiertos, sobre todo tras las comidas (Laberge *et al.*, 2004), teniendo un origen multifactorial.

Las formas más graves de la enfermedad se presentan con discapacidad intelectual, déficit de atención, trastornos del lenguaje y trastornos del espectro autista (Labayru *et al.*, 2018; Okkersen *et al.*, 2017; Sistiaga *et al.*, 2010), que correlacionan inversamente con la longitud del triplete en algunos aspectos, como es el caso del cociente intelectual (Sistiaga *et al.*, 2010; Winblad *et al.*, 2006).

Aunque los problemas psiquiátricos no suelen ser graves, la depresión mayor y las alteraciones de la personalidad confieren a estos pacientes unas características especiales. Es frecuente que muestren rasgos de trastorno esquizoide, ansiedad, histeria, compulsión, neurosis depresiva y falta de iniciativa (Gallais *et al.*, 2015; Seijas-Gomez *et al.*, 2015; Sistiaga *et al.*, 2010).

Desde un punto de vista biológico, se ha determinado que los pacientes con DM1 presentan una reducción en el volumen del cerebro, tanto de la sustancia blanca como de la gris, atrofia cortical y lesiones en la sustancia blanca. Se ha determinado que la reducción en el volumen de la sustancia blanca correlaciona con la longitud del triplete y con el grado de debilidad muscular (Labayru *et al.*, 2019).

En cuanto a los modelos de ratón que tendrían afectación del SNC, encontramos el modelo DMSXL (>1.000 CTG), con acumulación de Tau en el cerebro, de *foci* nucleares y defectos en el *splicing* (Gomes-Pereira *et al.*, 2011; Sez nec *et al.*, 2001); y el modelo donde se ha eliminado genéticamente *MBNL* que presenta apatía y falta de motivación (Matynia *et al.*, 2010).

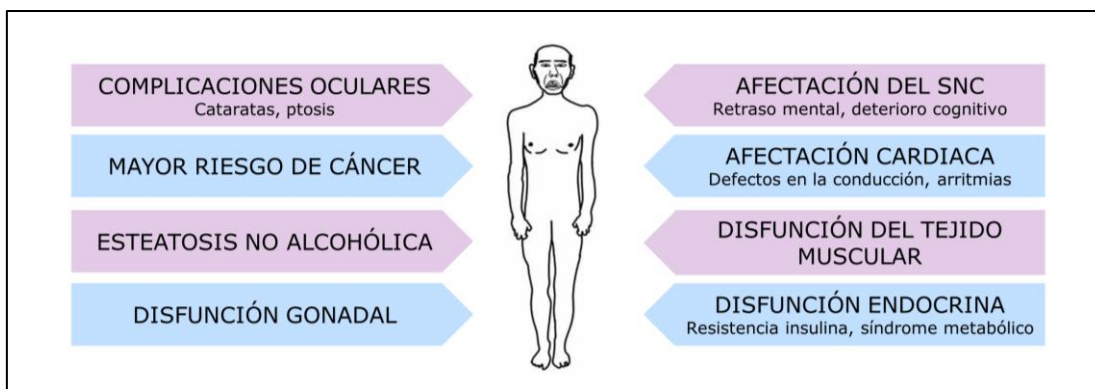
**e) Afectación endocrina**

Los pacientes con DM1 presentan una afectación endocrina que se manifiesta de forma variable. Las disfunciones más comunes son el hipogonadismo, las alteraciones tiroideas y las alteraciones en los niveles de insulina y glucosa.

El hipogonadismo es la manifestación del sistema endocrino más frecuente en la DM1, describiéndose una atrofia testicular en hasta un 80% de los varones. Este hecho, junto con la insuficiencia ovárica presente en las mujeres, condiciona una baja fertilidad y un aumento en las pérdidas gestacionales (Johnson *et al.*, 2015; Rudnik-Schoneborn and Zerres, 2004).

En cuanto al metabolismo de la insulina, generalmente se describe una resistencia a la acción de esta hormona por una menor sensibilidad a la misma a nivel muscular, que puede manifestarse como hiperinsulinismo o como una diabetes mellitus tipo 2. Desde el punto de vista molecular, la resistencia a la insulina se ha asociado con una mayor presencia de la variante de *splicing* IR-A (isoforma embrionaria) del receptor de la insulina INSR (Renna *et al.*, 2019; Santoro *et al.*, 2013). El modelo animal que desarrolla una afección endocrina con una hiperglicemia e intolerancia a la glucosa es el modelo DMSXL (>1.000 CTG) (Huguet *et al.*, 2012).

Con menor frecuencia encontramos alteraciones en el eje corticotropo, dislipemias y alteraciones electrolíticas. Estas alteraciones no son menos importantes, ya que una elevación de triglicéridos predispone a un mayor riesgo de enfermedad vascular.



**Figura 12.** Enumeración de los síntomas clínicos más característicos de la DM1. Modificado de Mateos-Aierdi *et al.*, 2015.

### **f) Afectación de otros sistemas**

Por último, cabe destacar otros sistemas que también se encuentran alterados en grado variable en la DM1.

El sistema digestivo también se encuentra afectado en grado variable en la DM1, incluyendo alteraciones como la hipomotilidad del esófago y colon, la disfagia y la esteatosis hepática (Gourdon and Meola, 2017; Thornton, 2014).

El desarrollo de cataratas precoces, es decir, antes de los 55 años, es una de las características distintiva de los pacientes con DM1, presentándose en casi todos ellos. Las cataratas más comunes que desarrollan estos pacientes son muy específicas y reciben el nombre de cataratas en forma de árbol de navidad, clasificándose como cataratas posteriores subescapulares de apariencia iridiscente (Smith and Gutmann, 2016; Thornton, 2014). Adicionalmente, se ha observado en pacientes con DM1 que presentan un pelo fino y poca densidad de folículos pilosos, teniendo una alta incidencia de alopecia androgénica (Campanati *et al.*, 2015; Campione *et al.*, 2017).

Cabe destacar que los tejidos más afectados en la DM1 son los que presentan un mayor incremento en la expansión del trinucleótido, como son el



tejido muscular y el corazón (Ashizawa *et al.*, 1993). Además, con el paso del tiempo, esta expansión puede aumentar en un mismo individuo. Se ha determinado en muestras de sangre de pacientes con DM1, que a partir de 200 repeticiones CTG la expansión aumenta cada año. En cambio, esto no sucede en expansiones con menores a 200 repeticiones CTG (Martorell *et al.*, 1995; Martorell *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 1995). Lo mismo ocurre en algunos modelos animales de ratón (Fortune *et al.*, 2000). Por otra parte, también se ha descrito *in vitro* que el mantenimiento de las células en cultivo, modelo que fenocopia las características celulares del envejecimiento fisiológico, produce un aumento en el número de repeticiones CTG (Ueki *et al.*, 2017).

Con todo ello, la esperanza de vida de estos pacientes se encuentra reducida, siendo la principal causa de muerte las complicaciones respiratorias, el fallo cardíaco, la muerte súbita por arritmias y el desarrollo de neoplasias (Ashizawa *et al.*, 2018; Gutiérrez Gutiérrez *et al.*, 2019; Turner and Hilton-Jones, 2014).

## 1.5. SUBTIPOS CLÍNICOS DE DM1

Recientemente la DM1 ha sido clasificada en 4 subtipos clínicos en función de la edad de inicio de los síntomas, la severidad y rangos de expansión del trinucleótido, aunque estos se solapan ampliamente entre los diferentes subtipos (**Figura I3 y Tabla I3**). Estos grupos son los siguientes: la forma congénita, las formas pediátricas, la forma adulta y la forma leve (de Die-Smulders *et al.*, 1998; IDMC-2, 2000; Lanni and Pearson, 2019; Mathieu *et al.*, 1999).

La **forma congénita** (Campbell *et al.*, 2013; Echenne and Bassez, 2013) (tamaño de la expansión en rangos generalmente > 1.000 CTG) es la forma más grave de DM1, pero también la menos frecuente. Se caracteriza por una severa

## INTRODUCCIÓN

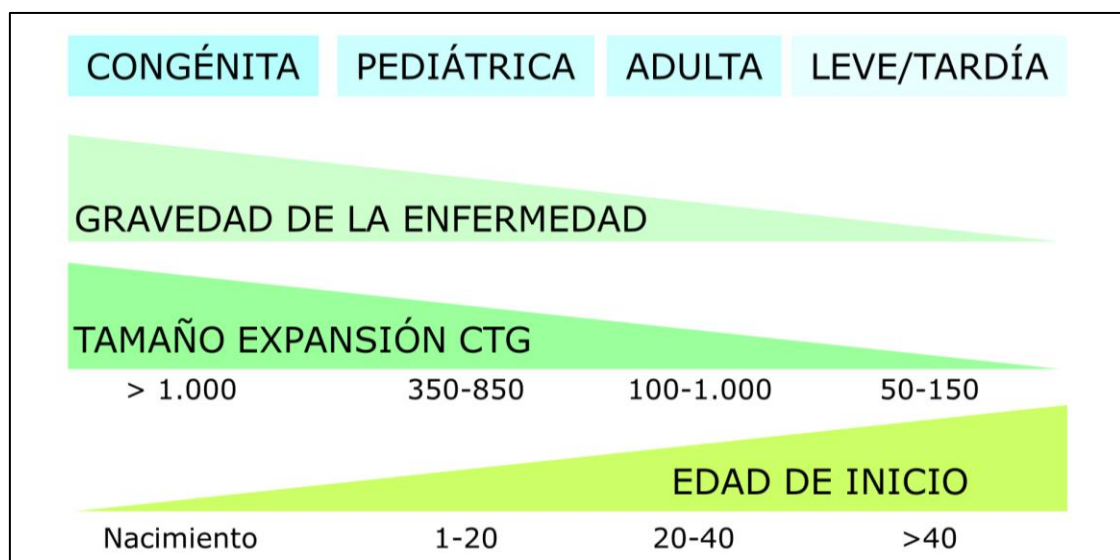
hipotonía al nacer, frecuentemente acompañada de insuficiencia respiratoria, discapacidad intelectual y de distrofia muscular progresiva. A pesar de ello, al sexto mes de vida se produce una ligera mejoría, aunque hay un retraso evidente en el desarrollo. Hacia los 3-4 años mejora la hipotonía y prácticamente todos los pacientes consiguen una marcha autónoma. Sin embargo, ya en la adolescencia aparece la miotonía y con el paso de los años surge la característica debilidad muscular en las extremidades, generalmente de predominio distal (a diferencia de la DM2, en la que es predominantemente proximal), así como el resto de manifestaciones clásicas de la DM1.

El papel de la metilación en el locus de *DMPK* se ha asociado con la vía de herencia predominantemente materna que se observa en la DM1 congénita, estando más frecuentemente metilada la zona en la región 5' de *DMPK* en las herencias por esta vía materna (Barbé *et al.*, 2017).

Las formas **pediátricas** (con rangos generalmente entre 350-850 CTG), tradicionalmente se habían separado en dos grupos diferenciados denominados formas infantiles y juveniles, pero actualmente se tiende al consenso de incluirlas dentro de un mismo grupo denominado pediátrico (De Antonio *et al.*, 2016). Estas formas en muchas ocasiones no están diagnosticadas debido a la ausencia clara de síntomas neurológicos. Son menos graves que la forma congénita, pero presentan grados variables de deterioro cognitivo, dificultades de aprendizaje, degeneración muscular y somnolencia (Ho *et al.*, 2019; Lagrue *et al.*, 2019).

En cuanto a la forma con inicio en la edad **adulta** o forma **clásica** (con un amplio margen de variabilidad en el rango de la expansión, de entre 100-1.000 CTG), se caracteriza por miotonía, desgaste muscular progresivo y atrofia, todo ello acompañado por el resto de manifestaciones extramusculares descritas anteriormente en el capítulo de "*Manifestaciones Clínicas*" (Gourdon and Meola, 2017; Thornton, 2014).

Finalmente encontramos la forma **leve** o forma **tardía** (que generalmente se manifiesta en rangos de entre 50-150 CTG), que presenta un fenotipo menos grave, con una menor afectación muscular con leve miotonía (a veces solo eléctrica), escasa o nula debilidad y la presencia de cataratas precoces (Arsenault *et al.*, 2006).



**Figura I3.** Correlación entre el subtipo clínico y la gravedad de la enfermedad, el tamaño de la expansión CTG y la edad de inicio. A la izquierda el mayor tamaño en la expansión correlaciona con una gravedad mayor y con una edad de inicio de la enfermedad temprana. En cambio, a la derecha, un tamaño de expansión de 50 repeticiones se relaciona con un fenotipo leve y de aparición tardía.

**Tabla 13.** Correlación del fenotipo con la longitud de la expansión CTG en DM1. Basado en Die-Smulders *et al.*, 1998, Mathieu *et al.*, 1999, International Myotonic Dystrophy Consortium 2000 y 2019, De Antonio 2016 y Lanni *et al.*, 2019.

Subtipo	Síntomas clínicos relevantes	CTG <sup>1,2</sup>	Edad de debut	Esperanza de vida	Herencia materna	Herencia paterna
<b>Pre-mutación</b>	Ninguno	37-50 (riesgo de expansión del alelo)	No procede	Normal		
<b>DM1 leve</b>	Cataratas, leve miotonía	50-150	> 40 años	Normal	30%	70%
<b>DM1 adulta</b>	Síntomas clásicos de la DM1	100-1.000	20-40 años	Reducida	30%	70%
<b>DM1 pediátrica</b>	Deterioro cognitivo, dificultades de aprendizaje, degeneración muscular y somnolencia Menos grave que la congénita pero más grave que la adulta	350-850	1 mes – 20 años	Reducida	45%	55%
<b>DM1 congénita</b>	Defectos en el desarrollo, hipotonía, insuficiencia respiratoria, defectos cardiacos, deterioro cognitivo severo, disfagia	> 1.000 <sup>3</sup>	< 1 mes	Mayor riesgo de muerte en la infancia <sup>4</sup>	91-87.5%	9-12.5%

1. Un mismo tamaño de la expansión CTG puede asociarse a diferentes subtipos clínicos de la enfermedad.
2. El tamaño de la expansión CTG en individuos sanos es de entre 4-37 repeticiones.
3. Se han observado casos con repeticiones menores a 1.000 CTG.
4. No incluye muertes neonatales.

## 1.6. DIAGNÓSTICO

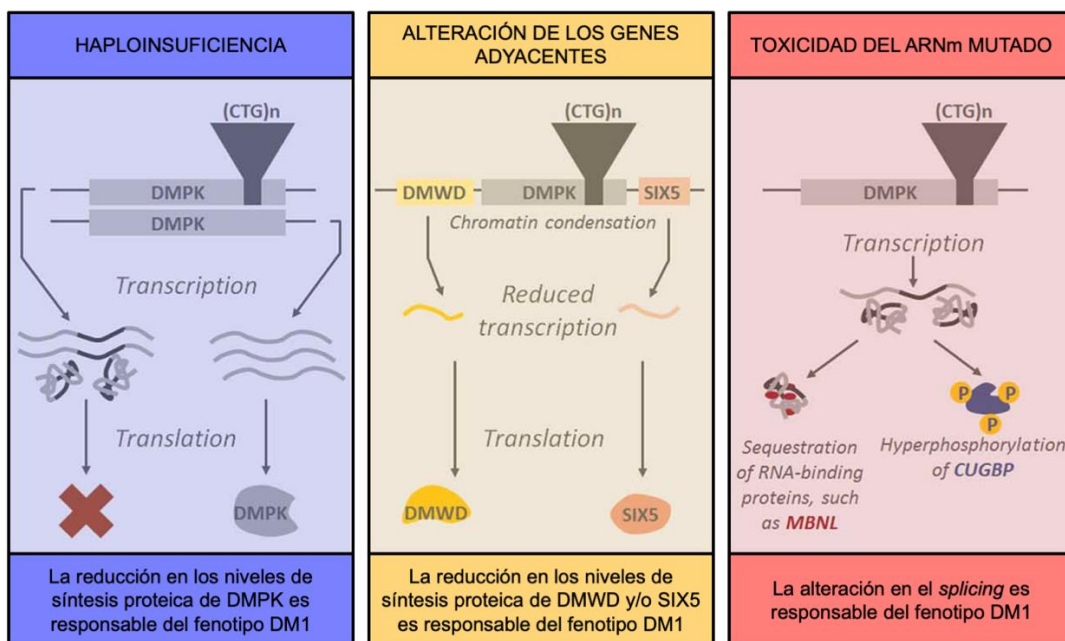
Hasta el descubrimiento de la expansión del microsatélite en 1992 (Brook *et al.*, 1992), el diagnóstico de la enfermedad era fundamentalmente clínico tras detectar en el examen clínico de los rasgos más característicos de la enfermedad como son la miotonía, la debilidad y la atrofia muscular. Ante esta sospecha clínica, se podían realizar pruebas complementarias como la electromiografía muscular y así poner de manifiesto las descargas miotónicas, que en los casos más leves pueden ser subclínicas. La determinación de los niveles de creatina quinasa, así como la biopsia muscular, usadas ampliamente en el diagnóstico de otras miopatías, son de escasa utilidad en la DM1 (Gutiérrez Gutiérrez *et al.*, 2019).

En la actualidad, ante la sospecha clínica de un paciente con DM1, se determina el tamaño de la expansión en una muestra de ADN obtenida de la sangre del paciente. Para ello se han desarrollado diferentes técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (IDMC-2, 2000; Prior, 2009). El primer barrido se realiza mediante PCR convencional para la determinación de alelos de hasta 150 repeticiones. La implementación de la *triple-PCR* (Warner *et al.*, 1996) permite detectar si el alelo está expandido, pero sin poder cuantificar el número exacto de repeticiones. Esta técnica arroja hasta un 9% de falsos positivos, debido a que no es capaz de detectar la presencia de interrupciones en la secuencia CTG (Kakourou *et al.*, 2010; Radvansky *et al.*, 2011). Sin embargo, modificaciones posteriores de dicha técnica (Radvansky *et al.*, 2011) son capaces de detectar dichas interrupciones. La cuantificación exacta del número de repeticiones es más precisa mediante la *small-pool* PCR (Dandelot and Gourdon, 2018) seguida de *Southern-Blot* (Gutiérrez Gutiérrez *et al.*, 2019; IDMC-2, 2000). No obstante, ante la dificultad que entraña la determinación exacta del número de repeticiones y la variedad de técnicas disponibles con resultados no homogéneos entre ellas (Ballester-López *et al.*, 2020), es habitual que en la práctica clínica asistencial sólo

se determina si uno de los alelos está expandido, sin abordar la medición del número exacto de repeticiones.

### 1.7. MECANISMOS MOLECULARES DE LA ENFERMEDAD

A día de hoy se postulan tres mecanismos moleculares diferentes y no excluyentes, que estarían detrás de la patogénesis de la enfermedad (**Figura I4**): a) la haploinsuficiencia de *DMPK*, b) el papel de la metilación y la alteración en la expresión de los genes adyacentes *SIX5* y *DMWD*; y c) el efecto tóxico que produce la acumulación del ARN mutado.



**Figura I4.** Distintos mecanismos moleculares que contribuyen a la patología de la DM1. 1) La haploinsuficiencia de *DMPK*, 2) la alteración en la expresión de los genes adyacentes y el papel de la metilación y 3) la toxicidad del ARNm mutado que va a provocar el secuestro de *MBNL* y la sobreexpresión de *CUGBP*. Modificada de Mateos-Aierdi *et al.*, 2015

### a) Haploinsuficiencia de *DMPK*

La haploinsuficiencia de *DMPK* se basa en el efecto deletéreo de poseer una única copia funcional del gen, disminuyendo la producción de proteína funcional.

*DMPK* es una quinasa del tipo serina/treonina (Manning *et al.*, 2002) con una alta homología en su dominio quinasa con la quinasa MRCK (del inglés "*myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase*") (Leung *et al.*, 1998), cuya función es la organización del citoesqueleto y a la quinasa ROCK1 de la familia de quinasas de tipo Rho (Wansink *et al.*, 2003), cuya función es la formación de las adhesiones focales y las fibras de estrés. *DMPK* pertenece a la familia de quinasas AGC, como es el caso de NDR1, cuya función está implicada en la regulación del ciclo celular y la apoptosis, o de AKT1, cuya función está relacionada con la proliferación celular AKT (Wansink *et al.*, 2003)

En relación a su función, en el músculo esquelético *DMPK* regula la miogénesis y su ausencia provoca atrofia muscular, miopatía, alteraciones en la homeostasis del calcio, defectos cardíacos y una disminución en la sensibilidad por la insulina en modelos murinos (Berul *et al.*, 1999; Jansen *et al.*, 1996; Llagostera *et al.*, 2007; Reddy *et al.*, 1996). Recientemente, se ha observado que la expresión de *DMPK* se activa en respuesta a un daño en el ADN a través de p53 (Itoh *et al.*, 2019).

Se han identificado 7 isoformas de *DMPK* (*DMPK* A-G) producidas mediante tres combinaciones diferentes en su *splicing* alternativo, definido por el tipo celular y su localización subcelular, preferentemente en el citoplasma (Groenen *et al.*, 2000). Todas las isoformas comparten un dominio N-terminal, un dominio quinasa y una región con una cola en forma de espiral. Las diferencias entre las diferentes isoformas difieren fundamentalmente en la presencia o ausencia de un motivo VSGG y de la naturaleza de su dominio C-terminal. La última isoforma identificada, la *DMPK*-G carece del dominio donde se introduce la expansión CTG por lo que, a

## INTRODUCCIÓN

diferencia del resto de isoformas, no queda retenida en el núcleo (Wansink *et al.*, 2003).

En cuanto a su patrón de expresión tiene una preferencia por el tejido muscular esquelético y por las fibras musculares de tipo 1, las más afectadas en DM1, donde co-localiza con el transportador de calcio SERCA2a. Dentro del músculo también se ha visto expresión en el retículo sarcoplásmico y en las uniones neuromusculares (revisado por Ueda *et al.*, 2000). Por otra parte, también se ha demostrado que se localiza en la membrana nuclear donde interacciona con la proteína lámina A/C. A su vez, también se ha observado expresión de DMPK en el músculo cardíaco y en el SNC.

En relación a las dianas de DMPK, se ha determinado una preferencia por los sustratos con el siguiente dominio, "RXXS/TL/VR", muy similar al dominio de PKC o CaMK II (Wansink *et al.*, 2003). Se ha observado que DMPK modula la actividad de los canales de sodio en el músculo esquelético (Mounsey *et al.*, 1995) y que sus sustratos son el receptor de dihidropiridina, CUGBP (Roberts *et al.*, 1997), DMPA, MKBP, PLM (Mounsey *et al.*, 2000) y la miosina fosfatasa. Se ha determinado que DMPK fosforila a la miosina fosfatasa en su región C-terminal y con ello inhibe su función fosfatasa (Muranyi *et al.*, 2001). La inhibición de la miosina fosfatasa provoca un aumento en la fosforilación de la miosina de cadena ligera que provoca una sensibilización por el  $\text{Ca}^{2+}$  en el músculo liso y cambios en la estructura del citoesqueleto en células no musculares (Kaibuchi *et al.*, 1999; Muranyi *et al.*, 2001).

De acuerdo a esta teoría, en la DM1 los transcritos de *DMPK* que contienen las repeticiones expandidas quedan retenidos en el núcleo, bloqueando su transporte al citoplasma donde deberían traducirse para dar lugar a la proteína funcional. La acumulación de estos transcritos mutados en los *foci* nucleares es una



característica esencial de la enfermedad (Miller *et al.*, 2000; Sznajder and Swanson, 2019).

Este mecanismo postula que la expresión reducida de *DMPK* es la causante del desarrollo de la enfermedad, lo que correlaciona con niveles reducidos de *DMPK* en pacientes con DM1, que a su vez correlaciona inversamente con el tamaño de la expansión del microsatélite (Fu *et al.*, 1993).

### **b) Papel de la metilación y la alteración en la expresión en los genes adyacentes**

El segundo de los mecanismos propuestos se basa en la alteración de los dos genes que flanquean a *DMPK*: *SIX5* y *DMWD*.

*SIX5* (del inglés, "*SIX homeobox 5*") codifica un factor de transcripción de la familia *SIX* y se localiza en la región 3' inmediatamente posterior a *DMPK* (**Figura I1**). *SIX5* se expresa durante el desarrollo embrionario y tiene un papel preferente en la córnea, el epitelio de la lente y los fotorreceptores de la retina (Sato *et al.*, 2002). También se ha descrito que tiene un papel en la espermatogénesis (Sarkar *et al.*, 2004). La expansión CTG va a afectar a su secuencia promotora, provocando un cambio en la metilación del *locus* y con ello una reducción en su expresión (Boucher *et al.*, 1995).

*DMWD* (del inglés, "*Myotonic-containing WD repeat motif*") es un gen que se localiza en la región 5' inmediatamente anterior a *DMPK* (**Figura I1**) (Jansen *et al.*, 1995). Al contrario que *SIX5*, se ha observado que se expresa en casi todos los tejidos adultos (Westerlaken *et al.*, 2003).

Al igual que *DMPK*, se ha demostrado que existe una reducción de *SIX5* que correlaciona inversamente con el tamaño de la expansión (Korade-Mirnic *et al.*, 1999). Sin embargo, se desconoce si esta correlación también se da con *DMWD*.

Recientemente, se ha descrito un cambio importante en los niveles de metilación en las regiones flanqueantes a las repeticiones CTG. Se ha determinado que la región anterior a DMPK presenta unos niveles superiores de metilación, mientras que las regiones donde se introduce el triplete y la región posterior a DMPK no están metiladas (Ghorbani *et al.*, 2013; López Castel *et al.*, 2011), proponiéndose este patrón de metilación aberrante como un marcador diagnóstico de la enfermedad (Barbé *et al.*, 2017).

Todo ello hace que se produzcan cambios importantes en la estructura de la cromatina, lo que induce una condensación del ADN en esta región (Otten and Tapscott, 1995) y con ello la reducción de la expresión tanto de *SIX5* (Klesert *et al.*, 1997; Thornton *et al.*, 1997; Yanovsky-Dagan *et al.*, 2015) como de *DMWD* (Alwazzan *et al.*, 1999; Frisch *et al.*, 2001; Thornton *et al.*, 1997).

### **c) La toxicidad del ARN mutado**

El tercer mecanismo propone la toxicidad del ARN portador de las repeticiones expandidas como el principal factor patogénico de la enfermedad. Este ARN se pliega sobre sí mismo a nivel de las repeticiones, formando una horquilla de doble cadena (Michalowski *et al.*, 1999) que interfiere con su propio procesamiento y con el de otros ARNs, lo que se conoce como ganancia de función tóxica de ARN. Este ARN tóxico interfiere con proteínas que participan en la regulación del *splicing* alternativo de otros muchos transcritos, entre los que destacan la familia de *MBNL* (Miller *et al.*, 2000) y la familia de *CUGBP/CELF* (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007).

El resultado de esta acumulación de ARN tóxico va a provocar una inmovilización de *MBNL* en agregados nucleares denominados *foci*, que se visualizan usando la microscopia de fluorescencia. Esto es debido a la alta afinidad de *MBNL* por las expansiones CTG, lo que finalmente va a provocar una pérdida de

su función (Fardaei *et al.*, 2002; Pettersson *et al.*, 2015; Wheeler *et al.*, 2007). Por otro lado, se va a producir una unión de *CUGBP1/CELF1* a los agregados CTG que va a provocar su acumulación debido a una hiperfosforilación por parte de la proteína quinasa C que induce su estabilización (Cardani *et al.*, 2013; Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007). Además de MBNL y CUGBP1 se ha demostrado que otras proteínas de unión al ARN se acumulan de manera tóxica en los *foci* CTG, como son las proteínas hnRNP F, hnRNP H, DDX5, DDX56, DDX517 y Staufen (Apponi *et al.*, 2011; Bondy-Chorney *et al.*, 2016; Crawford Parks *et al.*, 2020; Pettersson *et al.*, 2015; Ravel-Chapuis *et al.*, 2012).

Todas estas alteraciones van a provocar disfunciones en los procesos de proteostasis y ribostasis en la célula con una inhibición de la familia de MBNL, un cambio en su localización subcelular y un incremento en la distribución de la familia de CUGBP/CELF. El resultado final de ello es una alteración de todo el transcriptoma de la célula en relación a la expresión patogénica de variantes de *splicing* neonatales en tejidos adultos de pacientes con DM (Bland *et al.*, 2010; Hino *et al.*, 2007; Sicot *et al.*, 2011), además de una poliadenilación alternativa (Batra *et al.*, 2014; Batra *et al.*, 2015) y un transporte de transcritos entre el núcleo y citoplasma alterado (Andre *et al.*, 2018). Este mecanismo explica que las enfermedades DM1 y DM2, causadas por la expansión de repeticiones similares en regiones no codificantes de genes con diferente localización, presenten una sintomatología común.

En la DM1 se han encontrado variantes en el *splicing* de multitud de genes (Ravel-Chapuis *et al.*, 2018), pero hay una serie de variantes que se han asociado a aspectos clínicos de la enfermedad, como son las variantes del receptor de insulina asociadas a la resistencia a la insulina; del canal de cloro, responsables principalmente de la miotonía (Osborne *et al.*, 2009) y de los canales tipo SERCA (Kimura *et al.*, 2005), asociadas a la alteración de la homeostasis del calcio, entre

otras muchas variantes. En consecuencia, la DM1 ha llegado a considerarse como una *spliceopatía*.

Por otro lado, se ha descrito que estas repeticiones pueden producir péptidos tóxicos mediante una traducción del ARN que no se inicia mediante la secuencia consenso ATG, lo que se conoce como traducción de tipo RAN (del inglés, "*Repeat-Associated Non-ATG translation*"). La producción de los transcritos antisentido de *DMPK* genera la acumulación de péptidos con cadenas largas de polileucina, policisteína y polialanina que provocan una toxicidad celular (Zu *et al.*, 2011). Sin embargo, el mecanismo exacto de la traducción tipo RAN, así como su implicación en la patogénesis de la DM1 está por esclarecer.

En definitiva, se han postulado diferentes mecanismos patogénicos que explican la presencia de determinadas manifestaciones que caracterizan la DM1. La presencia de estos procesos y, probablemente, algún otro aún desconocido, lleva a pensar que el complejo fenotipo de la enfermedad es el resultado de la suma de todos ellos (Andre *et al.*, 2018; Kearse and Todd, 2014; Konieczny *et al.*, 2014; Meola and Cardani, 2015; Meola *et al.*, 2013; Rohilla and Gagnon, 2017).

### **1.8. MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA DM1**

La contribución que tiene cada mecanismo propuesto en la patogénesis de la DM1 se ha estudiado mediante la generación de diferentes modelos animales. Por analogía a los mecanismos moleculares propuestos para la enfermedad, podemos clasificar los modelos animales en 1) modelos *knock-out* (KO) para *DMPK*; 2) modelos KO para *SIX5* y *DMWD*; 3) modelos KO para *MBNL* y modelos de sobreexpresión de *CUGBP* y, por último, 4) modelos en los que se han insertado las repeticiones CTG.

## 1) Modelos KO para DMPK

Los primeros modelos que se desarrollaron fueron los ratones donde se eliminó DMPK (modelos *Dmpk*<sup>+/-</sup> y *Dmpk*<sup>-/-</sup>) de manera multisistémica. Estos modelos desarrollan una miopatía tardía, defectos en la conducción cardíaca e intolerancia a la glucosa, pero no reproduce ni el fenotipo muscular ni el multisistémico de la enfermedad (Berul *et al.*, 1999; Jansen *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1996). Estos resultados, junto con el hecho de que los síntomas de la DM2 sean tan similares a los de la DM1 a pesar de no implicar a DMPK, sugieren que una reducción en la función de esta proteína sería la causa, al menos, de parte de la sintomatología de los pacientes con DM1.

## 2) Modelos KO para SIX5 y DMWD

Posteriormente se desarrollaron modelos en los que se eliminó SIX5 en todo el organismo (modelos *Six5*<sup>+/-</sup> y *Six5*<sup>-/-</sup>). La eliminación de una sola copia (Sarkar *et al.*, 2000) de este gen ya es suficiente para el desarrollo de cataratas. No obstante, el tipo de cataratas que desarrolla este modelo no son del tipo del que desarrollan los pacientes con DM1. Por otra parte, la eliminación de ambas copias de SIX5, además de provocar el desarrollo de cataratas (Sarkar *et al.*, 2000), provoca una menor fertilidad en machos (Sarkar *et al.*, 2004) y una alteración de la función cardíaca (Wakimoto *et al.*, 2002). Sin embargo, ninguno de los modelos presenta el fenotipo multisistémico característico de la DM1.

Recientemente se ha desarrollado un modelo heterocigoto para DMWD y un modelo doble transgénico para DMWD y SIX5 (Yin *et al.*, 2020), que desarrollan una leve pérdida muscular, señalando que la reducción a la mitad en la dosis génica de SIX5 y/o DMWD no es suficiente para recapitular los rasgos fenotípicos principales de la enfermedad, como son la debilidad muscular y la miotonía.

### 3) Modelos KO para MBNL y modelos de sobreexpresión de CUGBP

El impacto de las proteínas MBNL y CUGBP/CELF en la patogénesis de la DM1 se ha estudiado mediante otro grupo importante de modelos de ratón, como son los modelos *knock-out* para *MBNL1*, *MBNL2* y *MBNL3*, y los modelos de sobreexpresión de *CUGBP/CELF*. Gracias a ellos se han podido identificar las variantes de *splicing* dependientes de la familia de *MBNL* y de la familia de *CUGBP*.

Los modelos con inactivación de *MBNL1* (*Mbnl1*<sup>Δ3/Δ3</sup> y *Mbnl1*<sup>-/-</sup>) de manera ubicua desarrollan una miotonía asociada al defecto en el *splicing* de *CLCN1*, cataratas, falta de motivación y apatía. Sin embargo, no desarrollan debilidad muscular (Kanadie *et al.*, 2003 and Matynia *et al.*, 2010). En cambio, en los modelos con inactivación de *MBNL2* (*Mbnl2*<sup>Δ2/Δ2</sup>, *Mbnl2*<sup>GT4/GT4</sup> y *Mbnl2*<sup>GT2/GT2</sup>) se han descrito resultados contradictorios. El modelo *Mbnl2*<sup>GT2/GT2</sup> desarrolla una patología muscular leve con miotonía y defectos en el *splicing*. Sin embargo, los modelos *Mbnl2*<sup>Δ2/Δ2</sup>, *Mbnl2*<sup>GT4/GT4</sup> no presentan alteraciones musculares reseñables, pero sí un marcado deterioro del SNC en el modelo *Mbnl2*<sup>Δ2/Δ2</sup> (Charizanis *et al.*, 2012; Hao *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2006). Por último, el modelo KO para *MBNL3* muestra una reducción en la fuerza muscular y una alteración de la regeneración muscular dependiente de la edad (Poulos *et al.*, 2013), además de intolerancia a la glucosa, defectos cardíacos y la presencia de cataratas (Choi *et al.*, 2016). No obstante, ninguno de estos modelos parece recapitular todo el espectro de la enfermedad y se han observado fenómenos compensatorios entre diferentes miembros de la familia MBNL cuando uno de ellos se encuentra inactivado. Por ello, se han desarrollado los modelos doble KO *MBNL1* y 2 y triple KO *MBNL1*, 2 y 3 que recapitulan en mayor medida el fenotipo de la enfermedad (Choi *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2017). Este último modelo tiene una alta tasa de mortalidad neonatal, con retraso en el crecimiento y debilidad muscular con profundos cambios en el *splicing*.

Por su parte, los modelos de sobreexpresión de *CUGBP1/CELF1* reproduce el desgaste muscular y la miopatía cuando se introduce en el músculo esquelético (Ward *et al.*, 2010) y defectos en la conducción cardíaca y cardiomiopatía cuando se introduce en el tejido cardíaco (Koshelev *et al.*, 2010).

Recientemente se ha desarrollado un modelo de ratón en el que se ha eliminado un alelo de *DMPK*, *SIX5*, *MBNL1* y *DMWD*, que presenta una fuerte mortalidad por complicaciones respiratorias y se asocia a la forma congénita de la DM1. Sin embargo, muchos de los defectos de *splicing* presentes en la enfermedad no son recapitulados en este modelo (Yin *et al.*, 2020). Además, las afectaciones, en conjunto, no son tan graves como cabría esperar en un modelo con 4 de las alteraciones que se dan en la DM1.

#### **4) Modelos con expansiones CTG**

Son los modelos en los que se ha insertado el triplete expandido los que parecen recapitular en mayor medida los fenotipos musculares y multisistémicos de la enfermedad (Braz *et al.*, 2018; Gomes-Pereira *et al.*, 2011).

El modelo de ratón en el que se insertaron 250 repeticiones CTG bajo el control del promotor de la actina muscular humana (modelo HSA<sup>LR</sup>) presenta una significativa degeneración muscular, miotonía, una alta mortalidad y profundas alteraciones en el *splicing* dependiente de *MBNL* (Mankodi *et al.*, 2000). Sin embargo, la ausencia de debilidad y de pérdida muscular representa una limitación adicional.

Por otro lado, se ha desarrollado otro modelo donde se han insertado 300 repeticiones CTG de manera ubicua y se ha visto que presenta miotonía y cambios histológicos y musculares asociados a una atrofia muscular. Estos síntomas no son tan graves como en la enfermedad humana y normalmente aparecen en los ratones

## INTRODUCCIÓN

transgénicos envejecidos (Panaite *et al.*, 2008; Seznec *et al.*, 2001; Vignaud *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha generado *de novo* una nueva línea transgénica por simple cruzamiento de la línea con 300 repeticiones, que ha dado lugar a una línea con más de 1.000 repeticiones CTG (modelo DMSXL), demostrando con ello la inestabilidad del triplete y su expansión intergeneracional (Gomes-Pereira *et al.*, 2007). Este ratón DMSXL presenta una alta tasa de mortalidad, retraso en el crecimiento e importante afectación muscular (Huguet *et al.*, 2012), además de fallo respiratorio (Panaite *et al.*, 2013) y cambios en el comportamiento y en la cognición, presentando un fenotipo multisistémico y siendo el que mejor recapitula los rasgos de la enfermedad hasta la fecha.

Al margen de los modelos murinos, cabe resaltar la existencia de los modelos en mosca que reproducen los cambios moleculares e histológicos de la enfermedad, como la acumulación de *foci* nucleares, las alteraciones en el *splicing*, la afectación del SNC y los problemas cardiacos, entre otros (Souidi *et al.*, 2018). Entre ellos, cabe destacar el modelo con inserción 480 repeticiones CTG interrumpidas, que presenta alteraciones en el *splicing*, pérdida de función de MBNL y acumulación de transcritos a nivel molecular, además de degeneración muscular y una menor supervivencia global (García-López *et al.*, 2008).



## 1.9. TRATAMIENTO ACTUAL Y APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS EN CURSO

En cuanto al tratamiento, en la actualidad no existe ninguno que retrase, detenga o revierta el curso propio de la enfermedad. Los tratamientos que se utilizan simplemente van dirigidos a paliar o tratar los síntomas, la mayor parte de ellos de forma tejido dependiente (Gutiérrez Gutiérrez *et al.*, 2019).

La *debilidad muscular* se puede trabajar mediante ejercicio físico regular para mantener la masa muscular. La *miotonía* se puede tratar con mexiletina, aunque con un control terapéutico estricto debido a que este compuesto bloquea los canales de sodio cardiacos. Las *mialgias* se pueden paliar con analgésicos o gabaérgicos y la *fatiga* con modafinilo. Las *cataratas* se pueden intervenir quirúrgicamente con un buen resultado funcional y los *problemas cardíacos* pueden prevenirse mediante la implantación de un marcapasos o de un desfibrilador automático. La *diabetes mellitus* se trata con fármacos sensibilizadores a la insulina como la metformina. Finalmente, los problemas de *deglución* se pueden mitigar mediante una dieta especial. También se pueden usar fármacos antiespasmódicos para tratar el dolor abdominal y los síntomas del colon irritable. En paralelo puede ofrecerse una terapia psicológica encaminada a mejorar los problemas *conductuales y psicológicos* y una terapia logopédica para tratar los problemas del *habla*.

En los últimos años se ha abordado la investigación en terapias frente a DM1 en 3 ejes principales: 1) estrategias encaminadas a la degradación de los transcritos de *DMPK* mutantes; 2) inhibición del secuestro de MBNL1 por el transcrito mutado y, finalmente, 3) estrategias basadas en reducir los niveles de CUGBP1/CELF1.

Varios grupos han centrado sus esfuerzos en el bloque del ARNm de *DMPK* como estrategia para reducir la expresión de las repeticiones tóxicas. En este sentido se han desarrollado varios tipos de oligonucleótidos antisentido (ASO, del

## INTRODUCCIÓN

inglés "*Anti-Sense Oligonucleotides*"), que se van a unir al ARNm y por lo tanto van a inactivar su acción. Los ASO son pequeñas moléculas de ADN monocatenario complementarias a determinadas secuencias específicas de un ARNm diana. Se ha demostrado que los ASO, administrados intramuscularmente al ratón HSA<sup>LR</sup> provocan una disminución del ARN tóxico en el músculo esquelético, la liberación de MBNL1 y una mejora en la arquitectura del músculo (Wheeler *et al.*, 2012). No obstante, tras el testado de los ASO en ensayos clínicos, se decidió abandonar su desarrollo, ya que los niveles de ASO encontrados en la biopsia muscular de los pacientes tratados, tras administración de forma subcutánea, no eran lo suficientemente altos (NCT02312011). Más recientemente, se ha anunciado el desarrollo de nuevos ASO más potentes para tratar la DM1 mejorando su distribución muscular (Ionis, 2017).

Por otra parte, cabe destacar las estrategias encaminadas a recuperar la actividad de MBNL1 a niveles no patológicos. Para ello, se han realizado cribados (Konieczny *et al.*, 2017; Rzuczek *et al.*, 2015) de miles de moléculas con el objetivo de identificar aquellas que inhiban la interacción MBNL1-CTG. Entre las moléculas identificadas cabe destacar el *Ligando 1* (Arambula *et al.*, 2009) y sus posteriores modificaciones (Jahromi *et al.*, 2013), que son capaces de liberar a MBNL1 de los *foci* celulares; y el *Ligando 3*, que mejora el fenotipo de DM1 en un modelo de *Drosophila* (Nguyen *et al.*, 2015). Sin embargo, la principal desventaja de este tipo de aproximaciones terapéuticas es que, además de inhibir la interacción de MBNL1 con la expansión CTG, también podrían inhibir otras interacciones de MBNL con otros transcritos (Warf *et al.*, 2009).

En relación a los compuestos encaminados a la modulación de CUGBP1/CELF1, podemos destacar los inhibidores de GS3K $\beta$  y los inhibidores de la proteína quinasa C (PKC). Se ha observado una activación de ambas rutas en pacientes con DM1, que conlleva una fosforilación aberrante de CUGBP1/CELF1. Con esta idea han surgido compuestos que inhiben dicha fosforilación como es el

caso del litio (Jones *et al.*, 2012), la quinolona 53 (Palomo *et al.*, 2017) o el tideglusib (Wang *et al.*, 2019). Este último ha llegado a ensayos clínicos (NCT03692312) con resultados positivos en varios aspectos como la somnolencia, la cognición, el autismo, la función muscular y la miotonía (AMO-Pharma, 2019). Por otra parte, se encuentra el compuesto Ro-31-8220, un inhibidor de PKC, que se encuentra en estudios preclínicos (Hambleton *et al.*, 2006).

En resumen, en los últimos años se han identificado gran cantidad de moléculas con un potencial terapéutico anti-DM1 (Konieczny *et al.*, 2017; Overby *et al.*, 2018; Thornton *et al.*, 2017). Sin embargo, ninguna de estas estrategias se ha implementado a día de hoy como tratamiento a nivel asistencial y es necesaria la búsqueda de nuevos compuestos.

## 2. DISTROFIA MIOTÓNICA TIPO 1 Y ENVEJECIMIENTO

### 2.1. El concepto de envejecimiento

A simple vista es sencillo distinguir un individuo joven de una persona mayor. Sin embargo, definir el proceso de envejecimiento resulta mucho más complejo de lo que pueda parecer en un primer momento. Existen numerosas definiciones, pero todas coinciden en una misma idea: "el envejecimiento comprende cambios que ocurren en nuestras células y tejidos a lo largo del tiempo, que propician la pérdida progresiva de la homeostasis del organismo y que conllevan una mayor vulnerabilidad a morir" (López-Otín *et al.*, 2013).

Por otra parte, se ha llegado al consenso de que el proceso de envejecimiento se caracteriza por ser prácticamente universal ocurriendo en todas las especies a lo largo de la escala evolutiva, con algunas notables excepciones; ha de ser intrínseco, teniendo su origen de manera endógena, pero también afectado por el entorno; ha de ser progresivo y, finalmente, ha de ser deletéreo, ya que tiene un carácter perjudicial para el individuo (Viña *et al.*, 2007).

El aumento en la esperanza de vida que se ha producido en las últimas décadas en los países desarrollados ha provocado un profundo cambio en la pirámide poblacional. Las proyecciones europeas para 2080 arrojan el dato de que casi un 30% de la población tendrá más de 65 años. Cabe señalar que el aumento en la esperanza de vida trae consigo el incremento en el desarrollo de enfermedades crónicas, siendo el envejecimiento el factor de riesgo más importante para el desarrollo de estas enfermedades (Dillin *et al.*, 2014; MacNee *et al.*, 2014). Hoy en día, casi dos tercios de las muertes están relacionadas con el envejecimiento, siendo éste el mayor factor de riesgo para morir (MacNee *et al.*, 2014).

Entre estas enfermedades asociadas al envejecimiento cabe destacar el declive progresivo que se da en la funcionalidad del sistema respiratorio (Angelidis *et al.*, 2019; Lowery *et al.*, 2013) y del sistema cardiovascular, que aumentan considerablemente con la edad, siendo la principal causa de muerte en personas de más de 65 años. A modo de ejemplo, los problemas coronarios y el fallo cardiaco ocurren en más de un 70% en personas con más de 65 años (Rosamond *et al.*, 2008). De la misma manera, la osteoporosis es una condición que se da con el envejecimiento (Papaioannou *et al.*, 2009), al igual que la pérdida de masa muscular (Cruz-Jentoft *et al.*, 2010), el desarrollo de tumores (Finkel *et al.*, 2007; Serrano and Blasco, 2007) y el aumento de las enfermedades neurodegenerativas (Hou *et al.*, 2019; Walker *et al.*, 2019).

A todo ello hay que añadir que todavía se encuentra sin resolver la pregunta de cuál es la esperanza de vida máxima de la especie humana. En 2016, en base a datos demográficos, se determinó que el ser humano posee una esperanza de vida teórica y fija de 115 años (Dong *et al.*, 2016). Sin embargo, otros estudios ponen de manifiesto que no hay un límite teórico para la esperanza de vida, llegando las tasas de mortalidad a una estabilidad a los 105 años, edad a partir de la cual la probabilidad de muerte sería del 50%, con lo que técnicamente no existiría un límite teórico para la longevidad (Barbi *et al.*, 2018).

## **2.2. Manifestaciones de envejecimiento en la DM1 a nivel sistémico**

Como se ha indicado anteriormente, la DM1 es una enfermedad multisistémica caracterizada por deficiencias en múltiples tejidos (**Tabla I2**), donde encontramos una pérdida de la masa muscular conocida como sarcopenia, problemas cardíacos, una pérdida de la función pulmonar y un deterioro del SNC, entre otras afectaciones, siendo todos ellos procesos que se dan durante el envejecimiento fisiológico de manera natural.

## INTRODUCCIÓN

Todas estas alteraciones funcionales en pacientes con DM1 sugieren un declive funcional acorde con un envejecimiento exacerbado. En concordancia, la esperanza de vida de estos pacientes se encuentra reducida (Gutiérrez Gutiérrez *et al.*, 2019), lo que ha llevado a proponerla como un modelo de envejecimiento prematuro (Mateos-Aierdi *et al.*, 2015), e incluso como un síndrome progeroide (Meinke *et al.*, 2018).

Hay otras enfermedades como los síndromes de Hutchinson-Gilford (Gonzalo *et al.*, 2017) o de Werner (Ghosh and Zhou, 2014) que también presentan síntomas de envejecimiento prematuro. Sin embargo, estas enfermedades son modelos extremos del envejecimiento (progeria) que no recapitulan todos los procesos afectos durante el envejecimiento fisiológico, como por ejemplo la afección del SNC o la presencia de neoplasias (Gonzalo *et al.*, 2017; Gordon *et al.*, 2014). En cambio, la DM1, al menos en su etapa adulta, recapitula en mayor medida y de manera mucho más fisiológica, aunque acelerada, los procesos moleculares y las alteraciones clínicas involucradas en el envejecimiento normal o fisiológico. Dentro de estos procesos en esa tesis nos vamos a centrar en los cambios subyacentes al incremento del riesgo oncogénico y en las alteraciones en la proliferación y senescencia celular, así como en el metabolismo mitocondrial.

En los últimos años se ha observado que los pacientes con DM1 tienen un mayor riesgo a desarrollar tumores, tanto benignos como malignos. El primer estudio que lo documentó fue en el año 1965, donde reportaban la presencia de un tumor benigno de la piel denominado pilomatricoma (Cantwell and Reed, 1965). En 1971, el profesor Peter Harper encontró la primera asociación entre la presencia de pilomatricomas y DM1 dentro de la misma familia (Harper, 1971). Posteriormente, la presencia de este tipo tumoral ha sido ampliamente documentada en pacientes con DM1, siendo una de sus afecciones características (Marcoval *et al.*, 2016; Zampetti *et al.*, 2015). De la misma manera, se ha determinado que los pacientes con DM1 tienen un riesgo 1.5 veces superior a desarrollar tumores benignos, siendo

los más frecuentes los endocrinos del tiroides, seguidos por los del sistema reproductor femenino y, finalmente, por los de la piel, donde destaca la presencia de pilomatricomas, que es casi exclusivo de pacientes con DM1 (Alsaggaf *et al.*, 2019b; Alsaggaf *et al.*, 2018; Chan *et al.*, 1999; Gadalla *et al.*, 2017).

**Tabla 14.** Tipos tumorales identificados con mayor riesgo en pacientes con DM1 según cada estudio.

Tipo Tumoral	SIR <sup>a</sup>	Significación estadística	Cohorte
Melanoma uveal	27.54	p<0.001	Rochester
Ojo	12.00	p=0.01	Nórdica
Otros femeninos	9.60	p=0.02	Nórdica
Endometrio	7.60	p=0.00001	Nórdica
Tiroides	7.10	p=0.01	Nórdica
	5.54	p=0.001	Rochester
Cerebro	5.30	p=0.0005	Nórdica
Ovario	5.20	p=0.0006	Nórdica
Páncreas	3.20	p=0.05	Nórdica
Colon	2.90	p=0.004	Nórdica

Tipo Tumoral	RR <sup>b</sup>	Significación estadística	Estudio
Timoma	100	Sí	Francia
Endometrio	21.7	Sí	Francia
Testículo	10.74	0.01	Utah
Ovario	9.3	Sí	Francia
Endometrio	6.98	0.03	Utah
Linfoma No-Hodgkins	4.25	0.03	Utah

En la tabla se enumeran los tipos tumorales detectados en cada estudio con significación estadística.

<sup>a</sup> SIR del inglés, "Standardized Incidence Ratio".

<sup>b</sup> Riesgo relativo.

Recientemente, mediante el estudio de dos grandes cohortes nórdicas que suman 1600 pacientes con DM, se ha observado una incidencia 2 veces superior a desarrollar tumores malignos en pacientes con DM respecto a la población general, siendo los tipos tumorales con mayor riesgo el cáncer ocular, seguido por el de endometrio, de tiroides, de cerebro, de ovario, de páncreas y de colon (Gadalla *et al.*, 2011). También se ha determinado que estos tumores se presentan más frecuentemente en el género femenino (Alsaggaf *et al.*, 2019b; Alsaggaf *et al.*,

2018; Chan *et al.*, 1999; Gadalla *et al.*, 2017). Estudios posteriores en cohortes adicionales han confirmado dicho aspecto en pacientes DM1 (**Tabla I4**).

El mecanismo por el cual los pacientes con DM1 tienen un mayor riesgo para desarrollar tumores tanto benignos como malignos se desconoce por completo. Se ha propuesto la ruta de  $\beta$ -catenina como posible causa (Chan *et al.*, 1999; Mueller *et al.*, 2009). Recientemente, se han descrito mutaciones en  $\beta$ -catenina y en ATM en tumores de pilomatricomas de pacientes con DM1 (Rübber *et al.*, 2020)

### **2.3. Fisiología molecular del envejecimiento en la DM1**

En 2013 se definieron las características moleculares distintivas responsables del envejecimiento fisiológico, los denominados "*Hallmarks of Aging*". Estas características se consideraron las responsables, en parte, del envejecimiento porque cumplían con tres características: se manifiestan durante el envejecimiento fisiológico, promueven un envejecimiento prematuro si se exacerban y, por último, ralentizan el envejecimiento si se bloquean (López-Otín *et al.*, 2013).

Los autores describieron 9 características distintivas responsables del envejecimiento, divididas en 3 grupos: primarias, antagonistas e integrativas. Entre las primarias se incluyen procesos tales como la inestabilidad genómica, el acortamiento telomérico, las alteraciones epigenéticas y la pérdida de la proteostasis. Todos estos procesos son considerados negativos para el organismo y son los iniciadores del proceso de envejecimiento. En cambio, las antagonistas, cuando tienen lugar de manera moderada y en momentos puntuales, son beneficiosos para el organismo, pero si ocurren a niveles exacerbados o se convierten en crónicos, son perjudiciales. En esta categoría encontramos la falta en la regulación de la sensibilidad nutricional, la senescencia celular y la disfunción mitocondrial. La última categoría, o las integrativas, son los procesos que afectan



directamente a la homeostasis y a la función del tejido, dando lugar a un fenotipo envejecido. En esta categoría encontramos al agotamiento de las células madre y la alteración en la comunicación intercelular (López-Otín *et al.*, 2013).

Distintos estudios han detectado alteraciones en estos procesos, en mayor o menor medida, en diferentes modelos de DM1 (**Figura 15**).

Entre los procesos primarios se ha observado que las células satélite, la población de célula madre muscular, tienen un mayor ratio de **acortamiento telomérico *in vitro*** (Bigot *et al.*, 2009; Thornell *et al.*, 2009), que se asocia con una diferenciación y maduración anormal.

Otro proceso primario alterado en DM1 es la **proteostasis**, que es fundamental para preservar un proteoma sano en la célula. En DM1 se ha observado una inducción exacerbada de la autofagia, que es un proceso de autodegradación de proteínas y orgánulos dañados, en los mioblastos que no logran diferenciarse (Beffy *et al.*, 2010), en neuronas derivadas de células madre embrionarias (Denis *et al.*, 2013) y en un modelo de *Drosophila melanogaster* contribuyendo a la atrofia muscular (Bargiela *et al.*, 2015). También, se ha hallado una acumulación de chaperonas, proteínas responsables del plegamiento de las proteínas recién sintetizadas, en el músculo esquelético de pacientes con DM1 (Suzuki *et al.*, 1998). Finalmente, se ha documentado una sobreactivación de la ruta ubiquitina-proteosoma, cuya función es la de marcar proteínas para ser degradadas en el proteasoma, tanto en músculo esquelético como cardíaco, en dos modelos animales murinos de DM1 (Huguet *et al.*, 2012; Vignaud *et al.*, 2010).

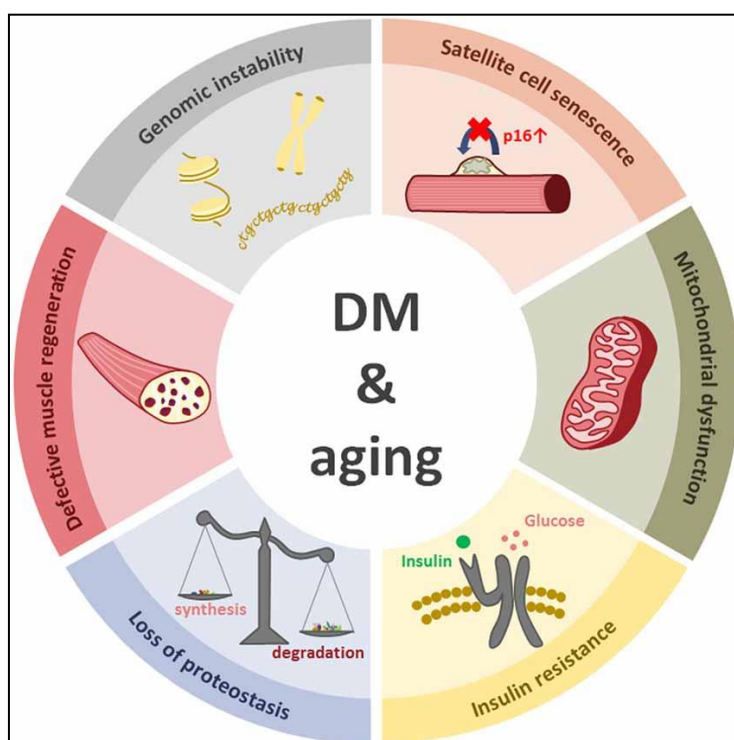
Por otra parte, y como se ha comentado anteriormente, se ha observado un cambio en el patrón de **metilación** en el locus de DMPK, proponiéndose incluso el patrón de metilación como marcador diagnóstico de la enfermedad (Barbé *et al.*, 2017).

Entre los procesos antagonistas alterados en la DM1 encontramos, en primer lugar, la **senescencia celular**. Éste es un proceso que se caracteriza por una parada proliferativa irreversible, pero en un estado metabólicamente activo. En concreto, se ha descrito que las células satélite de pacientes con DM1 requieren de un menor número de divisiones celulares para entrar en senescencia (Bigot *et al.*, 2009; Thornell *et al.*, 2009).

La **disfunción mitocondrial** es otro proceso antagonista alterado en DM1. Se ha visto que la isoforma A de DMPK co-localiza con la membrana mitocondrial externa, alterando su morfología (van Herpen *et al.*, 2005), y que el músculo de pacientes con DM1 posee una acumulación de mitocondrias (Ueda *et al.*, 1999). Por otra parte, también se ha demostrado, tanto en músculo como en sangre, que pacientes con DM1 presentan niveles reducidos de la coenzima Q10 y que estos niveles correlacionan inversamente con la expansión CTG (Siciliano *et al.*, 2001b). Finalmente, también se ha determinado que el ADN mitocondrial de pacientes con DM1 presenta una mayor tasa de deleciones (Sahashi *et al.*, 1992). No obstante, son necesarias más evidencias que caractericen el déficit de la función mitocondrial en pacientes con DM1.

La **pérdida de la sensibilidad a los nutrientes** es otro de los procesos antagonistas alterados en pacientes con DM1. Hay trabajos que han demostrado una alteración de este fenómeno en DM1, como, por ejemplo, la presencia de resistencia a la glucosa, hiperinsulinemia y, en algunos casos, el desarrollo de diabetes mellitus, además de alteraciones en el metabolismo del calcio, insuficiencia tiroidea o hipogonadismo (Orngreen *et al.*, 2012). Algunas de estas alteraciones son debidas, en parte, a una hiperfosforilación de CUGBP1/CELF1. Esta fosforilación lleva a un *splicing* anormal del receptor de insulina y resulta en una resistencia a la insulina en estos pacientes (Savkur *et al.*, 2001).

En definitiva, la DM1 presenta múltiples alteraciones clínicas y biológicas que se asocian al envejecimiento fisiológico, lo que ha llevado a visualizar esta enfermedad como un cuadro progeroide o una enfermedad con un envejecimiento prematuro sistémico (Mateos-Aierdi *et al.*, 2015; Meinke *et al.*, 2018).



**Figura 15.** Distintas alteraciones moleculares compartidas entre la DM1 y el envejecimiento celular. Modificado de Mateos-Aierdi *et al.*, 2015

## 2.4. El calcio durante el envejecimiento

El  $\text{Ca}^{2+}$  desempeña un papel vital en una amplia gama de procesos celulares tanto en la fibra muscular como en otros tipos celulares, regulando la homeostasis de las membranas celulares, el acoplamiento entre la excitación y la contracción muscular (E-C), la neurotransmisión, la diferenciación, la proliferación o la supervivencia celular (Berridge *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2015). Además, el  $\text{Ca}^{2+}$

regula el metabolismo y la biogénesis mitocondrial, así como su motilidad, su distribución y su plasticidad (Celsi *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2004). Por lo tanto, una regulación estricta de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  es esencial para la función adecuada del músculo esquelético.

Recientemente, se ha demostrado que la DM1 se asocia con un *splicing* alternativo desregulado del gen CACNA1S que es un sensor de voltaje con un papel central en la E-C (Tang *et al.*, 2012). Además se han observado alteraciones en el *splicing* de otros genes relacionados con la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  como en los canales del cloro tipo 1, el transportador del calcio SERCA que transporta el  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol al retículo sarcoplásmico y los receptores de rianodina RyR1 (Kimura *et al.*, 2005; Santoro *et al.*, 2014). Todo ello conduce a un incremento crónico de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Benders *et al.*, 1997; Jacobs *et al.*, 1990; Vihola *et al.*, 2013), que es un escenario común de otras distrofias musculares (Vallejo-Illarramendi *et al.*, 2014).

Todos estos hallazgos sugieren que el efecto combinado de un *splicing* mal regulado de varios genes involucrados en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$ , junto con la desregulación del acoplamiento de E-C en la DM1, podrían jugar un papel de magnitud desconocida en la degeneración muscular y multisistémica que acontece en la DM1.

## **2.5. Rasgos moleculares alterados en el envejecimiento y en el cáncer**

En 2000 Hanahan y Weinberg describieron los "*Hallmarks of Cancer*" (Hanahan and Weinberg, 2000) entendidos como los principales rasgos moleculares característicos que va adquiriendo una célula durante el desarrollo y la progresión del cáncer. Estos procesos van encaminados a mantener la señalización

proliferativa y así evadir la supresión del crecimiento mediante la inmortalidad replicativa, resistir las señales de muerte celular, activar la invasión y el proceso de metástasis, así como de inducir la angiogénesis, lo que permite un suministro incrementado de nutrientes para el crecimiento ilimitado del tejido tumoral. En 2011 se añadieron dos nuevas características, la habilidad para reprogramar su metabolismo energético y la habilidad para evadir al sistema inmune (Hanahan and Weinberg, 2011).

En un primer momento, cáncer y envejecimiento pueden parecer dos procesos contrapuestos. Sin embargo, comparten el mismo origen, la acumulación de daño celular (López-Otín *et al.*, 2013), y los mismos mecanismos biológicos. Si comparamos los procesos implicados en el desarrollo del cáncer y del envejecimiento observamos que hay procesos compartidos, como son la inestabilidad genómica, la alteración en la población de células madre, la senescencia celular, las alteraciones metabólicas o el mantenimiento de los telómeros, pero con diferente intensidad y, en muchos casos con efectos opuestos (Hanahan and Weinberg, 2011; López-Otín *et al.*, 2013). El cáncer sería el resultado de una ganancia aberrante de funcionalidad de estos procesos, mientras que el envejecimiento sería el resultado de una pérdida de funcionalidad de los mismos mecanismos.

### **2.5.1. Acortamiento telomérico en cáncer y envejecimiento**

Los telómeros son unas secuencias de ADN repetitivas TTAGGG que se encuentran al final de cada cromosoma y cuya función es proteger la integridad del ADN en cada proceso de réplica. En este sentido, en cada división celular se produce un acortamiento de dichos telómeros debido a que la maquinaria replicativa del ADN es incapaz de replicar por completo estas secuencias (Blasco, 2005).

## INTRODUCCIÓN

Para evitar este fenómeno, la célula posee mecanismos compensatorios como es el enzima telomerasa, encargado de mantener el tamaño de los telómeros (Greider and Blackburn, 1985). Sin embargo, en los tejidos adultos la actividad de este enzima no es suficiente para compensar dicha pérdida telomérica que se produce en cada división celular (Collins and Mitchell, 2002).

Las células cancerosas se caracterizan, entre otras cosas, por una proliferación descontrolada, con lo que en un momento dado, el acortamiento telomérico producido debería detener la proliferación de las células que se están transformando en neoplásicas. Sin embargo, esto no ocurre así, en parte debido a que las células tumorales desarrollan mecanismos para mantener altos niveles de telomerasa y así evitar su acortamiento en cada ronda replicativa (Stewart and Weinberg, 2006).

Numerosos estudios han demostrado una correlación inversa entre la longitud telomérica y la edad, observándose telómeros más cortos en personas de mayor edad (Cawthon *et al.*, 2003; von Zglinicki and Martin-Ruiz, 2005). También se ha documentado una exacerbación del acortamiento telomérico en enfermedades y procesos asociados al envejecimiento como en las alteraciones cardiovasculares, la aterogénesis o en la enfermedad de Alzheimer (Ogami *et al.*, 2004; Panossian *et al.*, 2003). De la misma manera las enfermedades progeroides citadas anteriormente como el síndrome de Hutchinson-Gilford o de Werner presentan un acortamiento telomérico mayor (Chang *et al.*, 2004; Decker *et al.*, 2009; Mason and Bessler, 2004).

La relación entre la longitud de los telómeros con el cáncer y el envejecimiento se ha demostrado generando el modelo de ratón deficiente para el enzima telomerasa. Con el desarrollo de las diferentes generaciones, se produce un mayor acortamiento telomérico, así como un envejecimiento más prematuro de este ratón. Además, este modelo es resistente a la inducción de tumores (Blasco,

2005; Blasco *et al.*, 1997; García-Cao *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 1998). Por el contrario, el ratón con sobreexpresión del enzima de la telomerasa es más susceptible al desarrollo de cáncer (Canela *et al.*, 2004; González-Suárez *et al.*, 2001).

### 2.5.2. Senescencia celular en cáncer y envejecimiento

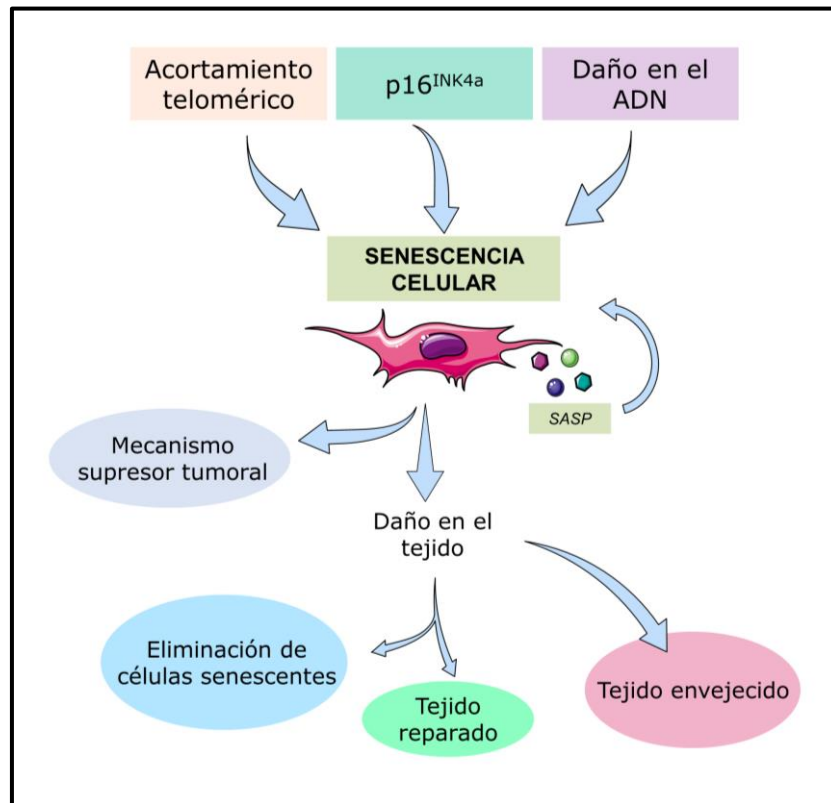
La senescencia celular es un proceso biológico que provoca la incapacidad de las células para proliferar, quedándose retenidas en fase G<sub>0</sub> del ciclo celular, aunque éstas siguen siendo activas metabólicamente. La senescencia celular es un mecanismo conservado que juega un papel fundamental en el equilibrio entre el cáncer y el envejecimiento fisiológico, asociándose su presencia a distintos procesos tanto fisiológicos durante el desarrollo embrionario o en la etapa adulta, como en enfermedades asociadas al envejecimiento (**Figura 15**) (Campisi, 2013; Campisi *et al.*, 2011; Gorgoulis *et al.*, 2019; Muñoz-Espín *et al.*, 2013; Storer *et al.*, 2013).

Los principales responsables de desencadenar el proceso de senescencia son el acortamiento telomérico junto con la activación de p16<sup>INK4a</sup> y p53 en respuesta al daño excesivo en el ADN, siendo el objetivo principal de la senescencia la eliminación de las células dañadas y así mantener la homeostasis tisular (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

Se ha demostrado *in vitro*, pero también *in vivo*, que la senescencia celular juega un papel supresor tumoral ya que está favorecida en procesos precancerosos y tumores benignos y su eliminación o inactivación es necesaria para la transformación neoplásica y para la progresión del tumor maligno (Bartkova *et al.*, 2006; Braig *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Collado *et al.*, 2005; Di Micco *et al.*, 2006; Sarkisian *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2007).

Sin embargo, también se ha observado una acumulación de células senescentes dentro de los tejidos durante el envejecimiento fisiológico, tanto en humanos (Dimri *et al.*, 1995), como en ratones (Wang *et al.*, 2009). Esta acumulación se ha descrito en casi todos los tejidos, pero con una especial acumulación en la piel, el hígado, los pulmones y el bazo (Kurz *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2009). Las células senescentes se acumulan debido a su ineficaz eliminación por el sistema inmune y a su propia secreción de factores proinflamatorios, lo que se conoce como el fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP, del inglés, "Senescence-associated secretory phenotype") (Freund *et al.*, 2010; López-Otín *et al.*, 2013). Esta acumulación de células senescentes perjudicial para el organismo se ha observado también en diferentes patologías asociadas a la edad como la fibrosis (Hecker *et al.*, 2014; Krizhanovsky *et al.*, 2008), la diabetes mellitus tipo 2 (Chesnokova *et al.*, 2009; Sone and Kagawa, 2005), la sarcopenia (Cosgrove *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2014; Sousa-Victor *et al.*, 2014), la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer (Bhat *et al.*, 2012; Chinta *et al.*, 2013) o el desarrollo de cataratas (Baker *et al.*, 2008). Además, se ha determinado que la eliminación de dichas células senescentes mediante la eliminación genética de su regulador p16<sup>INK4a</sup>, o a través de la administración de los compuestos denominados senolíticos, retrasa la aparición del tejido dañado, mantiene la homeostasis tisular y del organismo y retrasa el envejecimiento, además de aumentar la longevidad (Baar *et al.*, 2017; Baker *et al.*, 2011; Sousa-Victor *et al.*, 2014).





**Figura I6.** La senescencia celular en los procesos moleculares del cáncer y del envejecimiento. La senescencia celular se puede desencadenar por varios factores, entre los que destacan el acortamiento telomérico, la acumulación de p16<sup>INK4a</sup> y el daño en el ADN: los denominados factores de Hayflick. En los tejidos adultos, la principal función de la senescencia celular es la de proporcionar protección frente al cáncer. Esta protección se consigue mediante la activación de los mecanismos de reparación y regeneración tisular. En cambio, si este daño no es reparado adecuadamente se van a acumular dichas células senescentes, provocando la disfunción y envejecimiento del tejido. Modificado de Collado *et al.*, 2007.

### **3. BASES RACIONALES PARA UNA TERAPIA ANTI ENVEJECIMIENTO EN LA DM1**

#### **3.1. Nuevas aproximaciones basadas en compuestos anti envejecimiento**

Gran parte de la investigación en torno al envejecimiento se basa en discernir si es posible retrasarlo sin promover las enfermedades asociadas a él (Longo *et al.*, 2015).

Uno de los hallazgos más significativos en esta línea ha demostrado en modelos preclínicos que la restricción calórica es capaz de alargar la supervivencia y retrasar enfermedades o condiciones asociadas al envejecimiento como son la obesidad, la diabetes, la inflamación, la hipertensión o las enfermedades cardiovasculares (Bruens *et al.*, 2020; Fontana *et al.*, 2004; Mercken *et al.*, 2013). Los estudios preliminares en humanos también demuestran que la restricción calórica retrasa la aparición de fenotipos asociados al envejecimiento, aunque la duración y la severidad de este régimen calórico hacen que no sea factible o apetecible para muchas personas (Most *et al.*, 2017).

La rapamicina, la metformina, el resveratrol o los compuestos senolíticos (de Magalhaes *et al.*, 2017; López-Otín *et al.*, 2013), junto con la restricción calórica, son aproximaciones en curso que se están desarrollando como terapia antienvjecimiento. La administración de metformina se ha planteado en un ambicioso ensayo clínico frente al envejecimiento poblacional (Check Hayden, 2015). Desde un punto de vista traslacional y clínico, existe la posibilidad teórica de que uno de estos compuestos antienvjecimiento pueda ser utilizado para el tratamiento de la DM1. De hecho, el resveratrol aumenta el *splicing* del receptor de la insulina en fibroblastos de pacientes de DM1 (Takarada *et al.*, 2015), mientras que hay resultados que avalan la efectividad de los inhibidores mTOR (rapamicina)

sobre la función muscular en un modelo de ratón de DM1 (Brockhoff *et al.*, 2017), y también se ha identificado que la metformina revierte los defectos en el *splicing* y los niveles de glucemia en las células de individuos con DM1 (García-López *et al.*, 2011; Laustriat *et al.*, 2015).

### **3.1.1. Metformina**

La metformina es un fármaco que se usa en la actualidad para tratar la diabetes mellitus, y que a su vez también incide sobre varios procesos asociados al envejecimiento (Barzilai *et al.*, 2016). Entre sus efectos, se ha observado que es capaz de regular la inflamación (Saisho, 2015), la autofagia (Song *et al.*, 2015), la senescencia celular (Jadhav *et al.*, 2013), la producción de especies reactivas de oxígeno (Batandier *et al.*, 2006) y de reducir los niveles de daño en el ADN (Algire *et al.*, 2012). Todos estos procesos están implicados en el envejecimiento fisiológico y también en el desarrollo de tumores.

Recientemente se ha analizado el efecto que tiene la metformina en el aumento de la longevidad en diversos modelos animales. Se ha demostrado que tanto en *Caenorhabditis elegans* (Onken and Driscoll, 2010) como en modelos murinos (Anisimov *et al.*, 2008; De Haes *et al.*, 2014), la metformina incrementa la longevidad, siendo este incremento mayor si la administración comienza a edades tempranas. Además, este efecto anti-envejecimiento no se restringe a individuos sanos, observándose que la administración de metformina a un modelo de ratón de enfermedad de Huntington incrementa su esperanza de vida un 20% (Ma *et al.*, 2007), mejorando también su capacidad cognitiva y neuromuscular (Allard *et al.*, 2016). En humanos se ha descrito que puede reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Kooy *et al.*, 2009), prevenir la demencia (Cheng *et al.*, 2014) y contribuir a una disminución de la mortalidad (Bannister *et al.*, 2014).

Por otro lado, se ha determinado que los pacientes diabéticos desarrollan cáncer más frecuentemente que la población no diabética (Giovannucci *et al.*, 2010), pero en aquellos pacientes diabéticos tratados con metformina su incidencia se reduce hasta en un 30% (Evans *et al.*, 2005; Gandini *et al.*, 2014), lo que no sucede en pacientes diabéticos tratados con otros medicamentos anti-diabéticos (Bowker *et al.*, 2006).

En la DM1 se ha visto que, *in vitro*, la metformina es capaz de rescatar algunos procesos de *splicing* alternativo (Laustriat *et al.*, 2015), pero sin grandes beneficios cuando se traslada al modelo murino HSA<sup>LR</sup> (Brockhoff *et al.*, 2017). Sin embargo, recientemente se ha llevado a cabo un ensayo clínico, donde se ha visto que los pacientes con DM1 tratados con metformina mejoran en el test de la marcha (Bassez *et al.*, 2018). Por otra parte, se ha demostrado que los pacientes con DM1 y diabéticos que toman metformina tienen un menor riesgo a desarrollar cáncer (Alsaggaf *et al.*, 2019a).

No obstante, son necesarios nuevos estudios para entender el mecanismo de acción de la metformina en pacientes con DM1 y dilucidar si estos pacientes se podrían beneficiar del tratamiento con este fármaco.

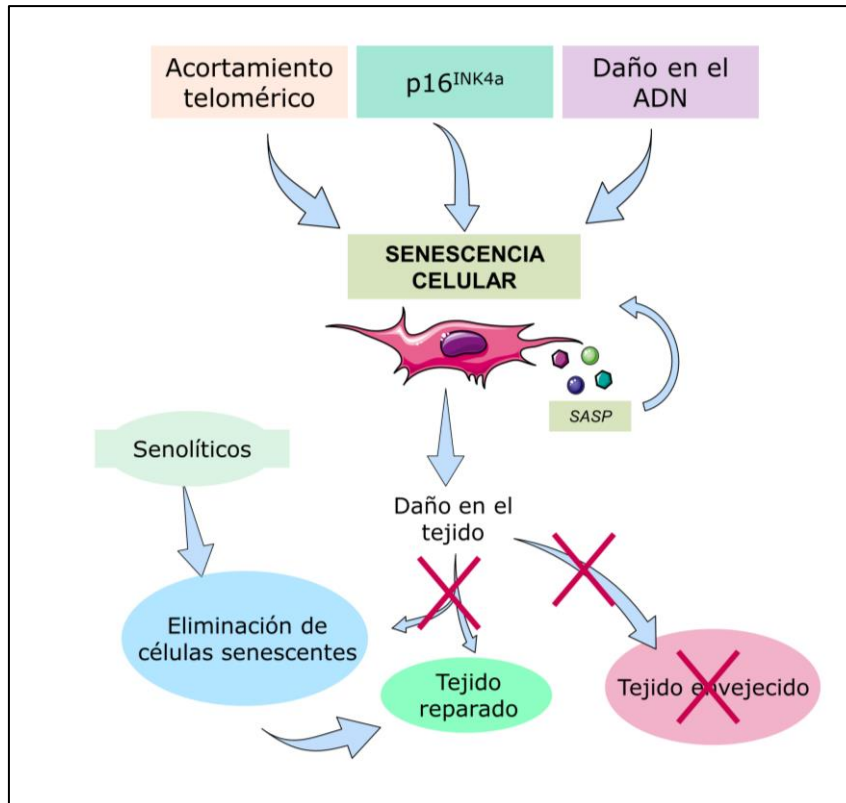
### **3.1.2. Compuestos senolíticos**

Como hemos visto anteriormente, las células senescentes se acumulan en los tejidos tanto durante el envejecimiento fisiológico como durante el desarrollo de enfermedades crónicas. Se ha demostrado que la eliminación de las células senescentes alarga la supervivencia y retrasa el envejecimiento (Baker *et al.*, 2011). Esto ha hecho que, recientemente, se estén descubriendo y caracterizando compuestos capaces de eliminar las células senescentes en los tejidos, los denominados compuestos senolíticos (Zhu *et al.*, 2015) (**Figura 17**).

Los primeros compuestos senolíticos que se descubrieron fueron el dasatinib, un inhibidor de tirosina quinasas (Zhu *et al.*, 2015) y la quercetina, con numerosas dianas entre las que se encuentra la modulación del estrés oxidativo y la inflamación (Costa *et al.*, 2016). Ambos son capaces de inducir apoptosis selectivamente en las células senescentes (Zhu *et al.*, 2015). Posteriormente, se observó que otro compuesto, el navitoclax, un inhibidor de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-XL y Bcl-W (Chang *et al.*, 2016), también tenía acción senolítica (Chang *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2016). Actualmente, hay aproximadamente 20 compuestos candidatos que se están testando como potenciales compuestos senolíticos actuando a diferentes niveles (Childs *et al.*, 2017).

Una fortaleza de estos compuestos es que parecen ser selectivos para células senescentes, siendo capaces de mitigar los rasgos asociados al envejecimiento en modelos animales (Chang *et al.*, 2016). Tanto la quercetina como el dasatinib incrementan la supervivencia y reducen la mortalidad en ratones envejecidos, incluso en ratones jóvenes a los que se les trasplantan células senescentes (Xu *et al.*, 2018). Por otra parte, en humanos, se ha demostrado que la administración de ambos compuestos durante tan solo 11 días, reduce el número de células senescentes en tejido adiposo y en la epidermis (Hickson *et al.*, 2019; Justice *et al.*, 2019).

Actualmente se están realizando nuevos ensayos clínicos para evaluar el impacto de los compuestos senolíticos en enfermedades asociadas al envejecimiento fisiológico, pero se desconoce por completo la función que tienen estos compuestos en la DM1.



**Figura I7.** Durante el envejecimiento se produce una acumulación de células senescentes en los tejidos que van a provocar su envejecimiento, debido a que el tejido ha perdido los mecanismos de reparación tisular. Los compuestos senolíticos son compuestos que promueven la eliminación de dichas células senescentes mediante apoptosis, evitando su acumulación en los tejidos y, con ello, evitando la disfunción de los mismos. Modificado de Collado *et al.*, 2007.

### 3.2. Aproximaciones orientadas a mejorar la homeostasis del calcio

Son numerosas las aproximaciones terapéuticas en curso basadas en corregir una deficiente homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , un hecho que se da tanto en el envejecimiento fisiológico como en las enfermedades neuromusculares (Vallejo-Illarramendi *et al.*, 2014; Weisleder and Ma, 2008). Diferentes estudios han demostrado efectos beneficiosos de estabilizadores de RyR-calstabinina, tanto en modelos murinos de distrofia de Duchenne como de distrofia de cinturas tipo 2E. Los complejos RyR y calstabinina-2 componen un importante canal de calcio que regula los niveles de calcio intracitoplasmático. El tratamiento con el estabilizador de dicha interacción, S107, resultó en una reducción de la nitrosilación del receptor 1 de RyR, una reversión del agotamiento de calstabinina-1 y una mejora general de la función muscular y del rendimiento físico (Andersson *et al.*, 2012; Bellinger *et al.*, 2009; Mackrill, 2010). Por otro lado, se han desarrollado otras estrategias terapéuticas para normalizar la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  basadas en conseguir una sobreexpresión de SERCA1 o SERCA2 mediante el tratamiento con BGP-15 o la transferencia de genes mediada por virus adenoasociados (Goonasekera *et al.*, 2011; Morine *et al.*, 2010), como forma de recuperar la homeostasis del calcio.

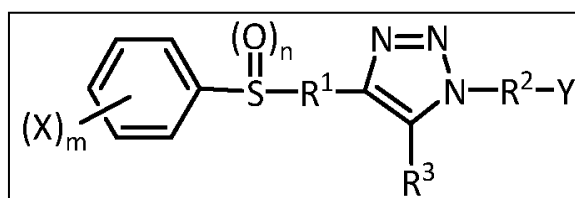
En la DM1 se han observado alteraciones en el *splicing* en el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  CACNA1S, el receptor de RyR y la bomba SERCA, que contribuyen a la elevación característica del  $\text{Ca}^{2+}$  basal intracelular en células musculares, la cual tiene un importante impacto a su vez en el desarrollo de la enfermedad (Vallejo-Illarramendi *et al.*, 2014). Por otra parte, existen evidencias de que agentes como la rapamicina, un inhibidor de mTOR, modula el envejecimiento del organismo retrasándolo en diferentes especies como gusano, mosca y ratón (Blagosklonny, 2017; Ehninger *et al.*, 2014). En DM1 hay resultados que avalan la efectividad sobre la función muscular de los inhibidores mTOR en un modelo de ratón de DM1 (Brockhoff *et al.*, 2017).

Por lo tanto, la estrategia farmacológica orientada tanto a corregir un defecto en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  como aquellas orientadas a inhibir a mTOR podrían ser un nuevo enfoque terapéutico para en la DM1.

### **Calcio y mTOR: los compuestos ahulkenoides**

Los compuestos ahulkenoides (**Figure 18**) son una nueva serie de nuevas entidades químicas diseñadas y caracterizadas como estabilizadores de la unión entre RyR y calstabilina-2 y por lo tanto con actividad normalizadora de los niveles de calcio.

La reducción en la afinidad de la unión de RyR por calstabilina hace que el canal no se cierre por completo y se incremente la concentración intracelular de calcio (Bellinger *et al.*, 2008a; Guerrero-Hernández *et al.*, 2014). Se ha determinado que este fenómeno ocurre en varias condiciones como durante el ejercicio crónico, el envejecimiento y las distrofias musculares (Andersson *et al.*, 2011; Bellinger *et al.*, 2009; Bellinger *et al.*, 2008b; Liu *et al.*, 2012; Reiken *et al.*, 2003). En este contexto, el AHK6 ha sido testado en un modelo murino de Duchenne (*mdx*) demostrando una mejora de la fuerza de agarre, la histopatología del músculo EDL y el diafragma (Aldanondo, 2017).



**Figura 18.** Estructura química general de los ahulkenoides. Los diferentes miembros de la familia de los ahulkenoides han sido generados mediante sustituciones en los radicales  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$ , X e Y.



En base a todos los resultados experimentales obtenidos con los ahulkenoides tanto a nivel muscular como de SNC (datos no publicados), estos compuestos podrían tener un efecto anti-envejecimiento a través de dos mecanismos no excluyentes y complementarios. Por un lado, por su efecto canónico sobre la nitrosilación de los receptores RyR y la estabilización del complejo RyR-calstabina, evitando así la salida del calcio al citoplasma y, por otro lado, por la modulación de la unión de la calstabina a mTOR sobre el que ejercería una modulación en función del nivel de actividad previo y tendría un efecto inhibitor de esta vía.





## ***HIPÓTESIS***

---





Los pacientes con DM1 presentan un envejecimiento acelerado a nivel biológico y celular lo que se traslada a la presencia de síntomas, síndromes y patologías asociadas al envejecimiento a nivel clínico.

Las terapias con compuestos con potencial efecto antienvjecimiento supondrán un beneficio terapéutico sistémico para los pacientes con DM1.





## ***OBJETIVOS***

---



1. Identificar los procesos moleculares implicados en el envejecimiento acelerado en la cohorte de Guipúzcoa de pacientes con DM1 de Guipúzcoa.
  - 1.1. Determinar el riesgo a desarrollar cáncer y su patrón molecular.
  - 1.2. Estudiar la longitud telómerica.
  - 1.3. Caracterizar las rutas de proliferación, división celular y senescencia.
  - 1.4. Caracterizar el metabolismo celular.
  
2. Estudiar el impacto de nuevas estrategias terapéuticas frente a la DM1.
  - 2.1. Analizar el efecto de los compuestos senolíticos en la DM1.
  - 2.2. Analizar el efecto de la metformina en la DM1.
  - 2.3. Analizar el efecto de los compuestos ahulkenoides en la DM1.



## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

---



## 1. MUESTRAS Y LÍNEAS CELULARES HUMANAS

### 1.1. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética en Investigación Clínica del Área Sanitaria de Guipúzcoa (**Anexo 1**) y se adecúa a la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica y a los principios éticos de la declaración de Helsinki. Todos los participantes han firmado un consentimiento informado (**Anexo 2**) y han recibido una hoja de información al paciente (**Anexo 3**).

En el presente estudio se han utilizado muestras humanas derivadas de células mononucleares de sangre periférica, fibroblastos primarios y mioblastos primarios (**Tablas M1 y Anexo 5**). Todas las muestras usadas han sido utilizadas tras su depósito en el Biobanco Vasco de Investigación.

### 1.2. MUESTRAS DE SANGRE Y AISLAMIENTO DE PBMC

El aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con DM1 y de sujetos sanos se realizó mediante un procedimiento estándar usando un gradiente de *Ficoll*. La extracción de sangre (4 mL totales de sangre) se realizó por venopunción en el Servicio de Neurología del Hospital Universitario Donostia. La sangre se recogió en tubos *Vacutainer EDTA K3* y se mantuvo a temperatura ambiente hasta su procesamiento (menos de 30 min tras la extracción). Posteriormente, se diluyó en proporción 1:1 en tampón fosfato salino (PBS). Después, se añadió en un tubo cónico con 15 mL de *Ficoll*, sobre el que se incorporó muy suavemente la mezcla de sangre y PBS y, a continuación, se centrifugó a 400 g durante 30 min a 20°C sin el mecanismo de frenado. Una vez centrifugadas las muestras, se aisló cuidadosamente la interfase que contenía la fracción de células mononucleares y se lavó dos veces con PBS centrifugándolas a

100 g durante 10 min a 20°C hasta obtener un *pellet* celular. Las muestras fueron mantenidas a -80°C hasta su uso y procesadas acorde a su uso final según la realización de la extracción de proteínas o de ARNm.

En la **Tabla M1** se muestra un resumen de las muestras derivadas de PBMC utilizadas y en el Anexo 4 se encuentra el listado completo.

**Tabla M1.** Resumen de muestras humanas usadas en el presente estudio.

Muestras de ARNm				Muestras de proteína			
Hombres	Número	Edad	CTGn	Hombres	Número	Edad	CTGn
Controles	12	43	-	Controles	2	35	-
DM1	27	43	756	DM1	3	46	667
Mujeres	Número	Edad	CTGn	Mujeres	Número	Edad	CTGn
Controles	10	47	-	Controles	5	44	-
DM1	28	43	968	DM1	2	41	500

### 1.3. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS PRIMARIOS

Para el aislamiento de fibroblastos humanos (**Tabla M2**) se utilizó la técnica de explante. Se obtuvieron biopsias de piel por punción en el Servicio de Neurología del Hospital Donostia. Posteriormente, se trocearon en fragmentos de 1 mm. Los explantes se lavaron repetidamente en PBS y se depositaron en un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, previamente humedecido con medio de cultivo DMEM (11594486, Gibco, del inglés "*Dulbecco's Modified Eagle Medium*") suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, 10270106, Gibco), 2 mM de L-glutamina (25030024, Gibco), 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina (15140122, Gibco), lo que denominamos medio completo. A continuación, se procedió a incubar el frasco durante 4 h en posición vertical a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda en un incubador del tipo Steri-Cycle (Thermo Scientific). Una vez transcurrido dicho tiempo se procedió al cultivo en posición horizontal. En una semana, aproximadamente, se visualizó la migración de células adherentes sobre la



superficie de cultivo. Cuando las células tapizaban la totalidad de la superficie, se consideró que ya estaba formada la monocapa de células y el cultivo se encontraba confluyente, procediéndose al subcultivo de estas células en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> con 10 mL de medio completo y empleando tripsina-EDTA al 0.05% (25300054, Gibco) durante 5 min a 37°C para despegar las células 1 vez cada 7-10 días.

**Tabla M2.** Listado de líneas de fibroblastos usados en el presente estudio.

Línea Celular	Estatus	Género	Edad (biopsia piel)	MIRS <sup>a</sup>	CTG (n) <sup>b</sup>	Edad (al diagnóstico)
C1	Control	Hombre	49			
C2	Control	Mujer	48			
C3	Control	Hombre	27			
C4	Control	Hombre	29			
C5	Control	Hombre	46			
DM1-F1	DM1	Hombre	71	3	167	53
DM1-F2 <sup>c</sup>	DM1	Hombre	50	5	233	20
DM1-F3	DM1	Hombre	56	3	333	33
DM1-F4	DM1	Mujer	45	2	333	41
DM1-F5	DM1	Mujer	44	2	833	21
DM1-F6	DM1	Hombre	56	3	1333	20
DM1-F7	DM1	Mujer	34	4	1650	12

<sup>a</sup> La debilidad muscular se ha evaluado mediante el uso de la escala MIRS. (0-sin afectación muscular, 5-debilidad proximal grave).

<sup>b</sup> La determinación del tamaño de la expansión CTG se ha realizado en sangre al diagnóstico de DM1.

<sup>c</sup> Las líneas celulares DM1-F2 (fibroblastos) y DM1-M2 (mioblastos, provienen del mismo paciente)

#### 1.4. CULTIVO DE MIOBLASTOS PRIMARIOS

Se obtuvieron biopsias musculares en el Servicio de Neurología del Hospital Donostia y se procedió al aislamiento de mioblastos primarios que fueron purificados usando el marcador de superficie CD56 (**Tabla M3**).

Los mioblastos fueron cultivados en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> previamente tratados con 0.5% de gelatina y con 7 mL de su medio de cultivo

## MATERIALES Y MÉTODOS

compuesto por un 65% de DMEM y un 21% de M-199 (BE12-117F, Lonza), suplementado con un 10% de FBS, un 1% de insulina, un 1% de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin, 10 µg/mL de EGF y 25 µg/mL de FGF. El subcultivo de los mioblastos se realizó cada 7-10 días empleando tripsina al 0.25% (Gibco) durante 5 min a 37°C para desprender los mioblastos de la superficie de cultivo.

**Tabla M3.** Listado de líneas de mioblastos usados en el presente estudio.

Línea Celular	Estatus	Género	Edad (biopsia piel)	MIRS <sup>a</sup>	CTG (n) <sup>b</sup>	Edad (al diagnóstico)
C-M1	Control	Hombre	26			
C-M2	Control	Mujer	36			
DM1-M1	DM1	Mujer	35	3	1400	15
DM1-M2 <sup>c</sup>	DM1	Hombre	46	5	233	20

<sup>a</sup> La debilidad muscular se ha evaluado mediante el uso de la escala MIRS (0-sin afectación muscular, 5-debilidad proximal grave).

<sup>b</sup> La determinación del tamaño de la expansión CTG se ha realizado en sangre al diagnóstico de DM1.

<sup>c</sup> Las líneas celulares DM1-F2 (fibroblastos) y DM1-M2 (mioblastos, provienen del mismo paciente)

## COMPUESTOS UTILIZADOS

Los tratamientos fueron dispuestos 14-16 h tras la siembra de cada experimento y a la concentración y la duración mostrada en la **Tabla M4**.

**Tabla M4.** Listado de compuestos usados en el presente estudio.

COMPUESTO	DISOLVENTE	DOSIS	FUNCIÓN	REF
Metformina	Agua	1 µM 72 h	Fármaco anti-diabético a través de AMPK	PHR1084 Sigma-Aldrich
Ahulken-6 (AHK6)	Agua	0.1 µM 72 h	Estabilizador del canal de calcio rianodina-calstabilina	Síntesis propia
Ahulken-7 (AHK7)	Agua	0.1 µM 72 h	Estabilizador del canal de calcio rianodina-calstabilina	Síntesis propia
Doxorrubicina (DOX)	Agua	1 µM 16-18 h	Agente que induce daño en el ADN	44583 Sigma-Aldrich
Quercetina	DMSO	5, 10 y 15 µM 72 h	Inhibidor de estrés oxidativo e inflamación	Q4951 Sigma-Aldrich
Navitoclax (ABT-263)	DMSO	0.1, 1 y 10 µM 72 h	Inhibidor de BCL-XL, BCL2 y BCL-W	S1001 Selleckchem
Dasatinib	DMSO	0.1 y 0.5 nM 72 h	Inhibidor de Src/Bcr-Abl	SML2589 Sigma-Aldrich

## 2. MODELOS ANIMALES

### 2.1. MODELO EN MOSCA

En este estudio, mediante una colaboración con el Prof. Rubén Artero (Universidad de Valencia), hemos podido acceder a un modelo de DM1 en *Drosophila melanogaster*. En concreto, hemos usado la cepa MHC-Gal4 UAS-CTG480 1.1 (García-López *et al.*, 2008), que expresa 480 repeticiones CTG interrumpidas cada 20 repeticiones CTG por la secuencia "CTCGA". Este modelo se encuentra bajo el promotor de la cadena pesada de la miosina (MHC), dirigiendo la expresión de las 480 repeticiones a la musculatura.

Las moscas se mantuvieron a 23°C con un 70% de humedad y con ciclos de 12 h de luz y oscuridad. Todos los cruces fueron llevados a cabo en estas condiciones y las moscas fueron alimentadas con comida estándar para *Drosophila* suplementada con 5 mM de quercetina o con 50 nM de dasatinib.

Para el ensayo de locomoción se emplearon moscas de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días de vida. En concreto, se emplearon 5 moscas por cada grupo experimental y entre 7 y 9 grupos experimentales para cada edad, repitiéndose la prueba entre 2 y 3 veces. Para ello, se definió una distancia de 8 cm en vertical y se contabilizó el número de moscas capaces de recorrer dicha distancia durante 10 s de observación.

Para el análisis de longevidad, se partió de 50 moscas hembra cuya supervivencia fue testada cada dos días. Los resultados fueron representados usando el estimador de Kaplan-Meier y se analizó su significación estadística empleando el test de Log-rank con la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones.

Para el ensayo de expresión de ARNm se diseccionó el tórax de 12 moscas representativas de cada condición y se procedió a la extracción del ARNm mediante el reactivo *TRI Reagent Solution* (AM-9738, Life Technologies), previa disgregación del tejido mediante el procesador de tejidos TissueLyser (85210, Qiagen).

## 2.2. MODELO EN RATÓN

Por otro lado, mediante una colaboración con la Dra. Geneviève Gourdon (INSERM, París) hemos accedido al modelo de ratón DMSXL de DM1. Este modelo está compuesto por una secuencia genómica de más de 45 kB compuesta por los genes DMPK, DMWD y SIX5, además de poseer más de 1.000 repeticiones CTG de manera multisistémica (Huguet *et al.*, 2012). Dicho modelo DMSXL deriva de un modelo previo (DM300) (Seznec *et al.*, 2000) en el que, tras sucesivas generaciones, de manera natural se produjo una fuerte expansión en el tamaño del triplete dando como resultado al modelo DMSXL.

La secuencia genética del modelo DM300 deriva de una familia que presenta grandes cambios intergeneracionales en la herencia del tamaño de la expansión. En dicha familia, el padre se encontraba ligeramente afecto y poseía entre 50-70 repeticiones, la hija heredó 500 repeticiones y dos nietas, hijas de la madre afectada, desarrollaron una forma congénita de la enfermedad con más de 2.000 repeticiones (Seznec *et al.*, 2000).

Para el ensayo de expresión de ARNm se obtuvieron muestras del músculo tibial anterior de ratones de dos meses de edad y se procedió a la extracción del ARNm mediante el reactivo *TRI Reagent Solution*, previa disgregación del tejido mediante el procesador de tejidos TissueLyser.

### **3. ENSAYOS FUNCIONALES EN CULTIVOS CELULARES**

#### **3.1. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN**

Se sembraron por duplicado  $3 \times 10^4$  fibroblastos en placas de  $9.5 \text{ cm}^2$  (placas de 6 pocillos) en un volumen final de 2 mL. Las células fueron despegadas con tripsina y contadas mediante una cámara de Neubauer (717805, Brand) a día 1, 3 y 5 tras la siembra del experimento.

#### **3.2. ENSAYO 3T3 DE INDUCCIÓN DE SENESCENCIA**

Los fibroblastos fueron cultivados siguiendo el protocolo 3T3 para evaluar su entrada en senescencia por agotamiento replicativo. Los fibroblastos fueron subcultivados de manera sucesiva cada 3 días a una densidad celular de  $3 \times 10^4$  células en placas de  $9.5 \text{ cm}^2$  (placas de 6 pocillos) en un volumen final de 2 mL. Este procedimiento se mantuvo hasta el agotamiento del cultivo o hasta superar un 60% de células positivas para la actividad  $\beta$ -galactosidasa a pH subóptimo. Para la cuantificación del resultado, se procedió al cálculo del número total de veces que los fibroblastos habían doblado su número o *PDL* (del inglés, "*Population Doublings*") mediante la siguiente fórmula:  $PDL = \text{Log}_{10} (\text{n}^\circ \text{ de fibroblastos a día 3} / \text{n}^\circ \text{ de fibroblastos a día 0}) / \text{Log}_{10} (2)$ .

#### **3.3. ENSAYO DE ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA**

Para la medida de la senescencia celular se utilizó un kit comercial de actividad  $\beta$ -galactosidasa (9860S, Cell Signaling). Este kit detecta la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las células a pH 6, es decir, a pH subóptimo, una característica distintiva de las células senescentes. En el ensayo, el X-Gal es metabolizado en las

células senescentes produciéndose un producto de color azul e insoluble (5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-*índigo*) que es visible en las células mediante microscopía óptica. Se sembraron  $0.5 \times 10^4$  fibroblastos en pocillos de cámaras de inmunofluorescencia de  $0.7 \text{ cm}^2$  (Nunc Lab-Tek II Chamber Slide, Thermo-Scientific) en 0.5 mL de su medio de cultivo y tras 48 h se retiró el medio de cultivo, se hicieron dos lavados con una solución de PBS y se procedió a la fijación y tinción de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se incubaron con la solución de tinción durante 15-18 h a  $37^\circ\text{C}$  en un incubador sin  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, las células fueron observadas en un microscopio óptico invertido, capturándose fotografías de manera aleatoria para obtener el número de células positivas o senescentes por cada condición experimental. En el caso de ensayos con compuestos, el compuesto se aplicó durante 72 h a las dosis indicadas, 24 h tras la siembra.

### **3.4. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR MTT**

Con el objetivo de evaluar el efecto de la metformina y de los compuestos ahulken sobre los fibroblastos humanos, se realizó el ensayo colorimétrico de viabilidad celular basado en el metabolismo del bromuro 3-(4,5 dimetil 2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Este ensayo se basa en la medición del color púrpura del formazán producido por la reducción del reactivo MTT por parte del enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa de las células viables.

Para ello, se sembraron  $0.1 \times 10^4$  fibroblastos por pocillo en placas de  $0.32 \text{ cm}^2$  (96 pocillos) por sextuplicado y tras 24 h fueron tratados con los diferentes compuestos a las concentraciones indicadas en cada experimento. Como control se usó el disolvente de cada compuesto. Una vez transcurridas 72 h, se añadió el reactivo MTT (M2128, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0.25 mg/mL en cada pocillo y se incubó durante 2.5 h a  $37^\circ\text{C}$  y con un 5% de  $\text{CO}_2$ . A continuación,

se aspiró el sobrenadante de cada pocillo y se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de solución de DMSO (D1650, Sigma-Aldrich) para disolver los cristales de formazán. Posteriormente se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Halo LED 96 (Dynamica). Se asignó el 100% de viabilidad al valor medio de la absorbancia de los pocillos control (células tratadas con vehículo) y, respecto a ese valor, se calcularon los porcentajes de viabilidad de las células sometidas a las diferentes concentraciones de cada compuesto.

### 3.5. MEDIDA DE LA PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Para la medida de la producción de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) se utilizó el kit comercial basado en bioluminiscencia *ROS-Glo™ H2O2 Assay* (G8820, Promega). Para ello se sembraron  $0.1 \times 10^4$  células en 100  $\mu\text{L}$  en pocillos de 0.32  $\text{cm}^2$  (placas de 96 pocillos) por duplicado en su medio habitual. A las 24 h tras la siembra, 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de cada muestra en estudio fue incubado con un sustrato que se caracteriza por reaccionar directamente con el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , generando un precursor de la luciferina. Después, se añadió una solución de detección que convierte dicho precursor en luciferina y contiene luciferasa, por lo que se produce una señal luminiscente, que es proporcional al nivel de  $\text{H}_2\text{O}_2$  presente en la muestra. Dicha señal fue medida en un luminómetro *PERAstar* (BMG LABTECH) usando placas de 96 pocillos opacas y blancas. La actividad luciferasa fue normalizada frente a la del control sano y expresada como actividad relativa. En el caso de ensayos con tratamientos, el compuesto se administró durante 72 h a la dosis indicada (**Tabla M4**), 24 h tras la siembra.

### **3.6. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL, CANTIDAD DE MITOCONDRIAS Y CANTIDAD DE ROS PRODUCIDO POR MITOCONDRIAS**

Para las tres determinaciones se sembraron  $20 \times 10^4$  fibroblastos en placas de  $60 \text{ cm}^2$  (placas tipo p100) y al día siguiente fueron procesadas para el análisis de los tres parámetros mencionados de manera independiente mediante citometría de flujo. El procesamiento consistió en tripsinizarlas y centrifugarlas a  $2.000 \text{ g}$  durante  $5 \text{ min}$  a  $20^\circ\text{C}$ . Las células se incubaron utilizando las sondas especificadas en la **Tabla M5**, y tras el tiempo indicado de incubación, se lavaron con una solución de PBS, con la salvedad de que para la tinción con *MitoSOX* se usó durante todo el procesamiento una solución de HBSS en lugar de PBS. La suspensión celular fue analizada usando un citómetro de flujo *Guava Easy Cyte 8HT* (Millipore). Se determinó la intensidad media de fluorescencia de los tres parámetros analizados independientemente: *MitoSOX*, *MitoTracker Red* y *Rhodamine 123*. Posteriormente, los valores de *MitoSOX* fueron normalizados con los valores de *MitoTracker* para determinar la producción de especies reactivas de oxígeno por cada mitocondria individual.

El reactivo *Rhodamine 123* es una sonda que atraviesa la membrana mitocondrial y se acumula dentro de ella, pero cuando la mitocondria experimenta una pérdida en su potencial de membrana la sonda deja de acumularse y se pierde la tinción. El reactivo *MitoTracker Red FM* es una sonda que atraviesa pasivamente la membrana mitocondrial y se acumula dentro de las mitocondrias sanas, mientras que el reactivo *MitoSOX Red* es una sonda que también penetra la membrana mitocondrial pero que se oxida rápidamente por los superóxidos.



**Tabla M5.** Listado de sondas usadas para citometría de flujo.

SONDA	FUNCIÓN	USO	EXCITACIÓN	EMISIÓN	REF.
Rhodamine 123	Determinación del potencial de membrana mitocondrial	1 $\mu$ M 15 min	511 nm	534 nm	R8004 Sigma- Aldrich
MitoTracker Red FM	Determinación de la cantidad de mitocondrias	0.2 $\mu$ M 30 min	581 nm	644 nm	M22425, Invitroge n
MitoSOX Red	Determinación de especies reactivas de oxígeno, superóxidos específicos de mitocondria	5 $\mu$ M 30 min	510 nm	580 nm	M36008, Invitroge n

### 3.7. ESTUDIO DEL METABOLISMO MITOCONDRIAL

Para el estudio del metabolismo mitocondrial (**Figura M1**) se usó el analizador *XF96 Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience). Dicho instrumento se caracteriza por la medición simultánea de la tasa de consumo de oxígeno y de la acidificación del medio extracelular (OCR y ECAR, respectivamente). Para ello se usó el kit *XF Cell Mito Stress* (103015, Seahorse Bioscience), que nos proporciona la información de los siguientes parámetros mitocondriales:

- **Respiración Basal:** Es una aproximación del consumo de oxígeno utilizado para satisfacer la demanda celular de ATP resultante de la fuga de protones mitocondriales. Muestra la demanda energética de la célula en condiciones basales.
- **Producción de ATP:** Se mide como la disminución en el consumo de oxígeno tras la inyección del inhibidor de la ATP sintasa, la oligomicina. Representa la proporción de la respiración basal que se estaba utilizando para impulsar la producción de ATP. En otras palabras, muestra la cantidad de ATP producida por las mitocondrias que contribuye a satisfacer las necesidades energéticas de la célula.
- **Fuga de protones:** Se mide como la respiración basal no acoplada a la producción de ATP.

- **Respiración Máxima:** Se mide como el consumo de oxígeno tras la inyección del desacoplante FCCP. Simula una demanda energética exacerbada para que la mitocondria produzca la máxima cantidad de energía posible. En otras palabras, es la tasa máxima de respiración que puede producir una célula.
- **Capacidad Respiratoria Disponible:** Se define como la capacidad de una célula para responder a una demanda energética.
- **Respiración No Mitocondrial:** Se mide como el consumo de oxígeno producido tras la adición de los 4 inhibidores mitocondriales, es decir, el consumo de oxígeno que se produce por vías no mitocondriales.

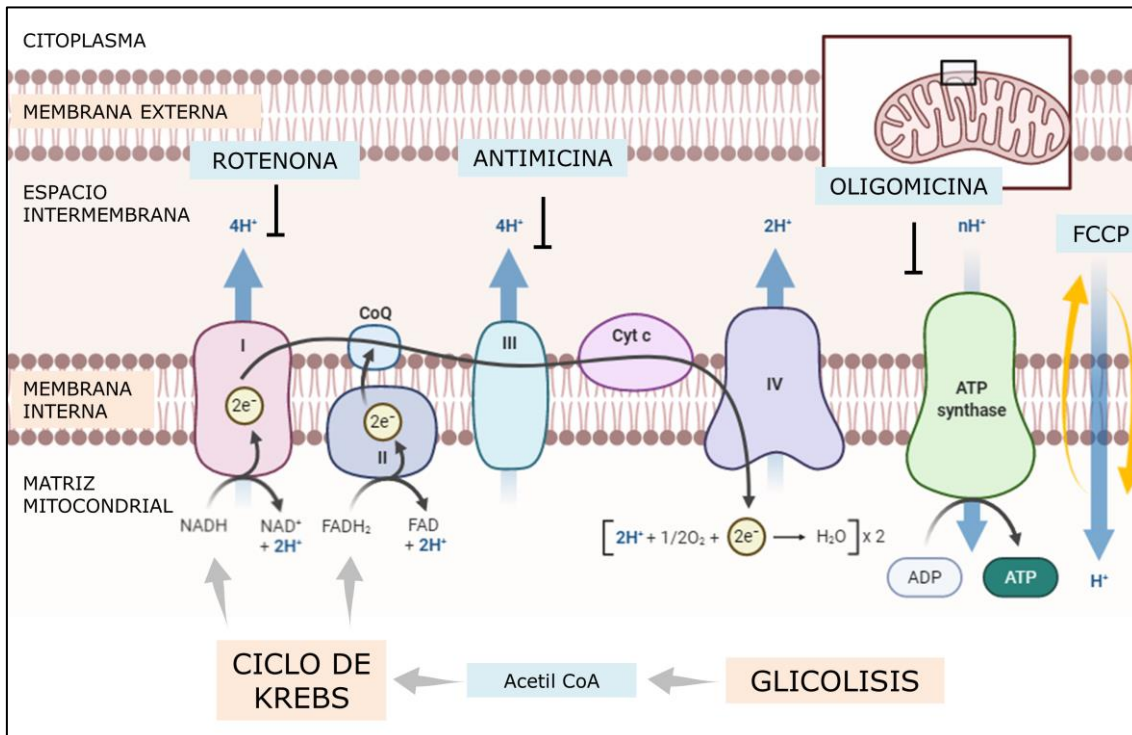
Para ello se sembraron  $1 \times 10^4$  fibroblastos en placas de *SeaHorse XF96* pocillos ( $11.40 \text{ mm}^2$ ), es su medio de cultivo, previamente tratadas con colágeno (354236, BD). Al día siguiente se reemplazó el medio de cultivo por medio de ensayo *Mito Stress* ajustado a pH 7.4 (**Tabla M6**). Se hicieron tres mediciones basales tras las cuales el sistema inyectó tres inhibidores mitocondriales de manera secuencial: primero oligomicina (un inhibidor de la ATP sintasa), en segundo lugar FCCP (un desacoplante que colapsa el gradiente de protones) y, finalmente, un mix de rotenona y antimicina (inhibidores de los complejos I y III, respectivamente) (**Tabla M7 y Figura M1**). Se hicieron tres mediciones después de la inyección de cada compuesto, determinándose en cada inyección el OCR y el ECAR.

**Tabla M6.** Composición del medio de cultivo para el ensayo *Mito Stress*.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN FINAL	REFERENCIA
DMEM (en polvo)	0.83 g / 100 mL	D5030, Sigma-Aldrich
Glucosa	10 mM	G8769, Sigma-Aldrich
Piruvato	1 mM	11360070, Gibco
L- Glutamina	2 mM	25030024, Gibco

En el caso de experimentos donde las células fueron pre-tratadas con diferentes compuestos, se sembraron  $0.5 \times 10^4$  fibroblastos por pocillo, tras 14-18 h se cambió el medio por medio con tratamiento y se procedió a la incubación durante 72 h adicionales, tras las cuales se analizó el metabolismo mitocondrial.

Tras las mediciones, se procedió a la normalización de los resultados en función del número de células en cada pocillo. Para ello, éstas fueron teñidas con una solución compuesta por 0.5 % de cristal violeta (HT90132, Sigma) y 4% de formaldehído (818708, Merck Millipore) durante 20 min. Posteriormente se retiró la tinción y se lavaron los pocillos. Una vez seca la placa, se procedió a disolver el cristal de violeta con una solución del 5% de ácido acético glacial (100063, Merck Millipore) y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Halo LED 96 (Dynamica). Los valores de OCR y ECAR fueron normalizados con los valores de absorbancia obtenidos, expresándose en unidades arbitrarias (a.u.).



**Figura M1.** En la imagen se representa de manera esquemática la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Para su correcto funcionamiento requiere de NADH y FADH<sub>2</sub> producidos en el ciclo de Krebs. Se representan los distintos inhibidores usados para evaluar la respiración mitocondrial: la rotenona es un inhibidor del complejo I; la antimicina es un inhibidor del complejo III; la oligomicina es un inhibidor de la ATP sintasa y el FCCP, desacoplante que colapsa el gradiente de protones.

**Tabla M7.** Listado de inhibidores usados para el ensayo *Mito Stress*.

INHIBIDOR	FUNCIÓN	USO	ORDEN	REF.
Oligomicina	Inhíbe la ATP sintasa o complejo V mitocondrial. Provoca una reducción en el OCR que es proporcional a la producción de ATP.	1 $\mu$ M	1	75351, Sigma-Aldrich
Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP)	Agente desacoplante que colapsa el gradiente de protones y destruye el potencial de membrana mitocondrial. Como resultado, el flujo de electrones no se inhibe y el consumo de oxígeno por el complejo IV alcanza el máximo.	1 $\mu$ M	2	C2920, Sigma-Aldrich
Rotenona	Inhibidor del complejo I. Junto con la antimicina inhiben por completo la respiración mitocondrial y sirve para la medición de procesos no mitocondriales.	0.5 $\mu$ M	3	R8875, Sigma-Aldrich
Antimicina	Inhibidor del complejo III. Junto con la rotenona inhiben por completo la respiración mitocondrial y sirve para la medición de procesos no mitocondriales.	0.5 $\mu$ M	3	A8674, Sigma-Aldrich

### 3.8. ESTUDIO DE LA GLICOLISIS

Para el estudio de la glicolisis (**Figura M2**) se usó también el analizador *XF96 Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience), pero, en este caso, se empleó el kit *XF Glycolysis Stress* (103020, Seahorse Bioscience), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se sembraron  $1 \times 10^4$  fibroblastos en placas de 96 pocillos ( $11.40 \text{ mm}^2$ ) previamente tratadas con colágeno (354236, BD) en su medio de cultivo normal. Al día siguiente se reemplazó el medio de cultivo por medio de ensayo *Glyco Stress* ajustado a pH 7.4 (**Tabla M8**). Se hicieron tres mediciones basales tras las cuales se procedió a la inyección de tres compuestos de manera secuencial: en primer lugar, glucosa, seguido por oligomicina y, finalmente, 2-deoxi-D-glucosa (**Tabla M9**). Se hicieron tres mediciones después de la inyección de cada compuesto, determinándose en cada inyección el OCR y el ECAR. Tras las mediciones, se procedió a la normalización de los resultados en función del número de células en cada pocillo, estimado mediante la tinción con cristal violeta.

**Tabla M8.** Composición del medio de cultivo para el ensayo Glyco Stress.

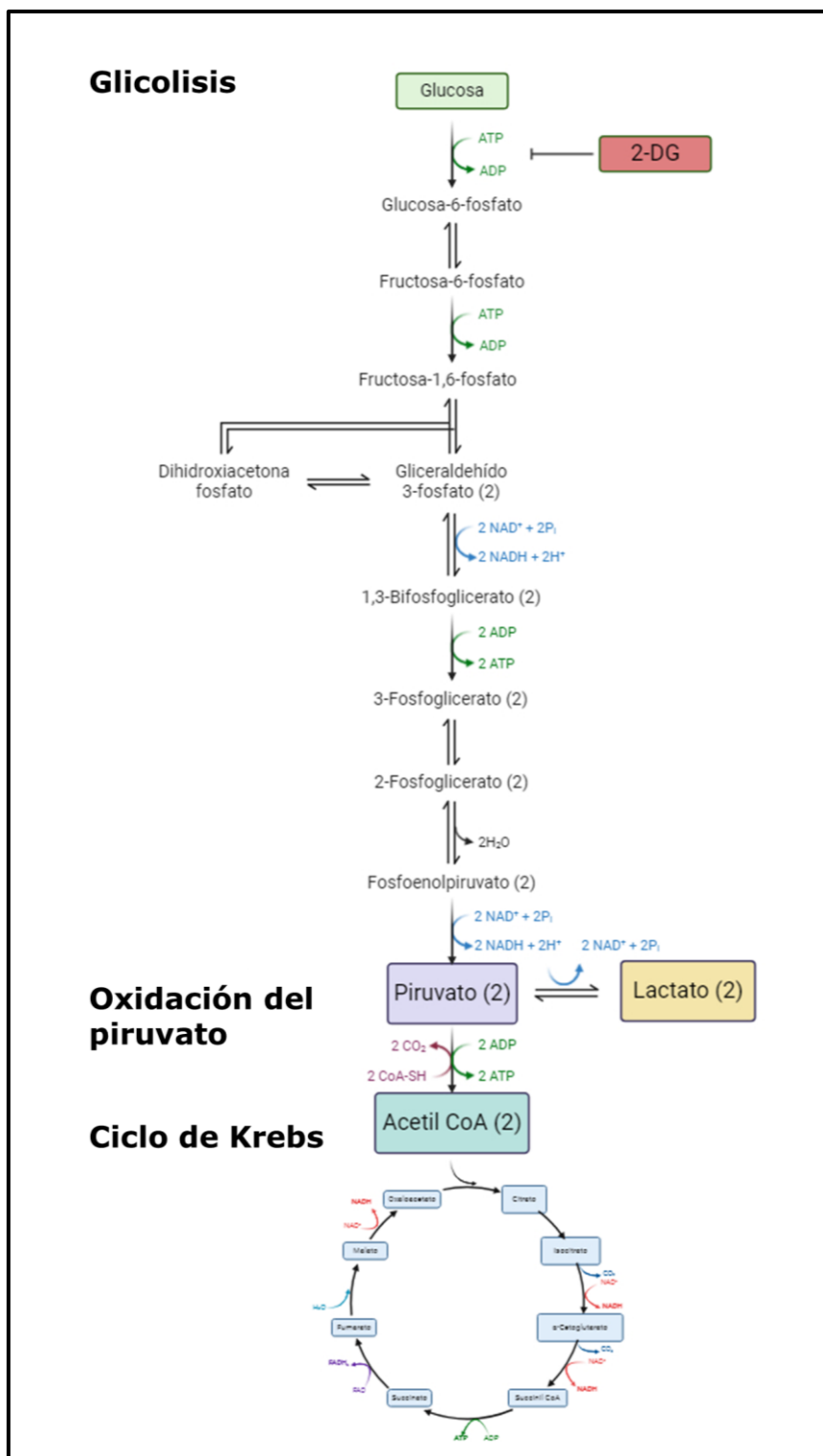
COMPUESTO	CONCENTRACIÓN FINAL	REF.
DMEM	0.83 g / 100 mL	D5030, Sigma-Aldrich
L- Glutamina	2 mM	25030024, Gibco

El diseño de este ensayo es el siguiente. En un primer momento, los fibroblastos están incubados con el medio de cultivo *Glyco Stress* sin glucosa ni piruvato. La primera inyección, de glucosa a concentraciones saturantes, se realiza para activar la **glicolisis basal** y con ello la producción de piruvato, ATP, NADH,  $\text{H}_2\text{O}$  y protones. Estos últimos serán los responsables del aumento del ECAR. La segunda inyección es de oligomicina, un inhibidor de la ATP sintasa, con lo que se va a inhibir la producción de ATP por vía mitocondrial y se desplazará toda esta producción a la vía de la glicolisis, lo que informará sobre la **capacidad máxima**

**de la glicolisis.** Finalmente, se inyecta 2-deoxi-D-glucosa, que es un análogo de la glucosa que va a saturar al enzima glucosa hexoquinasa y, por lo tanto, va a inhibir la glicolisis, asegurando que la medición del ECAR en el experimento es debido exclusivamente a la ruta de la glicolisis. Por último, la diferencia entre la glicolisis máxima y la basal es la **reserva glicolítica** de la célula para enfrentarse a un episodio de estrés.

**Tabla M9.** Listado de inhibidores usados para el ensayo Glyco Stress.

INHIBIDOR	FUNCIÓN	USO	ORDEN	REF.
Glucosa	Sustrato principal de la glicolisis.	10 mM	1	G8769, Sigma-Aldrich
Oligomicina	Inhibe la ATP sintasa o complejo V mitocondrial. Provoca una reducción en el OCR que es proporcional a la producción de ATP.	1 $\mu$ M	2	75351, Sigma-Aldrich
2-Deoxi-D-Glucosa	Análogo de la glucosa.	50 mM	3	D6134, Sigma-Aldrich



**Figura M2.** Representación esquemática de la glicólisis, la oxidación del piruvato y del ciclo de Krebs. Se representa el inhibidor 2-DG sobre el paso donde actúa el enzima hexoquinasa I.



### 3.9. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE INFECCIÓN LENTIVIRAL

Para la sobreexpresión de BMI1 se usaron lentivirus portadores de un plásmido con la secuencia codificante de BMI1 (pCCL-BMI1, amablemente cedido por la Dra. Jacqueline Lees, MIT) y lentivirus portadores del mismo plásmido con la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (GFP) (pCCL-GFP) a modo de control.

Para el silenciamiento de BRCA1 se usó la estrategia de "short-hairpin RNA" mediante la infección con lentivirus portadores de un plásmido con la secuencia de silenciamiento de BRCA1 (pLKO-shBRCA1, 44594, Addgene) y lentivirus portadores del plásmido control (pLKO.1 puro, 8453, Addgene).

Previamente a la generación de lentivirus ambos plásmidos fueron verificados mediante digestión por corte con enzimas de restricción. Para el diseño de la digestión se usó la plataforma *Restriction Mapper v3*.

Se sembraron  $20 \times 10^4$  fibroblastos en frascos de cultivo tipo 75 cm<sup>2</sup>. Transcurridas 24 h se realizaron las infecciones con una MOI de 10 (lo que se traduce a 10 unidades infectivas por célula) en medio DMEM en ausencia de suero y empleando polibreno (H9268, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 4 µg/mL. A las 6 h, se retiró el medio que contenía las partículas víricas y se añadió medio DMEM suplementado con FBS.

Transcurridas 48 h desde la infección, se procedió a la verificación de la misma. En el caso de la sobreexpresión de BMI1, mediante la observación de fibroblastos positivos para GFP (epifluorescencia). Además, dicha infección se verificó adicionalmente mediante la medición de la expresión proteica de GFP tanto por "western-blot" como por inmunofluorescencia. En el caso del silenciamiento de

BRCA1, se procedió a la selección de las células resistencias a puromicina (2 µg/mL, durante 48 h).

## 4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA

### 4.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Los fibroblastos fueron recogidos y centrifugados a 8.000 g durante 5 min y lavados con PBS para la obtención de un pellet celular. Los precipitados celulares se lisaron en 80 µL de tampón de lisis (1% NP-40, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 nM NaF, 30 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 mM Tris-HCl pH 7.4), suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (P8340, Sigma-Aldrich), de fosfatasas (P5726, Sigma-Aldrich), y el inhibidor de serina proteasas PMSF (P7626, Sigma-Aldrich) y se mantuvieron en hielo durante 30 min. Posteriormente fueron centrifugados a 13.000 g durante 10 min a 4°C para precipitar el material no solubilizado. Los sobrenadantes fueron trasvasados a nuevos tubos para ser cuantificados.

La cuantificación de la cantidad de proteína de los extractos celulares se determinó mediante el método del ácido bicinconínico empleando el kit *Pierce BCA Protein Assay* (23227, Thermo Scientific). Este compuesto es capaz de formar un complejo púrpura con iones Cu<sup>+</sup> en un medio alcalino en el que los enlaces peptídicos de las proteínas reducen Cu<sup>2+</sup>. La absorbancia del compuesto será proporcional a la concentración de proteína presente. Según esto, se incubó 1 µL de extracto celular con BCA durante 20 min a 37°C y se cuantificó la intensidad colorimétrica de las muestras en un lector de placas *MultiSkan Ascent* (Thermo Scientific) a 570 nm. Se emplearon muestras de albúmina de suero bovino a diferentes concentraciones conocidas para realizar una recta patrón en la que se interpoló la absorbancia de las muestras para obtener sus concentraciones.

## 4.2. WESTERN-BLOT

Para la preparación de las muestras se tomó el volumen correspondiente a los microgramos de proteína deseados (generalmente 20  $\mu\text{g}$ ) y se le añadió una quinta parte de tampón de carga 5X (312.5 mM Tris pH 6.8, 10% SDS, 50 % glicerol, 0.5% azul bromofenol y 5%  $\beta$ -mercaptoetanol). Las muestras fueron incubadas a 95°C durante 1 min para su completa desnaturalización y posteriormente fueron separadas por su peso molecular en geles de poliacrilamida mediante electroforesis del tipo SDS-PAGE. Se realizaron geles de poliacrilamida de 1.5 mm de grosor compuestos por una porción de gel concentradora del 4.5 % y otra porción inmediatamente inferior del 10 o 15 %, según el tamaño molecular de la proteína de interés. La electroforesis fue realizada en tampón de electroforesis (20 mM Tris, 0.2 M glicina, 0.1% SDS y pH 8.3) usando una fuente de alimentación *BioRad HC Power Supply* durante 15 min a 70 V y, posteriormente, 2 h a 120 V. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (10600001, Amersham), la cual tiene carga positiva de forma que aplicando una diferencia de potencial las proteínas migran del gel a la membrana y quedan inmovilizadas en ella. Se realizó mediante transferencia húmeda en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol y pH 8.6, 0.05% SDS) durante 90 min a 220 mA y a 4°C. A continuación, la membrana se incubó con solución de bloqueo (tampón TBS-T: 0.1M Tris-HCl, 0.01 % Tween 20, suplementado con 5 % leche en polvo) durante 1 h a temperatura ambiente para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos primarios.

**Tabla M10.** Listado de anticuerpos primarios y secundarios usados para western-blot.

ANTICUERPOS PRIMARIOS				
NOMBRE	DILUCIÓN	ORIGEN	FABRICANTE	REF.
$\beta$ -actina	1:20.000	Ratón	Sigma-Aldrich	AC-15
GFP	1:1.000	Cabra	Abcam	ab6673

*Anticuerpos frente a la DM1*

DMPK	1:500	Ratón	Santa Cruz	sc-134319
MBNL1	1:1.000	Conejo	Abcam	ab45899

*Anticuerpos para evaluar la proliferación y senescencia celular*

p16 <sup>INK4A</sup>	1:500	Conejo	Abcam	ab108349
	1:50	Ratón		ab16880
p21 <sup>CIP1</sup>	1:500	Cabra	Santa Cruz	sc-397
p27 <sup>KIP1</sup>	1:500	Ratón	BD Laboratories	BD610241
BMI1	1:500	Ratón	Millipore	05-637
Fosfo AKT Ser473	1:250	Conejo	Cell Signalling	9271
AKT 1/2/3	1:500	Conejo	Santa Cruz	sc-8312

*Anticuerpos para evaluar el estrés celular*

Fosfo p38 MAPK Thr180/Tyr182	1:500	Conejo	Cell Signaling	9211
p38 $\alpha/\beta$	1:250	Ratón	Santa Cruz	sc-7972

## ANTICUERPOS SECUNDARIOS

Cabra anti-Conejo HRP	1:1.000	Cabra	Cell Signalling	7074S
Cabra anti-Ratón HRP	1:1.000	Cabra	Cell Signalling	7076S
Asno anti-Cabra HRP	1:1.000	Asno	Santa Cruz	sc-2020

Tras el bloqueo se procedió a la incubación de las membranas de nitrocelulosa con la dilución correspondiente de cada anticuerpo primario en solución de bloqueo en agitación a 4°C durante 15-18 h (**Tabla M10**). Posteriormente las membranas se lavaron 3 veces durante 5 min con tampón TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a

peroxidasa en solución de bloqueo en agitación a temperatura ambiente durante 1 h. Tras la incubación las membranas fueron lavadas 3 veces con solución de TBS-T.

La detección de las proteínas se realizó mediante los sustratos *Luminata Crescendo Western HRP substrate* (WBLUR0100, Merck Millipore) o *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (34095, Thermo Scientific), basados en la reacción quimioluminiscente de la oxidación del luminol por parte de la peroxidasa conjugada a los anticuerpos secundarios. Se empleó el sistema de adquisición de imágenes de quimioluminiscencia iBright FL-1000 (Invitrogen).

### 4.3 INMUNOFUORESCENCIA

Para determinar la expresión y/o localización subcelular de las proteínas de interés se sembraron  $1 \times 10^4$  fibroblastos (o  $0.5 \times 10^3$  fibroblastos en el caso de tratamientos) en su medio de cultivo en pocillos de cámaras de inmunofluorescencia de  $0.7 \text{ cm}^2$  (Nunc Lab-Tek II Chamber Slide, Thermo-Scientific) y tras 24 h fueron fijados con formaldehído al 4% durante 10 min. Tras la fijación se lavaron 3 veces con una solución de PBS, se bloquearon y permeabilizaron con una solución de PBS al 0.3 % de Tritón X-100 (T8787, Sigma-Aldrich) suplementado con 5 % de FBS durante 1 h a temperatura ambiente. Tras el bloqueo las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario a la dilución correspondiente con una solución de PBS al 0.3 % de Tritón X-100 durante 15-18 h a 4°C (**Tabla M11**). Posteriormente fueron lavadas 3 veces con solución de PBS para ser incubadas con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo en solución de PBS al 0.3 % de Tritón X-100 a una dilución 1:500 durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Se volvieron a lavar 3 veces con solución de PBS y se procedió a teñir la cromatina con *Hoechst* (33342, Sigma-Aldrich) durante 10 min. Posteriormente se retiraron los compartimentos y se realizó el montaje de las preparaciones con medio de montaje *Fluoro-Gel* (17985-

10, Aname). Las preparaciones fueron fotografiadas en un microscopio Nikon Eclipse 80i o en un microscopio confocal Zeiss LSM 900 y procesadas con los softwares *NIS Elements Advances Research* y *Zen Blue*, respectivamente.

**Tabla M11.** Listado de anticuerpos primarios y secundarios usados para inmunofluorescencia

<b>ANTICUERPOS PRIMARIOS</b>				
<b>NOMBRE</b>	<b>DILUCIÓN</b>	<b>ORIGEN</b>	<b>FABRICANTE</b>	<b>REF.</b>

*Anticuerpos frente a la DM1*

DMPK	1:200	Ratón	Santa Cruz	sc-134319
CUGBP1	1:500	Conejo	Abcam	ab9549

*Anticuerpos para evaluar la proliferación y senescencia celular*

Fosfo Histona H3 Ser10	1:2.000	Ratón	Abcam	ab14955
Ki-67	1:500	Conejo	Abcam	ab15580

*Anticuerpos para evaluar el daño en el ADN y la apoptosis*

$\gamma$ -H2AX Ser139	1:250	Ratón	Millipore	05-636
Fosfo ATM Ser1981	1:250	Conejo	Cell Signalling	13050
53BP1	1:250	Conejo	Novus-Biologicals	NB100-304
PARP	1:700	Conejo	Abcam	ab32064
Capasa 3 activa	1:500	Ratón	R&D	AF835

*Anticuerpos para evaluar la mitocondria*

TOM20	1:350	Conejo	Proteintech	11802-1AP
PGC1- $\alpha$	1:250	Conejo	Novus Biologicals	NBP1-04676

**ANTICUERPOS SECUNDARIOS**

Alexa Fluor 555 Cabra anti-Ratón IgG (H+L)	1:500	Cabra	Invitrogen	A21422
Alexa Fluor 488 Cabra anti-Conejo IgG (H+L)	1:500	Cabra	Invitrogen	A32731

#### 4.3.1 Medición de la intensidad de fluorescencia

La medición de la intensidad de fluorescencia se realizó mediante el programa Image J. En el caso de las proteínas  $\gamma$ -H2AX, 53BP1 y CUGBP1 se procedió a la medición de la intensidad nuclear de al menos 100 células por cada condición experimental y en el caso de las proteínas DMPK y MBNL1 se procedió a la medición de la fluorescencia total. Para establecer el umbral de la señal de fluorescencia se procedió a la medición de una zona del mismo tamaño en el exterior celular. Posteriormente, mediante el programa Image J se procedió al cálculo de la "densidad de fluorescencia integrada" restando a cada medición la fluorescencia umbral previamente medida.

#### 4.3.2 Tinción con EdU

Para evaluar la habilidad de la célula de proliferar se utilizó la técnica basada en la detección de la incorporación de EdU. El EdU (5-etinilo-2'-deoxiuridina) es un análogo del nucleótido timina y, por lo tanto, se va a incorporar a la molécula de ADN cuando ésta se replique. Posteriormente, el EdU incorporado es detectado usando fluorescencia. Se usó el kit comercial *Click-IT EdU Imaging* (C10338, Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para ello se sembraron  $0.5 \times 10^3$  fibroblastos (o  $0.5 \times 10^3$  fibroblastos en el caso de tratamientos) en su medio de cultivo en pocillos de cámaras de inmunofluorescencia de  $0.7 \text{cm}^2$  y tras 12-18 h se procedió a cambiar el medio de cultivo por medio con tratamiento con metformina, para su posterior incubación durante 72 h adicionales, siendo las 24 h finales la incubación correspondiente con  $10 \mu\text{M}$  de EdU.

Tras las incubaciones correspondientes, las células fueron fijadas con formaldehído al 4% durante 15 min. Tras la fijación se lavaron 3 veces con PBS al

3% BSA y se permeabilizaron con PBS al 0.3% Tritón X-100 durante 20 min a temperatura ambiente. Tras la permeabilización se lavaron 2 veces con PBS al 3 % BSA y se incubaron con el cóctel de reacción (**Tabla M12**) durante 30 min. Posteriormente fueron lavadas 1 vez con PBS-3% BSA y se procedió a teñir la cromatina con *Hoechst* durante 10 min. Por último, se retiraron los compartimentos del porta y se realizó el montaje con medio de montaje Fluoro-Gel. Las preparaciones fueron fotografiadas en un microscopio Nikon Eclipse 80i y procesadas con el software *NIS Elements Advances Research*.

**Tabla M12.** Composición del cóctel de reacción

Componente	Cantidad/pocillo
Click-IT Buffer	172 uL
CuSO <sub>4</sub>	8 uL
Alexa Fluor Azida	0.48 uL
Buffer aditivo	20 uL

#### 4.4. Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Para determinar la presencia de agregados CTG en forma de *foci* nucleares se sembraron  $1 \times 10^4$  fibroblastos en su medio de cultivo en pocillos de cámaras de inmunofluorescencia de 0.7 cm<sup>2</sup>. Tras 12-14 h, los fibroblastos fueron fijados con formaldehído al 4% durante 15 min para ser posteriormente lavados con solución de PBS.

Tras la fijación se lavaron 3 veces con una solución de PBS y se procedió a su permeabilización con etanol al 70 % (ET00111000, Scharlau) durante 15-18 h a 4°C. Posteriormente, las preparaciones fueron rehidratadas durante 5 min a temperatura ambiente con tampón salino de citrato de sodio 2X (S6639, Sigma-Aldrich) al 50% de formamida (47671, Sigma-Aldrich). Antes de la hibridación, tanto las preparaciones como la sonda, de manera independiente, fueron incubadas durante 5 min a 80°C. Después, se procedió a la preparación de la solución de



hibridación compuesta por: tampón salino de citrato de sodio 2X suplementado al 10% de sulfato de dextrano (D8906, Sigma-Aldrich), 2 mM de ribonucleótidos de vanadilo (94742, Sigma-Aldrich), 0.02 % de albúmina de suero bovino (A9647, Sigma-Aldrich), 50 % de formamida junto con 0.1  $\mu$ M de la sonda específica (CAG) $\times$ 10 conjugada al fluoróforo Alexa-488 (Thermo-Fisher). Las preparaciones fueron hibridadas durante 15-18 h a 37°C en una atmósfera saturada de humedad. Posteriormente, las muestras fueron lavadas dos veces con tampón salino de citrato de sodio 2X suplementado al 50% de formamida durante 30 min a 37°C y en agitación. Se procedió a teñir la cromatina con *Hoechst* durante 10 min a temperatura ambiente, se retiraron los compartimentos y se realizó el montaje de las preparaciones con medio de montaje *Fluoro-Gel*. Las preparaciones fueron fotografiadas en un microscopio confocal Zeiss LSM 900 (aumento 63X) y procesadas con el software *Zen Blue*.

## 5. ARRAY DE CITOQUINAS

Los niveles de citoquinas inflamatorias secretadas por los fibroblastos fueron determinados usando el *array* de citoquinas *Human Inflammation Array C3* (AAH-INF-3, RayBiotech), el cual está basado en inmunodetección. Para ello se sembraron  $20 \times 10^4$  fibroblastos en placas 60 cm<sup>2</sup> (placas tipo p100) y tras 14-18 h se lavaron e incubaron en su medio de cultivo sin FBS durante 48 h para generar el medio condicionado (CM), que fue recogido y congelado a -80°C hasta su uso. Además, se contó el número de células para normalizaciones posteriores. El CM fue descongelado y centrifugado a 9.000 g durante 5 min. Las membranas del *array* fueron bloqueadas con el reactivo de bloqueo durante 1 h, incubadas con el CM durante 15-18 h a 4°C, lavadas 5 veces con el reactivo de lavado e incubadas con el cóctel de anticuerpos conjugados a biotina durante 15-18 h a 4°C. Después se lavaron 5 veces con el reactivo de lavado y se incubaron con estreptavidina conjugada a peroxidasa durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, los

arrays fueron documentados con el sistema de quimioluminiscencia *iBright FL1000 system*. La señal correspondiente a cada citoquina se normalizó en función del número de células y fue analizada usando el programa *ImageJ* y la herramienta desarrollada por Carpentier, 2010 .

## **6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA**

### **6.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL**

Para el aislamiento del ARN total celular las células fueron lisadas mediante *TRI Reagent Solution* (AM-9738, Life Technologies). En el caso de las muestras de tejido muscular provenientes tanto del tórax de *D. melanogaster*, como del músculo tibial anterior del ratón DMSXL se procedió a su lisis usando el aparato disociador de tejido TissueLyser (85210, Qiagen), mediante bolas de acero inoxidable.

Tras la lisis completa, al lisado se le añadieron 0.2 mL de cloroformo (C2432, Sigma-Aldrich), se homogeneizó y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente para la formación de fases. Posteriormente se centrifugó a 13.000 g durante 10 min a 4°C. Una vez centrifugado se procedió a la separación de la fase acuosa en tubos tratados con DEPC (159220, Sigma-Aldrich), se añadieron 0.5 mL de 2-propanol (I9516, Sigma-Aldrich) y 1 µL de glicógeno a 5 µg/µL (AM9510, Ambion). Esta mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente para precipitar el ARN y se centrifugó a 13.000 g durante 10 min a 4°C. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante y se añadió 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó a 7.000 g durante 5 min a 4°C para lavar el ARN precipitado. Por último, se descartó de nuevo el sobrenadante y el ARN precipitado se resuspendió en agua libre de RNAsas (10977035, Invitrogen). La concentración y pureza del ARN aislado se determinó mediante la medición de la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop-1000 (Thermo-Fisher). Las muestras de ARN fueron

almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso y aquellas con un ratio 260/280 inferior a 1.80 fueron descartadas.

## 6.2 TRANSCRIPCIÓN REVERSA

Para la obtención del ADN complementario (ADNc) de cadena simple se realizó la retro-transcripción (RT) mediante el método de cebadores aleatorios y el kit *Maxima First Strand Complementary DNA* (K1671, Thermo Scientific), que incorpora un tratamiento con *ADNasa* para eliminar las posibles contaminaciones con ADN genómico. Las muestras de ARN fueron procesadas siguiendo las instrucciones del fabricante en un termociclador BioRad C1000 con el siguiente protocolo: una incubación de 10 min a  $25^{\circ}\text{C}$  seguida de 30 min a  $50^{\circ}\text{C}$  y 5 min a  $85^{\circ}\text{C}$ . El ADNc se diluyó en agua libre de ARNasas (10977049, Invitrogen) a una concentración de 2 ng/ $\mu\text{L}$  y fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

En el caso de análisis de microARNs se realizó una transcripción reversa específica para cada microARN usando 50 ng de ARN, una sonda específica *Taqman* de RT (Thermo-Fisher) y el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (4368814, Applied Biosystems), siguiendo el siguiente protocolo: 30 min a  $16^{\circ}\text{C}$ , 30 min a  $42^{\circ}\text{C}$  y 5 min a  $85^{\circ}\text{C}$ .

## 6.3 PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

Para determinar los niveles de expresión de los genes de interés se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real o cuantitativa (qRT-PCR) empleando el agente fluorescente *SybrGreen* (4368706, Applied Biosystem) para la detección del producto amplificado. Se emplearon 10 ng de ADNc como molde de la reacción, dos cebadores específicos para cada gen y una mezcla de reacción. Las reacciones se realizaron en un equipo *CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad) con el siguiente protocolo: 1 ciclo de 120 s a  $50^{\circ}\text{C}$ , 1 ciclo de 600

s a 95°C; 41 ciclos de 15 s a 95°C y 60 s a 60°C y finalmente 1 ciclo de 10 s a 95°C seguido por 60 s a 60°C y 1 s a 97°C.

Como control interno para corregir las variaciones en los niveles de ADNc se usó la amplificación del gen de expresión endógena GAPDH (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa) para las muestras humanas. En el caso de las muestras derivadas del ratón DMSXL se procedió a la evaluación de 4 genes tomados de la bibliografía como controles de expresión endógena tanto en modelos de ratón como en músculo: Hprt, 18S,  $\beta$ -microglobulina y actina. En el caso de las muestras derivadas de *D. melanogaster* se procedió a la evaluación de los endógenos rp49 y tubulina. La elección del mejor candidato se llevó a cabo mediante el algoritmo "NormFinder" (Andersen *et al.*, 2004), que arrojó como mejor opción actina en ratón y rp49 en mosca.

Las secuencias de los cebadores específicos de cada gen fueron buscadas en bibliografía, en la base de datos *Primer-Bank* (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>), en la base de datos *Fly Primer Bank* (<https://www.flyrnai.org/FlyPrimerBank>), o diseñadas usando la herramienta *Primer 3 v4.1.0* (<http://primer3.ut.ee>). En todos los casos se verificó la especificidad de cada pareja de cebadores usando *Primer Blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) y a través del análisis de la curva de disociación generada tras la reacción de la qRT-PCR. En los casos donde fue posible se diseñaron los cebadores frente a secuencias entre exones con el objetivo de evitar la amplificación de ADN genómico.

Para el análisis de los niveles de expresión génica de microARNs se utilizó la tecnología *TaqMan* (4440040, Applied Biosystem), que se basa en el uso de dos cebadores y una sonda MGB específica. Se usaron 5 ng de ADNc como molde de la reacción y cada muestra se analizó en triplicado en un equipo *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) con el siguiente protocolo de reacción: 1

ciclo de 120 s a 50°C, 1 ciclo de 600 s a 95°C y 40 ciclos de 15 s a 95°C y 60 s a 60°C. Como control interno para corregir las variaciones en los niveles de ADNc se usó la expresión de *RNU48* (Schwarzenbach *et al.*, 2015).

Para la cuantificación relativa de los niveles de expresión génica se utilizó la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , consistente en calcular la expresión relativa del gen de interés respecto a su expresión en una de nuestras muestras que consideramos de referencia (Livak and Schmittgen, 2001; Schmittgen and Livak, 2008).

#### 6.4 ANÁLISIS DE SPLICING ALTERNATIVO

Para el análisis de variantes de *splicing* en *MBNL2* se usó la técnica de PCR semicuantitativa mediante la polimerasa *BIOTAQ DNA* (BIO-21040, Biotium) y el ADNc de interés como molde de la reacción. El protocolo y programa de PCR fueron descritos por Lin *et al.*, 2006 . Los cebadores (**Tabla M11**) fueron diseñados de manera que la diferencia entre la inclusión y exclusión del exón de interés tuviera una diferencia en pares de bases de entre un 10 y 25% respectivamente. La reacción se llevó a cabo durante 24 ciclos siguiendo el siguiente protocolo: 1 ciclo de 300 s a 95°C; 24 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 60°C y 60 s a 72°C; y finalmente 1 ciclo de 300 s a 72°C. Los productos de PCR se migraron en un gel de agarosa teñido con *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (41001, Biotium) y se visualizó en el sistema *iBright FL1000 system*.

**Tabla M11.** Listado de cebadores para variantes de *splicing* usados en el presente estudio.

GEN	EXÓN	SECUENCIA FORWARD (5' → 3')	SECUENCIA REVERSE (5' → 3')
MBNL2	7	ACAAGTGACAACACCGTAACCG	TTTGGTAAAGGATGAAGAGCACC

## 6.5 MICROARRAYS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Se han realizado dos microarrays de expresión génica, el primero de ellos en muestras de PBMC y el segundo en muestras de fibroblastos. Para el primero se usaron 0.3 µg de ARN obtenido de PBMC de 10 pacientes con DM1 y 10 controles sanos (**Anexo 5**), empleando el chip *Human Gene 1.0* (Affymetrix). El posterior filtrado y análisis de expresión diferencial se llevó a cabo en función del sexo de los pacientes. En el segundo microarray se analizaron 0.3 µg de ARN extraído de fibroblastos en cultivo de 6 pacientes con DM1 y 4 controles sanos (**Anexo 5**) usando el chip *Human Clariom D* (Affymetrix). En ambos casos se procedió al análisis de la integridad del ARN mediante el kit Agilent RNA 6000 Nano, siendo usadas aquellas muestras con un valor de integridad superior a 7.

## 6.6 RNA-Seq

Se realizaron tratamientos convencionales con AHK7 (0.1 µM, 72 h) en tres líneas de fibroblastos DM1 y se analizó el transcriptoma mediante RNA-Seq. Se procedió al aislamiento del ARN mediante *TRI Reagent Solution* y al correspondiente análisis de la integridad del ARN mediante el kit Agilent RNA 6000 Nano. Se seleccionaron las muestras con un valor de integridad superior a 9.

La preparación de las librerías junto con la secuenciación se realizó con la empresa CD Genomics (Nueva York, EE.UU.). La secuenciación se realizó en un secuenciador Illumina Nova Seq en configuración "paired end" 150 pares de bases. Para la obtención de las firmas moleculares, se seleccionaron los 500 genes más diferencialmente expresados para cada muestra y se usó la colección C5 (*GO Biological Process*) de la base de datos MSigDB.

## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos mostrados en el presente trabajo representan la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM), con el número de experimentos (n) indicado en cada experimento en el pie de figura. Si no se indica lo contrario, las medias fueron comparadas mediante el test estadístico t de Student y los datos se representaron usando GraphPad 8. Los asteriscos indican los diferentes grados de significación estadística: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

Los análisis de correlación en muestras de PBMC se basaron en el coeficiente de Pearson cuando las muestras estaban normalmente distribuidas o el coeficiente de Spearman cuando no estaban normalmente distribuidas. El análisis de la normalidad se realizó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, usando el software GraphPad 8.





## ***RESULTADOS: CAPÍTULO 1***

---



# CAPÍTULO 1

## **Cancer risk in DM1 is sex-related and linked to miRNA-200/141 downregulation.**

Artículo publicado en Neurology

Factor de Impacto 8.68 - Decil 1

Fernández-Torrón R\*, García-Puga M\*, Emparanza JI, Maneiro M, Cobo AM, Poza JJ, Espinal JB, Zulaica M, Ruiz I, Martorell L, Otaegui D, Matheu A, López de Munain A. **Cancer risk in DM1 is sex-related and linked to miRNA-200/141 downregulation.** Neurology. 2016 Sep 20;87(12):1250-7.

doi: 10.1212/WNL.0000000000003124. Epub 2016 Aug 24.

Submitted: 17 February 2016. Accepted: 8 June 2016. Published: 24 August 2016



## **Cancer risk in DM1 is sex-related and linked to miRNA-200/141 downregulation.**

Roberto Fernández-Torrón<sup>1,2\*</sup>, **Mikel García-Puga**<sup>3\*</sup>, José Ignacio Emparanza<sup>4</sup>, Miren Maneiro<sup>1</sup>, Ana María Cobo<sup>5</sup>, Juan José Poza<sup>1</sup>, Juan Bautista Espinal<sup>1</sup>, Miren Zulaica<sup>6</sup>, Irune Ruiz<sup>7</sup>, Loreto Martorell<sup>8</sup>, David Otaegui<sup>6</sup>, Ander Matheu<sup>3</sup> and Adolfo López de Munain<sup>1,2,9</sup>

<sup>1</sup>Neuromuscular Unit, Neurology Department, Donostia Hospital, San Sebastian, Spain;

<sup>2</sup>Center for Biomedical Research Network in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Institute Carlos III, Ministry of Economy and Competitiveness, Spain

<sup>3</sup>Oncology Area. Biodonostia Institute, San Sebastian, Spain

<sup>4</sup>Clinical Epidemiology Unit, Donostia University Hospital, CIBER-ESP, San Sebastian, Spain

<sup>5</sup>Neuromuscular Area, AP-HP Hôpital Marin de Hendaye - Hendaye, France

<sup>6</sup>Neurosciences Area. Biodonostia Institute, San Sebastian, Spain

<sup>7</sup>Department of Pathology, Hospital Donostia, San Sebastian, Spain

<sup>8</sup>Molecular Genetics Section, Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain

<sup>9</sup>Department of Neurosciences, University of the Basque Country, UPV/EHU, San Sebastian, Spain

\*These authors contributed equally and should be considered as co-first authors

Corresponding author:

**Dr. Adolfo López de Munain**

Neurosciences Area. Biodonostia Institute,

Paseo Dr Beguiristan

20018 San Sebastian, Spain

E-mail: adolfo.lopezdemunainarregui@osakidetza.eus

Search Terms: Myotonic dystrophy, Steinert's disease, Cancer risk, miRNA200, miRNA141

## RESUMEN

En este trabajo describimos el mayor riesgo a desarrollar cáncer en la cohorte de pacientes con DM1 de Guipúzcoa, que está compuesta por 424 pacientes seguidos entre los años 1985-2013. En dicha cohorte encontramos 70 tumores en 62 pacientes, lo que arrojó un incremento de 1.8 en el riesgo a desarrollar cáncer (95% CI= 1.37-2.36), siendo este riesgo mayor en mujeres que en hombres. El desarrollo de neoplasias fue la tercera causa de muerte, por detrás de las complicaciones respiratorias y las cardíacas. Las mujeres con DM1 tenían un riesgo mayor a desarrollar cáncer de ovario (SIR= 8.33, 95% CI= 1.72- 24.31) y endometrio (SIR= 6.86, 95% CI= 2.23-16.02). En cambio, en ambos sexos, el mayor riesgo estuvo en cáncer de tiroides (SIR= 23.33, 95% CI= 9.38-48.08) y de cerebro (SIR= 9.80, 95% CI= 3.18-22.88).

Por otra parte, realizamos un estudio transcriptómico en muestras de PBMC de pacientes con DM1, con el objetivo de establecer las rutas moleculares que estaban implicadas en el mayor riesgo a desarrollar cáncer en dichos pacientes. Encontramos que la ruta oncogénica compuesta por el miRNA 200c-141-BMI1-p16<sup>INK4a</sup> presentaba una fuerte alteración en pacientes con DM1, y que esta alteración era más marcada en mujeres que en hombres.

En este trabajo describimos el mayor riesgo oncológico en pacientes con DM1, especialmente en mujeres. Además, identificamos que la familia de supresores tumorales del miRNA200-miRNA141 tiene una expresión reducida en mujeres.

## CONTRIBUCIÓN:

Mi contribución en este artículo ha sido la realización del array de expresión génica y su posterior validación en el resto de la cohorte, los estudios de expresión tanto génica como de proteína de la ruta miRNA 200c-141-BMI1-p16<sup>INK4a</sup>, el análisis de los datos y la escritura del manuscrito.

## ABSTRACT

**Objective.** Describe the incidence of cancer in a large cohort of myotonic dystrophy type 1 (DM1) patients and to unravel the underlying molecular mechanisms.

**Patients and Methods.** Standardized incidence ratios (SIRs) were calculated in the Gipuzkoa DM1 cohort (1985-2013), dividing observed numbers by expected numbers for all cancers combined and stratified by sex. An estimation of the expected incidence was achieved by multiplying the specific age and sex incidence rates from the basque population cancer registry to the person-years observed in the study cohort. Large scale gene expression of PBMC samples derived from 10 DM1 individuals (5 men, 5 women), and 10 healthy matched controls were analyzed by the Human Gene 1.0 ST Affymetrix microarray.

**Results.** During 18796 person-years of follow-up, corresponding to 424 DM1 patients, we observed 70 cancer in 62 patients giving a 1.81-fold risk (95% CI= 1.37-2.36) which was stronger in women than in men. Ovary (SIR= 8.33, 95% CI= 1.72- 24.31) and endometrium (SIR= 6.86, 95% CI= 2.23-16.02) in women and thyroid (SIR= 23.33, 95% CI= 9.38-48.08) and brain (SIR= 9.80, 95% CI= 3.18-22.88) in both sexes were tumor sites with significant higher risks in DM1. There were differences in gene expression between healthy and DM1 patients and between DM1 men and women; all DM1 patients combined, and female DM1 patients displayed significant downregulation of the miRNA200c-141 tumor suppressor family.

**Conclusion.** Oncologic risk is increased in DM1, especially in women and for gynaecologic, brain and thyroid cancer. The expression of miRNA200- miRNA141 tumor suppressor family is decreased in DM1 women.

## INTRODUCTION

Myotonic Muscular Dystrophies are a group of autosomal dominant, multi-system diseases encompassed by two subtypes. Myotonic Dystrophy type 1 (DM1), also known as Curschmann-Steinert's disease (OMIM: 160900), is caused by the expansion of unstable trinucleotide (CTG) repeat expansion in the 3' untranslated region of a *DMPK* kinase gene located in chromosome 19. The type 2 (DM2, OMIM 602668) is originated by a tetra-nucleotide (CCTG) repeat expansion in intron 1 of the *CNBP* gene. DM1 displays a more severe phenotype than DM2 and represents the most common adult muscular dystrophy, with an estimated prevalence ranging from 0.5 to 18/100.000 people (1), although the disease prevalence is higher in some regions such the province of Gipuzkoa in the Spanish Basque Country (2).

The DM1 phenotype is grossly related to the size of CTG expansion and shows an extremely wide variability ranging from very mild forms with CTG repeats less than 50 and usually associated with cataracts developed in pre-senile age, to severe neonatal forms with more than CTG 1000 repeats, associated with severe developmental delays. Life expectancy is reduced due to complications derived from muscle weakness, respiratory and cardiac involvement, neoplasms and metabolic disturbances like hypercholesterolemia or diabetes (3,4).

In 1965, Cantwell & Reed first reported an association between DM1 and pilomatricoma, a rare and benign cutaneous tumor (5). Since then, several case reports describing benign and malignant neoplasms in virtually any location have been published (6). Furthermore, in the last years, large epidemiological studies performed in population or clinical-based cohorts provided evidence of increased risk of malignant tumours in DM patients (7-10). Excess risks for endometrium, ovarian, thyroid, skin, eye and colon cancer were observed in two of the three studies; while brain cancer excess risk was observed in one study. A follow-up study including 911 DM patients showed that females with DM1 were more likely to



develop cancers (11). Several studies have shown no association between the size of leukocyte repeat expansion and cancer risk in those patients (6) and the underlying causes and the biological mechanisms of the susceptibility for developing tumors are still unknown.

In this study, we quantified cancer risk in the clinically and genetically well-characterized Gipuzkoa Myotonic Dystrophy Cohort, and used gene expression analysis to identify possible molecular mechanism of cancer susceptibility in those patients. The cohort includes all patients diagnosed with DM in the past 30 years in an area with one of the largest DM1 prevalence worldwide.

## RESULTS

### Cancer incidence rate in DM1 patients

The study included 424 DM1 patients; 214 (50.5%) of them were women. Mean CTG repeat expansion size at the time of DM1 diagnosis was  $684 \pm 535$  CTG triplet expansions (range: 43-2000 CTG repeats). 137 patients were deceased at the time of analysis. Additional demographic and clinical features of the patients are shown in **Table 1**. The most common causes of death were diseases of the respiratory system (38%), the circulatory system (24.1%), and neoplasms (15.3%); causes of death were unknown in 15.3% of the patients (**Table e-1**).

During a 18,796 person-years of follow-up, we observed 70 cancers in 62 DM1 patients (32 women, 30 men, **Table e-2**) We observed multiple primary cancers in 7 patients (6 patients had 2 cancers and one patient had 3 different cancers) (**Table e-3**). Mean age at cancer diagnosis for all 62 patients was  $46.6 \pm 14.7$  years. Mean CTG repeat expansion size in DM1 patients with cancer was 629

**Table 1.** Clinical and molecular characteristics of DM1 cohort.

<b>Number of patients</b>	<b>424</b>
Sex	214 women (50.5%) 210 men (49.5%)
Mean CTG repeat expansion size	684 ± 535.6 CTG repeats (43-2.000 CTG repeats)
Transmission	Paternal 65%
MIRS (n=217)	2.54 ± 1.21
Age at last visit	50.7 ± 15.61 years
Respiratory symptoms	86 patients (20.3 %)
Cardiac disease	184 patients (43.4%)
Patients with cancer	62 (14.6%)
Death	137 patients
Mean Age of death	60.25 ± 13.11 years
Follow up days	18313. 6 ± 5739.2 days

**Table 2. SIRs by anatomical site.** (O: Observed cancer in DM1 cohort; E: Expected cancer in the basque general population adjusted per sex and age; Asterisks (\*), indicate statistical significance p < 0.05)

Cancer	Age at diagnosis of cancer	O	E	SIR	95%CI
<b>Women</b>					
Ovary	48 (16-63)	3	0.36	8.33	1.72-24.31*
Endometrium	53 (38-59)	5	0.73	6.86	2.23-16.02*
Breast	57 (56-69)	3	2.88	1.04	0.21-3.04
<b>Men</b>					
Prostate	75 (73-77)	2	4.33	0.46	0.06-1.67
Testes	15	1	0.07	14.25	0.35-79.6
<b>Both sexes</b>					
Thyroid	51 (40-67)	7	0.30	23.33	9.38-48.08*
Brain	53 (30-56)	5	0.51	9.80	3.18-22.88*
Kidney	53.5 (40-67)	2	0.79	2.53	0.31-9.15
Non-H Lymphoma	65.5 (61-70)	2	0.70	2.86	0.35-10.32
Liver	69 (66-72)	2	0.79	2.54	0.31-9.15
Colorectum	59 (41-86)	9	4.36	2.06	0.94-3.92
Stomach	56.5 (55-58)	2	1.27	1.57	0.19-5.69
Lung	59.5 (47-73)	4	3.40	1.18	0.32-3.01
Leukemia	57	1	0.26	3.80	0.09-21.43
Head & Neck	43	1	1.07	0.94	0.02-5.21
Melanoma	34	1	0.58	1.72	0.04-9.61
Urinary bladder	64	1	1.56	0.64	0.02-3.57

$\pm$  79 CTG repeats and there were no statistical differences between the length of the CTG expansion in DM1 patients with or without cancer ( $p > 0.05$ ). Although we only had MIRS data available at the time of the study in 217 patients, there were no statistical differences either regarding cancer status ( $p > 0.05$ ). Digestive organs (24.8 %), genitourinary system (21.4 %), skin (12.8 %) and thyroid gland (11.4%) were the most frequent malignant tumors (Table e-2).

When compared to the general population from Gipuzkoa, we detected an approximately two-fold increase in risk for cancer (SIR=1.81, 95% CI= 1.37-2.36). This risk increase was stronger in women (SIR= 2.71, 95% CI= 1.77-3.97) than in men (SIR= 1.40, 95% CI= 0.94- 2.01). When we compared the anatomical site of the cancer in the DM1 population with the general population stratified by sex and age, we found a high risk for developing ovary (SIR= 8.33, 95% CI= 1.72-24.31) and endometrium (SIR= 6.86, 95% CI= 2.23-16.02) cancer in women and thyroid (SIR= 23.33, 95% CI= 9.38-48.08) and brain (SIR= 9.80, 95% CI= 3.18-22.88) cancer in both sexes (**Table 2**). Besides these malignant tumors, only colorectal cancer nearly reached statistical significance (SIR= 2.06, 95% CI= 0.94-3.92).

### **Transcriptomic analysis of DM1 patients**

As previously described (16), we observed differences in gene expression between healthy men and women (**Fig. 1A,B**). Similar sex-differences were detected in the transcriptome of DM1 patients (**Fig. 1A-C**). Compared to healthy controls, DM1 patients had an upregulation of RNA5SP211, an unknown pseudogen, and downregulation of TAS2R13, a subtype of taste receptors.

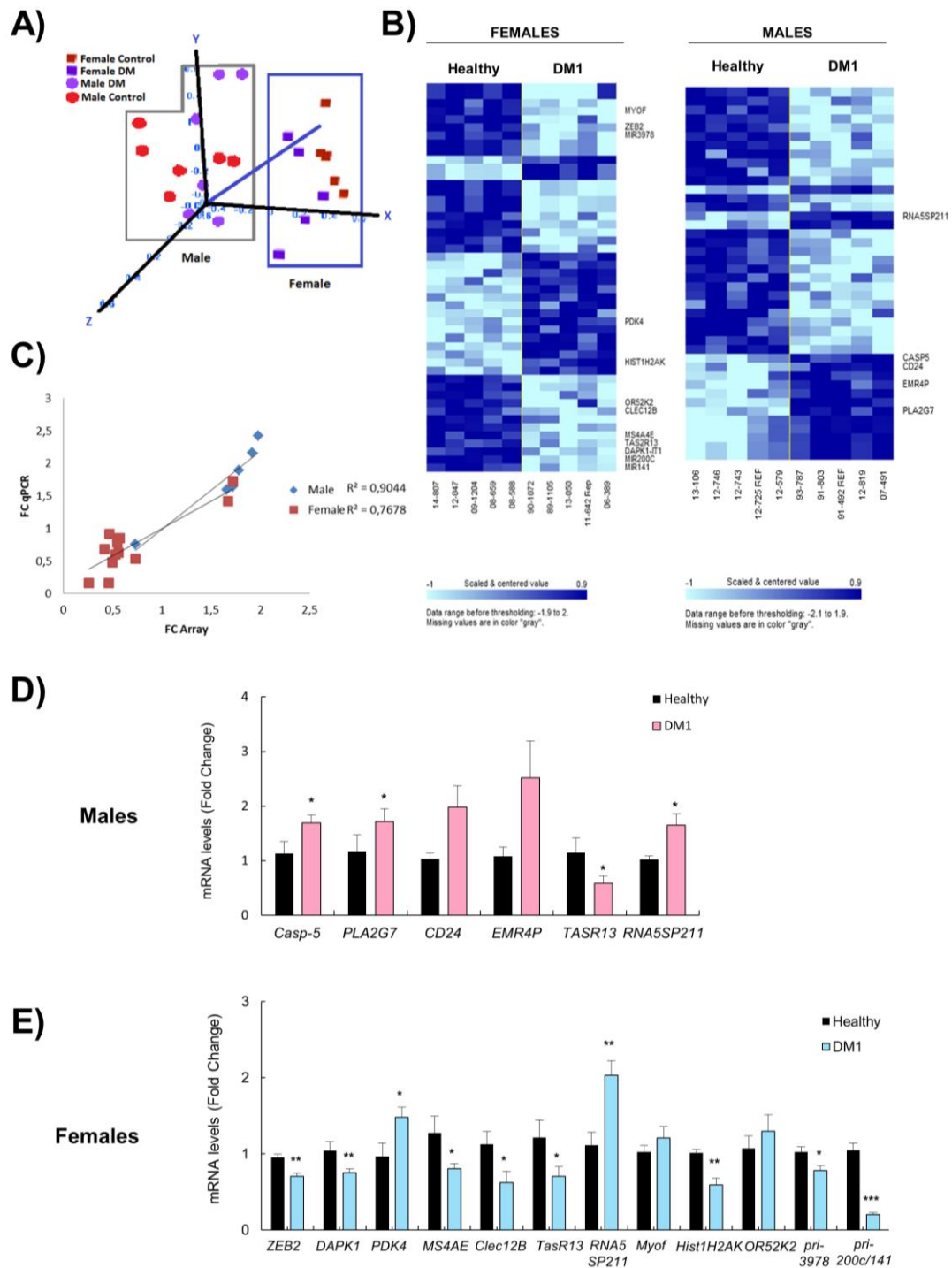
When we analysed the results per gender, we found that EMR4P (a hormone receptor), CD24 (a glycoprotein expressed on mature granulocytes and B cells), PLA2G7 (a platelet activating factor) and caspase-5 (a gene implicated in apoptosis) were significantly upregulated in men (**Fig. 1B,C**). Moreover, we identified 11 genes differentially expressed in DM1 women including: upregulation

of a subtype of histone (HIST1H2AK) and pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4), and down-regulation of three miRNAs precursors (pre-miR-3978, pre-miR-141 and pre-miR-200c), a transcription factor (ZEB2), an olfactory receptor (OR52K2), an inhibitory receptor of myeloid cells (CLEC12B), Myoferlin (a protein that play a role in calcium-mediated membrane fusion events, membrane regeneration and repair and subsequently in muscle weakness), a death-associated protein kinase (DAPK1), and MS4A4E (**Fig. 1B,C**). The same results were observed in an independent validation set of patients. (**Fig. 1D,E**). Specifically, the differentially expressed levels of 13 out of 17 genes detected in the array, were confirmed in the validation cohort.

### **Identification of *miR-200c/miR-141* cluster associated to the cancer susceptibility phenotype in DM1**

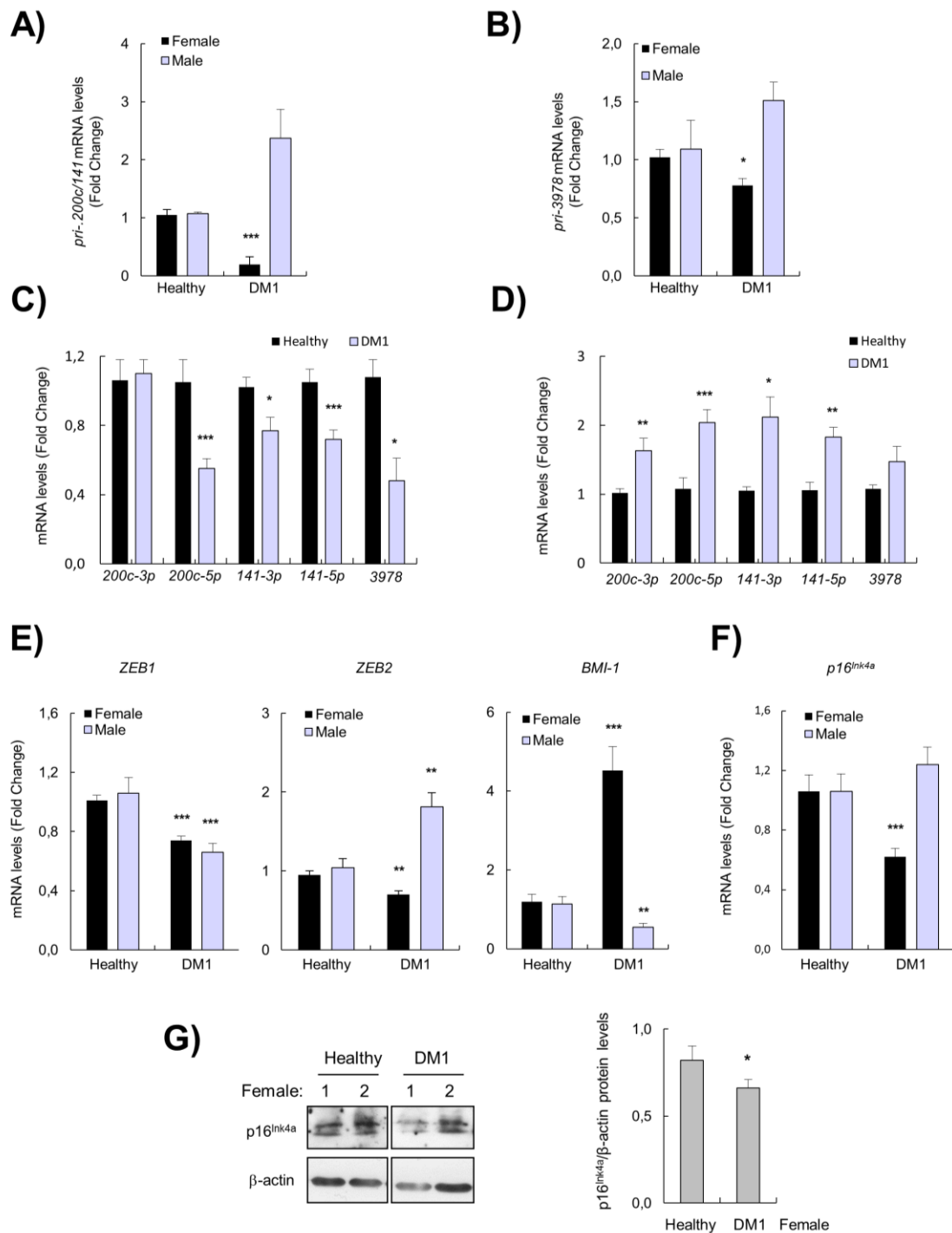
The miR-200c/miR-144 and miR-3978 precursors were downregulated in the DM1 women group in the array and validated in the extended cohort (**Fig. 2A,B**). Strikingly, the mature forms miR-200c-5p, miR-141-3p, miR-141-5p and miR-3978 were downregulated on the cohort of DM1 women (**Fig. 2C**). On the contrary, the expression was slightly elevated in men revealing a sex differential expression of those miRs in DM1 (**Fig 2C,D**).

As *BMI1* and *ZEB* family member oncogenes are reported as miR-200 target genes (17-22), we measured their expression finding that ZEB1 and ZEB2 were decreased whilst BMI1 levels were upregulated in the female group of DM1 patients (**Fig. 2E**). Moreover, the expression of p16<sup>Ink4a</sup> tumor suppressor, a known target of BMI1 epigenetic silencing, was lower at both mRNA and protein level in the same group of DM1 females (**Fig. 2F,G**).



**Figure 1. Sex-dependent mRNA expression pattern in DM1 patients.**

**A)** Dendrogram explaining the gender differences between the expression patterns. **B)** Heatmap with the genes differentially expressed between DM1 patients (n=10) and healthy controls (n=10) in females (left, n=5) and males (right, n=5). **C)** Chart of the validation data (fold change from arrays versus fold change from RT-qPCR) in females (red) and males (blue). **D)** mRNA levels of genes altered in male cohort (n=16) in comparison with healthy controls (n=5). **E)** mRNA levels of genes altered in female cohort (n=25) in comparison with healthy controls (n=5).



**Figure 2. miR-200c/141 cluster and its targets in DM1 patients.**

**A,B)** mRNA expression of two miRNA precursor, *miR-200c/141* and *miR-3978*, which are downregulated in DM1 females (n=25) and upregulated in DM1 males (n=16). **C, D)** Mature forms of these miRNAs are downregulated in DM1 females (left, n=25) and upregulated in DM1 males (right, n=16). **E)** In these group of patients *ZEB1* is downregulated in both sexes, while *ZEB2* only in DM1 females. On the contrary, *BMI1* is upregulated in DM1 females and downregulated in DM1 males. **F)** *p16<sup>INK4A</sup>* expression is decreased in DM1 females (n=25). **G)** Representative Immunoblots and quantification of p16<sup>INK4A</sup> derived from two different blood samples of healthy controls and DM1 females (n=4).

## DISCUSSION

There is recent accumulating evidence that patients with DM1 are at high risk of developing cancers. Confirming these findings in an independent study and in different DM population is important for patient clinical management. Using data from a large molecularly confirmed cohort of DM1 patients, we showed a statistically significant excess risk of endometrium, ovary, thyroid, and brain cancer. In the largest epidemiological cohort published so far accounting more than 1600 myotonic dystrophy 1 and 2 patients, Gadalla et al., found a clear high risk for cancers of the endometrium, brain, ovary and colon, and possibly thyroid and choroidal melanoma and non-melanoma skin (7). In smaller studies, Win et al. reported a higher risk (8) for developing thyroid cancer and choroidal melanoma whereas Mohamed et al. (9) concluded that there was a high risk for thymoma, gynecologic and lung cancer. Recently in a small published cohort, Bianchi et al (10) found that skin, thyroid, ovary and breast cancers were most frequent in DM patients.

Our results are coincidental with that reported by Gadalla et al. in a population-based study of more than 1600 DM patients (7) with the exception of colorectal cancer. However, the CI (0.94-3.92) of this type of cancer was near to significance values and the smaller sample size in our cohort could explain this result. Interestingly, colorectal cancer was also the most frequent among those patients that had two or more cancers. The excess risks of thyroid (8,10), endometrium and ovary (9,10) were also found in smaller studies. Of importance, as have been also pointed out by Gadalla et al (4,7), we did not find an overrepresentation of screening-related cancers (i.e. breast and prostate), strongly suggesting that the results are genuine and not biased by the close medical surveillance in DM patients. The fact that there are no incidence and mortality cancer differences between the Basques and other regions in Spain (23), lead us to discard that the excess of cancer in this population could be explained due to other

genetic factors rather than the DM1 condition itself.

Our data shows that malignancies developed at a mean age of  $46.6 \pm 14.7$  years. In agreement with previous reports (3,24) cancers represented the third leading cause of death after respiratory and circulatory diseases in our DM1 population. A progressive increase in cumulative incidence of cancer mortality has been previously reported (2% by age 50 to 6% by age 70) (4).

Other striking feature is the apparent absence of a correlation between cancer risk and nucleotide repeat length. This result could be potentially biased by methodological reasons because CTG repeat expansion size was measured years before cancer emergence and also because of the somatic instability that characterizes DM1. Based on the differences found between tumoral and healthy tissues in DM1 patients, some authors have suggested that there might be an underlying independent mechanism of somatic instability in the tumoral tissue (25-27). However, the later contrast with the recent finding that MBLN1, a splicing factor sequestered in the nuclear foci of DM1 cells which correlates with CTG expansion size, could be implicated in the physiopathology of the progression of certain cancers (28).

Our results showing a differential transcriptional profiling of several genes previously linked to cancer such as PDK4 (29), DAPK1 (30), Caspase 5 (31) or PLA2G7 (32) genes in DM1 patients compared to healthy controls, open the door to a mechanistic explanation of this increased oncogenic risk in DM1. In addition, we observed a downregulation of miR-200c, miR-141 and miR-3978 mature and precursor forms in DM1 female patients. Of note, two of them, miR-200c and miR-141, belong to the same miR-200 tumor suppressor cluster. Lower levels of the miR-200c family members were detected in tumor tissues, and blood-derived samples in a wide range of cancer types (33). This decline was associated with tumor progression and poor prognosis including metastasis (34,35).



miR-200 family has several well described oncogenes as downstream targets likely ZEB family and the polycomb group gene BMI1 becoming crucial targets (18-21,36). Our results show that these genes are altered in both sexes of DM1 patients supporting the relevance of this molecular signaling on the disease. In particular, DM1 women patients express elevated BMI1 levels, whilst ZEB1 and 2 are decreased. The existence of such alterations in patients with severe disease and no cancer prompted us to hypothesize that the downregulation of miR-200 cluster members play a role in cancer susceptibility and consequent upregulation of BMI1 instead of through ZEB may be required for its development. In support of this idea (i) ZEB factors are EMT inducers and their role has been associated to metastasis rather than tumor formation; (ii) The expression of p16<sup>Ink4a</sup> tumor suppressor, a critical target of BMI1, inversely correlates with BMI1 levels in DM1 patients; (iii) The role of miR-200 and BMI1 in the maintenance of adult stem cells and tumor initiating cells in many organs. Of note that many of the cancers detected in DM1 patients emerge in tissues with a high rate of cellular replications.

Taken together, our findings support a model through a coordinated action between the miR-200 expression and its downstream targets ZEB1/2 and BMI1. In support of this notion there is a close functional link between miR-200 family and ZEB factors and BMI1 in a double-negative feedback loop respectively. Thus, the activation of one of them affects the expression and activity of the others (37,38).

Our study strength includes the population-based design (all DM1 patients in the Gipuzkoa population were included), and therefore no selection bias exists. We are limited by the lack of information of known cancer risk factors such as smoking, diet, lifestyle, environmental influences or alcohol intake among others. DM1 patients have more obesity and the prevalence of tobacco smoking is higher than in general population (39) so these risk factors might have played a confounder role in our results and should be taken into account when planning longitudinal studies. However, a recent study suggested that lifestyle factors in DM1 patients do not

explain the observed excess risk of cancers (10).

We believe that our study provides independent cancer site-specific confirmation of recently-reported excess cancer risks as part of the DM1 phenotype, especially for women, and suggests that this association could be more related to a transcriptomic regulation of oncogenic pathways than a direct consequence of the DM genomic signature.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Study population**

Data from patients were retrospectively obtained from the medical records of the Gipuzkoa historical myotonic dystrophy cohort, established in 1985. We identified 503 patients with molecularly confirmed DM diagnosis between 1985 and 2013. We excluded 4 patients with DM2 diagnosis and 75 DM1 patients due to the lack of data or lost to follow-up.

From patients medical records we extracted the following information: sex, age at the time of the study enrollment and age of death, nucleotide expansion size (CTG triplets), calendar year of diagnosis, disease severity assessed using the Muscular Impairment Rating Scale (MIRS) scale (12) at the time of the last visit, age and calendar year of cancer diagnosis and cancer anatomic site. Diagnoses of all types of malignant neoplasia were coded using the International Classification of Diseases (ICD) Revision 9. Death causes were coded regarding ICD-10 (2014 version) (13).

### **Genetic analysis**

CTG repeat was measured at the time of DM1 diagnosis by conventional PCR and Southern Blot. Conventional PCR was performed with 100 ng of genomic DNA

using gene specific primers flanking the *DMPK* CTG repeat. All normal homozygotes and expanded alleles were confirmed with Southern Blot. We included patients with 40 CTG repeats or more due to the demonstrated instability of the fragment size from this threshold, independently of the presence or absence of clinical manifestations assuming that if we eliminate the cases considered as premutations, we neglect a possible impact of genomic condition over cancer prone.

### **Statistical Analysis**

Follow-up started at date of DM1 diagnosis and ended at date of first cancer diagnosis, death, or last visit. We calculated standardized incidence ratios (SIRs) by dividing the observed numbers of cancer by the expected for all cancers combined and cancer-specific anatomic sites, overall and stratified by sex. Expected numbers were calculated by multiplying the age- and sex- specific incidence rate from the Basque population cancer registry (14) to the person-years of the study cohort. SIRs were obtained for all types of cancers except for basal cell carcinoma of the skin because this type of cancer is not collected in the registry. Confidence intervals were calculated using the Poisson distribution.

Mean repeat length was compared for patients with and without cancer using Student t-test. All tests were considered statistically significant if  $p < 0.05$ . Statistical analysis was performed using STATA-SE 12 (StataCorp LP, College Station, TX).

Data are presented as mean values  $\pm$  S.E.M., with the number of experiments (n) in parentheses. Unless otherwise indicated, statistical significance (p-values) was calculated using the Student's t -test. Asterisks (\*, \*\*, and \*\*\*) indicate statistical significance ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.001$ , respectively).

### **Transcriptomic analysis**

This analysis included 10 DM1 patients (5 women, 5 men; mean age: 43.4  $\pm$  5.16 years; expansion size: 750  $\pm$  306 CTG triplets) who had moderate and

severe clinical manifestations (MIRS median= 3, range 3-5) and no malignancy prior or at time of blood collection and 10 age and sex-matched healthy controls. We extracted RNA from Peripheral blood mononuclear cells using the LeucoLOCK™ Total RNA Isolation System (Life Technologies, Carlsbad, California, USA). For the RNA extraction, we use a two-step protocol, first with the miRNesay Mini Kit followed by automated RNA extraction in the QIAcube. Large scale gene expression was measured by the Human Gene 1.0 ST Affymetrix microarray (Affymetrix, Santa Clara, California, USA). RNA integrity was checked with Agilent RNA 6000 Nano kit. Those samples with an RNA Integrity Value (RIN) above 7 were accepted to be processed. 300 ng of total RNA were used for microarray analysis following the manufacturer's instructions.

We analyzed gene expression differences in DM1 patients and healthy controls and in a second step; we studied the differences between DM1 patients by sex. Results of the microarray data were extended by RT-PCR in additional DM1 male (n=16) and female (n=25) subset of patients.

### **Western Blot analysis**

We performed a Western Blot of the protein products of the targets altered in the transcriptomic analysis. Immunoblots were performed as previously reported (15). We used ab16123 (Abcam) for p16<sup>Ink4a</sup> detection and A-5441 (Sigma) for  $\beta$ -actin and HRP-linked anti-rabbit or anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology) secondary antibody at a 1:2000 dilution. Detection was accomplished by chemiluminescence using NOVEX ECL Chemi Substrate (ThermoFisher).

### **Standard protocol approvals, registrations and patient consents**

This study was approved by the Donostia University Hospital Ethical Board and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki ethical standards.

## **ACKNOWLEDGEMENTS AND FUNDING**

We thank S Gadalla (NIH) for reviewing this manuscript and for her helpful suggestions, L. Manterola for miRNA analysis and all of the myotonic dystrophy patients. RF-T was recipient of a Rio Hortega from the Instituto de Salud Carlos III. AM was granted with an Ikerbasque Research Fellow position. MG-P was recipient of a predoctoral fellowship from UPV/EHU (PIF 15/245). This work was supported by CIBERNED, and grants from Isabel Gemio Foundation, Diputacion Gipuzkoa (OF30/2014), Ministry of Economy and Competition and FEDER Funds to AL-M (FIS PS 09-00660 and PI147436) and AM (PI13/02277), and European Union (Marie Curie CIG 2012/712404).

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

RF-T; MD. had the original idea, collected clinical data from the patients, evaluated the patients, did the clinical and statistical analysis and wrote the manuscript. MG-; BSc did the transcriptomic analysis and wrote the manuscript. JI-E; MD., PhD, did the statistical analysis, reviewed the Ethics and wrote the manuscript. AMC; BSc, PhD, did the molecular analysis and improved the manuscript. MZ; BSc, collected clinical and molecular data, did the transcriptomic analysis and improved the manuscript. JJP, JBE and MM; MD. collected clinical data, evaluated the patients and improved the manuscript. IR; MD., did the anatomopathologic analysis and improved the manuscript. LM; BSc, PhD, did the molecular analysis and improved the manuscript. DO; BSc, PhD, did the transcriptomic analysis and improved the manuscript. AM; BSc, PhD, had the original idea, did the transcriptomic analysis and wrote the manuscript. AL-M; MD., PhD, had the original idea, collected clinical data from the patients, followed and evaluated them, did the clinical analysis and wrote the manuscript.

## REFERENCES

1. Udd B, Krahe R. The myotonic dystrophies: molecular, clinical, and therapeutic challenges. *Lancet Neurol.* 2012;11:891–905.
2. López de Munain A, Blanco A, Emparanza JI, Poza JJ, Martí Massó JF, Cobo A, et al. Prevalence of myotonic dystrophy in Guipúzcoa (Basque Country, Spain). *Neurology.* 1993;43:1573–1576.
3. Mathieu J, Allard P, Potvin L, Prévost C, Bégin P. A 10-year study of mortality in a cohort of patients with myotonic dystrophy. *Neurology.* 1999;52:1658–1662.
4. Gadalla SM, Pfeiffer RM, Kristinsson SY, Björkholm M, Hilbert JE, Moxley RT, et al. Quantifying cancer absolute risk and cancer mortality in the presence of competing events after a myotonic dystrophy diagnosis. *PLoS One.* 2013;8:e79851.
5. Cantwell AR, Reed WB. Myotonia atrophica and multiple calcifying epithelioma of Malherbe. *Acta Derm Venereol.* 1965;45:387–390.
6. Mueller CM, Hilbert JE, Martens W, Thornton CA, Moxley RT, Greene MH. Hypothesis: neoplasms in myotonic dystrophy. *Cancer Causes Control CCC.* 2009;20:2009–2020.
7. Gadalla SM, Lund M, Pfeiffer RM, Gørtz S, Mueller CM, Moxley RT, et al. Cancer risk among patients with myotonic muscular dystrophy. *JAMA.* 2011;306:2480–2486.
8. Win AK, Perattur PG, Pulido JS, Pulido CM, Lindor NM. Increased cancer risks in myotonic dystrophy. *Mayo Clin Proc.* 2012;87:130–135.
9. Mohamed S, Pruna L, Kaminsky P. [Increasing risk of tumors in myotonic dystrophy type 1]. *Presse Médicale Paris Fr* 1983. 2013;42:e281–284.
10. Bianchi MLE, Leoncini E, Masciullo M, Modoni A, Gadalla SM, Massa R, et al. Increased risk of tumor in DM1 is not related to exposure to common lifestyle risk factors. *J Neurol.* 2016; 263(3):492–498.
11. Das M, Moxley RT, Hilbert JE, Martens WB, Letren L, Greene MH, et al. Correlates of tumor development in patients with myotonic dystrophy. *J Neurol.* 2012;259:2161–2166.
12. Mathieu J, Boivin H, Meunier D, Gaudreault M, Bégin P. Assessment of a disease-specific muscular impairment rating scale in myotonic dystrophy. *Neurology.* 2001;56:336–340.
13. ICD-10 Version:2014 [Internet]. [cited 2015 Nov 25]. Available from: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2014/en>
14. CANCER IN THE BASQUE COUNTRY - cancer\_en.pdf [Internet]. [cited 2015 Nov 25]. Available from: [http://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/estado\\_salud/es\\_5463/adjuntos/cancer\\_en.pdf](http://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/estado_salud/es_5463/adjuntos/cancer_en.pdf) (accessed on 14/04/2016)
15. Garros-Regulez L, Aldaz P, Arrizabalaga O, Moncho-Amor V, Carrasco-Garcia E, Manterola L, Moreno-Cugnon L, Barrera C, Villanua J, Ruiz I, Pollard S, Lovell-Badge R, Sampron N, Garcia I, Matheu A. mTOR inhibition decreases SOX2-SOX9 mediated glioma stem cell activity and temozolomide resistance. *Expert Opin Ther Targets.* 2016 Apr;20(4):393–405.
16. Jansen R, Batista S, Brooks AI, Tischfield JA, Willemsen G, van Grootheest G, et al. Sex differences in the human peripheral blood transcriptome. *BMC Genomics.* 2014;15:33.
17. Park S-M, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev.* 2008;22:894–907.
18. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol.* 2008;10:593–601.
19. Christoffersen NR, Silahatoglu A, Orom UA, Kauppinen S, Lund AH. miR-200b mediates post-transcriptional repression of ZFH1B. *RNA N Y N.* 2007;13:1172–1178.
20. Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep.* 2008;9:582–589.

21. Hurteau GJ, Carlson JA, Roos E, Brock GJ. Stable expression of miR-200c alone is sufficient to regulate TCF8 (ZEB1) and restore E-cadherin expression. *Cell Cycle Georget Tex.* 2009;8:2064–2069.
22. Gibbons DL, Lin W, Creighton CJ, Rizvi ZH, Gregory PA, Goodall GJ, et al. Contextual extracellular cues promote tumor cell EMT and metastasis by regulating miR-200 family expression. *Genes Dev.* 2009;23:2140–2151.
23. López-Abente G, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Pollán M, García-Pérez J, Ramis R, et al. Time trends in municipal distribution patterns of cancer mortality in Spain. *BMC Cancer.* 2014;14:535.
24. de Die-Smulders CE, Höweler CJ, Thijs C, Mirandolle JF, Anten HB, Smeets HJ, et al. Age and causes of death in adult-onset myotonic dystrophy. *Brain J Neurol.* 1998;121 ( Pt 8):1557–1563.
25. Kinoshita M, Igarashi A, Komori T, Tamura H, Hayashi M, Kinoshita K, et al. Differences in CTG triplet repeat expansions in an ovarian cancer and cyst from a patient with myotonic dystrophy. *Muscle Nerve.* 1997;20:622–624.
26. Osanai R, Kinoshita M, Hirose K, Homma T, Kawabata I. CTG triplet repeat expansion in a laryngeal carcinoma from a patient with myotonic dystrophy. *Muscle Nerve.* 2000;23:804–806.
27. Kinoshita M, Osanai R, Kikkawa M, Adachi A, Ohtake T, Komori T, et al. A patient with myotonic dystrophy type 1 (DM 1) accompanied by laryngeal and renal cell carcinomas had a small CTG triplet repeat expansion but no somatic instability in normal tissues. *Intern Med Tokyo Jpn.* 2002;41:312–318.
28. Fish L, Pencheva N, Goodarzi H, Tran H, Yoshida M, Tavazoie SF. Muscleblind-like 1 suppresses breast cancer metastatic colonization and stabilizes metastasis suppressor transcripts. *Genes Dev.* 2016;30:386–398.
29. Liu Z, Chen X, Wang Y, Peng H, Wang Y, Jing Y, et al. PDK4 protein promotes tumorigenesis through activation of cAMP-response element-binding protein (CREB)-Ras homolog enriched in brain (RHEB)-mTORC1 signaling cascade. *J Biol Chem.* 2014;289:29739–29749.
30. Xuan F, Huang M, Liu W, Ding H, Yang L, Cui H. Homeobox C9 suppresses Beclin1-mediated autophagy in glioblastoma by directly inhibiting the transcription of death-associated protein kinase 1. *Neuro-Oncol.* 2015; pii: nov281. [Epub ahead of print]
31. Hosomi Y, Gemma A, Hosoya Y, Nara M, Okano T, Takenaka K, et al. Somatic mutation of the Caspase-5 gene in human lung cancer. *Int J Mol Med.* 2003;12:443–446.
32. Vainio P, Lehtinen L, Mirtti T, Hilvo M, Seppänen-Laakso T, Virtanen J, et al. Phospholipase PLA2G7, associated with aggressive prostate cancer, promotes prostate cancer cell migration and invasion and is inhibited by statins. *Oncotarget.* 2011;2:1176–1190.
33. Feng X, Wang Z, Fillmore R, Xi Y. MiR-200, a new star miRNA in human cancer. *Cancer Lett.* 2014;344:166–173.
34. Brabletz S, Brabletz T. The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep.* 2010;11:670–677.
35. Braun J, Hoang-Vu C, Dralle H, Hüttelmaier S. Downregulation of microRNAs directs the EMT and invasive potential of anaplastic thyroid carcinomas. *Oncogene.* 2010;29:4237–4244.
36. Roybal JD, Zang Y, Ahn Y-H, Yang Y, Gibbons DL, Baird BN, et al. miR-200 Inhibits lung adenocarcinoma cell invasion and metastasis by targeting Flt1/VEGFR1. *Mol Cancer Res MCR.* 2011;9:25–35.
37. Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol.* 2009;11:1487–1495.
38. Martínez-Fernández M, Dueñas M, Feber A, Segovia C, García-Escudero R, Rubio C, et al. A Polycomb-mir200 loop regulates clinical outcome in bladder cancer. *Oncotarget.* 2015;6:42258–42265.

## SUPPLEMENTARY MATERIALS

Table e-1. Causes of death in DM1 patients regarding ICD-10.

Causes of death	n (%)
<b>Certain infectious and parasitic diseases (A00-B99)</b>	<b>4 (2.9%)</b>
A 41 Sepsis	3
B 20 HIV	1
<b>Neoplasms (C00-D48)</b>	<b>21(15.3%)</b>
<b>Diseases of the nervous system (G00-G99)</b>	<b>1(0.7%)</b>
G 61 Guillain-Barré síndrome	1
<b>Mental and Behavioral disorders (F00-F99)</b>	<b>1(0.7%)</b>
F 00 Dementia in Alzheimer's disease	1
<b>Diseases of the circulatory system (I00-I99)</b>	<b>33 (24.1%)</b>
I 21 Acute myocardial infarction	1
I 26 Pulmonary embolism	3
I 46 Cardiac arrest	6
I 47 Paroxysmal tachycardia	3
I 50 Heart failure	15
I 61 Intracerebral haemorrhage	1
I 62 Subdural hematoma	1
I 63 Cerebral infarction	3
<b>Diseases of the respiratory system (J00-J99)</b>	<b>52 (37.9%)</b>
J 15 Bacterial pneumonia, not elsewhere classified	11
J 69 Pneumonitis due to food and vomit	14
J 96 Respiratory failure	27
<b>Diseases of the digestive system (K00-K93)</b>	<b>2 (1.4%)</b>
K 23 Duodenal ulcer with acute hemorrhagic complication	1
K 56 Paralytic ileus and intestinal obstruction without hernia	1
<b>Injury, poisoning and certain other consequences of external causes (S00-T98)</b>	<b>1(0.7%)</b>
T 17.9 Foreign body in respiratory track	1
<b>External causes of morbidity and mortality (V01-Y98)</b>	<b>1(0.7%)</b>
V01-V99 Transport accidents	1
<b>Unknown</b>	<b>21 (15.3%)</b>
<b>Total</b>	<b>137</b>



**Table e-2.** Location and cancer histological subtypes.

Cancer location site	Sex		Total
	Female	Male	
<b>Digestive Organs and Peritoneum</b>			<b>17</b>
Colon adenocarcinoma	4	5	9
Rectum adenocarcinoma	2	1	3
Stomach adenocarcinoma	1	2	3
Liver hepatocarcinoma	0	2	2
<b>Genitourinary Organs</b>			<b>15</b>
Uterus adenocarcinoma	5	0	5
Kidney white cells	2	1	3
Ovary	3	0	3
Prostate adenocarcinoma	0	2	2
Seminoma	0	1	1
Bladder	0	1	1
<b>Bone, Connective tissue, skin</b>			<b>10</b>
Basocelular skin cancer	6	2	8
Melanoma	1	0	1
Maxilar carcinoma	0	1	1
<b>Thyroid</b>			<b>8</b>
Papillar	3	2	5
Anaplastic	0	2	2
Follicular	1	0	1
<b>Lung</b>			<b>4</b>
Non small cell	0	3	3
Small cell	0	1	1
<b>Breast</b>	4	0	<b>4</b>
<b>Brain and nervous system</b>			<b>5</b>
Glioblastoma multiforme	2	0	2
Anaplastic astrocytoma	1	1	2
Schwanoma	1	0	1
<b>Other endocrine glands and related structures</b>			<b>4</b>
Multiple endocrine neoplasia	1	0	1
Carcinoid tumor	0	1	1
Hypophysis macroadenoma	0	1	1
Pheochromocytoma	1	0	1
<b>Lymphatic and Hematopoietic tissue</b>			<b>3</b>
Non Hodking lymphoma	0	2	2
Chronic lymphoid leukemia	0	1	1
<b>Total</b>			<b>70</b>

**Table e-3.** List of cancer location and subtypes of those patients with more than one cancer.

Sex	CTG expansion size	1st cancer type and location	Age when first cancer	2nd cancer type and location	Age when second cancer	3rd cancer type and location	Age when third cancer
Female	1333	Papilar thyroid cancer	43	Renal white cells	50		
Female	1500	Papilar thyroid cancer	40	Colon adenocarcinoma	51		
Male	97	Melanoma	52	Basoceular skin cancer	61	Thyroid anaplastic	62
Male	80	Renal white cells	67	Colon adenocarcinoma	69		
Male	80	Papilar thyoid	50	Colon adenocarcinoma	51		
Female	80	Colon adenocarcinoma	51	Breast carcinoma	57		
Female	1833	Uterus adenocarcinoma	53	Stomach adenocarcinoma	59		





## ***RESULTADOS: CAPÍTULO 2***

---



# CAPÍTULO 2

## **Leukocyte telomere length in patients with myotonic dystrophy type I: a pilot study**

Artículo publicado en

Annals of Clinical and Translational Neurology

Factor de Impacto 4.65 - Cuartil 1

Wang Y, Best A, Fernández-Torrón R, Alsaggaf R, **García-Puga M**, Dagnall CL, Hicks B, Thompson M, Matheu A, Zulaica M, Greene MH, López de Munain A, Gadalla SM. **Leukocyte telomere length in patients with myotonic dystrophy type I: a pilot study**. Ann Clin Transl Neurol. 2020 Jan;7(1):126-131. doi: 10.1002/acn3.50954. Epub 2019 Dec 5.

Submitted: 16 October 2019. Accepted: 31 October 2019. Published: 7 December 2019.





## **Leukocyte telomere length in patients with myotonic dystrophy type I: a pilot study**

Youjin Wang<sup>1</sup>, Ana Best<sup>2</sup>, Roberto Fernández-Torrón<sup>3,4</sup>, Rotana Alsaggaf<sup>1</sup>, **Mikel García-Puga**<sup>4</sup>, Casey L. Dagnall<sup>5,6</sup>, Belynda Hicks<sup>5,6</sup>, Mone't Thompson<sup>1</sup>, Ander Matheu<sup>7</sup>, Miren Zulaica<sup>3,4</sup>, Mark H. Greene<sup>1</sup>, Adolfo López de Munain<sup>3,4,8,9</sup> and  
Shahinaz M. Gadalla<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinical Genetics Branch, Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland.

<sup>2</sup>Biostatistics Branch, Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland.

<sup>3</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, Institute Carlos III, Madrid, Spain.

<sup>4</sup>Neuroscience Area, Institute Biodonostia, San Sebastian, Spain.

<sup>5</sup>Cancer Genomics Research Laboratory, Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland.

<sup>6</sup>Cancer Genomics Research Laboratory, Leidos Biomedical Research, Inc., Frederick National Laboratory for Cancer Research, Frederick, Maryland.

<sup>7</sup>Oncology Area, Biodonostia Health Research Institute, San Sebastián, Spain.

<sup>8</sup>Department of Neurology, Hospital Universitario Donostia, San Sebastian, Spain.

<sup>9</sup>Department of Neurosciences, Universidad del País Vasco UPV-EHU, San Sebastian, Spain.

Corresponding author:

**Shahinaz M. Gadalla**

Clinical Genetics Branch

Division of Cancer Epidemiology and Genetics

National Cancer Institute, NIH

9609 Medical Center Drive, Room 6E-534

Rockville, MD 20850

Tel: (240) 276-7254; Fax: (240) 276-7836

E-mail: gadallas@mail.nih.gov

## RESUMEN

En este trabajo analizamos la longitud telomérica relativa (RTL) en 361 pacientes de la cohorte de pacientes con DM1 de Guipúzcoa y en 223 controles sanos que poseían un grado de parentesco con los pacientes DM1. Aunque no encontramos diferencias en la RTL entre controles y pacientes DM1, sí encontramos un acortamiento acelerado con el tiempo en la RTL en DM1, tanto en la cohorte de descubrimiento (cambio de  $-0.013$  en pacientes con DM1 vs.  $-0.005$  en controles sanos,  $P = 0.04$ ), como en la cohorte de validación (cambio de  $-0.005$  en pacientes con DM1 vs.  $-0.002$ , en controles sanos  $P = 0.33$ ).

Nuestros resultados sugieren que el acortamiento telomérico no juega un papel directo en la etiología de la DM1, pero puede ser una consecuencia de alteraciones moleculares que se dan con el tiempo en pacientes con DM1.

## CONTRIBUCIÓN

Mi contribución en este trabajo ha sido la preparación del ADN de la cohorte de pacientes con DM1 y de los controles sanos, además de la correlación entre los datos clínicos (expansión CTG, escala MIRS, edad y sexo) con la RTL.

**ABSTRACT**

Myotonic dystrophy type I (DM1) is an autosomal dominant disease of which clinical manifestations resemble premature aging. We evaluated the contribution of telomere length in pathogenesis in 361 DM1 patients (12 with serial measurements) and 223 unaffected relative controls using qPCR assay. While no differences in baseline leukocyte relative telomere length (RTL) was noted, the data suggested an accelerated RTL attrition in DM1 (discovery cohort: T/S change/year =  $-0.013$  in DM1 vs.  $-0.005$  in controls,  $P = 0.04$ ); similar trend was noted in validation cohort. Further investigations are needed to examine the role of TL in the pathophysiology of DM1.

## INTRODUCTION

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is an autosomal dominant multisystem disorder resulting from an unstable trinucleotide (CTG)<sub>n</sub> repeat expansion in the 3' untranslated region of the dystrophia myotonica-protein kinase (DMPK) gene<sup>1</sup>. Clinical manifestations of DM1 include progressive muscle weakness and wasting, myotonia, premature cataracts, cardiac conduction defects, gastrointestinal/endocrine abnormalities, and increased risk of certain cancers<sup>2,3</sup>. It has been suggested that the DM1 phenotypes may resemble a premature aging syndrome<sup>4</sup>.

Telomeres are tandem hexanucleotide (TTAGGG)<sub>n</sub> repeats and protein complexes at the end of chromosomes, maintaining genomic stability<sup>5</sup>. They shorten with each cell division<sup>6</sup> and are marker of cellular aging. Few studies suggested a link for telomere length in the pathogenesis of Duchenne (DMD) or limb girdle muscular dystrophies<sup>7,8</sup>. Telomere length studies in DM1 were limited; an in vitro investigation using DM1 muscle precursor cells from three fetuses with congenital DM1 showed abnormal accumulation of p16<sup>INK4a</sup> and higher telomere attrition per cell division compared with controls<sup>9</sup>.

Here we compared leukocyte relative telomere length (RTL) in a large cohort of genetically-confirmed DM1 patients and DM1 mutation-free clinically healthy relative controls and evaluated telomere length attrition overtime in a subset of patients with serial blood samples.

## RESULTS

### Characteristics of study participants

DM1 patients and controls showed similar ages (median age = 42.0 and 43.0 years in DM1 vs. controls, respectively) and sex distributions (proportion of males = 45.7% and 43.9% in DM1 vs. controls, respectively). No age or sex differences were noted between DM1 patients in the two study subsets, or between patients and relatives in each set ( $P > 0.05$ ). Patients with DM1 in the discovery and validation cohorts also had similar CTG repeat size (median repeat size = 433 and 500 for discovery vs. validation cohorts, respectively,  $P = 0.37$ ) (**Table S1**).

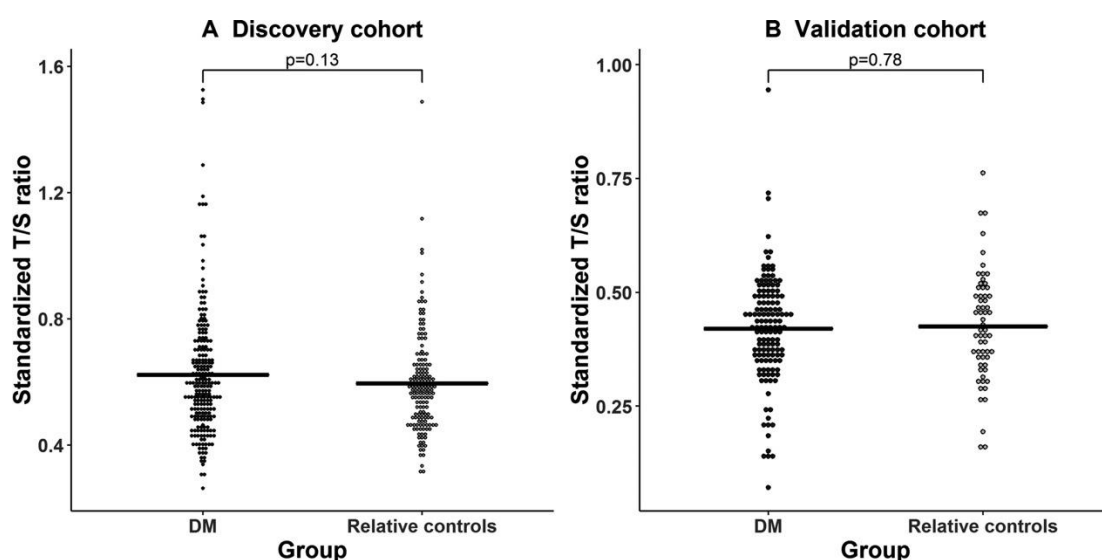
In DM1 patients, the size of CTG repeat was inversely correlated with age at genetic testing in both discovery ( $r = -0.26$ ,  $P = 0.0003$ ) and validation cohorts ( $r = -0.21$ ,  $P = 0.02$ ) (**Fig. S1A-B**).

The patients with a second blood sample showed similar age, and sex distribution. However, despite of lack of statistical significance, the data suggested that patients with subsequent sample may have a less severe disease as evident by shorter CTG repeat sizes (median = 167 vs. 500, in those with and without subsequent sample, respectively) and less Muscular Impairment Rating Scale (MIRS) (0% vs. 24% with  $MRIS > 3$ , respectively) (**Table S2**).

### Telomere length in DM1 patients and controls

RTL was inversely correlated with age among both DM1 patients and controls (discovery cohort:  $r = -0.39$ ,  $P < 0.0001$  for DM1 and  $r = -0.51$ ,  $P < 0.0001$  for controls; validation cohort:  $r = -0.27$ ,  $P = 0.002$  for DM1 and  $r = -0.23$ ,  $P = 0.07$  for controls; **Fig. S2A-B**).

No differences were observed in RTL between DM1 patients and controls at baseline: discovery cohort: (mean T/S  $\pm$  SD) =  $0.62 \pm 0.20$  and  $0.60 \pm 0.16$  for DM1 and controls, respectively,  $P = 0.13$ ; or in the validation cohort: (mean T/S  $\pm$  SD)= $0.42 \pm 0.12$  and  $0.43 \pm 0.12$ , respectively,  $P = 0.78$ , **Fig. 1A and B**). Age- and sex-adjustment did not alter the results. In DM1 patients, RTL was not associated with CTG repeat expansion size, nor with MIRS in models adjusted for age and sex (**Fig. 2A and B**).



**Figure 1.** Comparison of relative telomere length between DM1 patients and their healthy relative controls. (A) Discovery cohort and (B) Validation cohort.

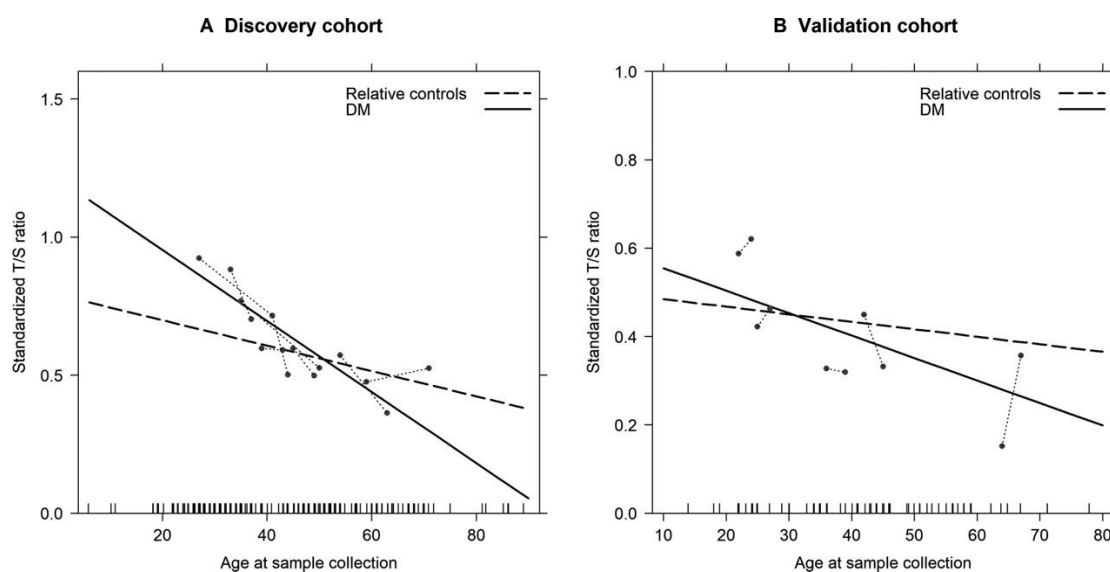


**Figure 2.** Relative telomere length in DM1 patients by CTG repeat size and by Muscular Impairment Rating Scale (MIRS) in age- and sex-adjusted models. (A) CTG repeat size, (B) Muscular Impairment Rating Scale.

## Telomere length attrition overtime in patients with DM1

Baseline RTL was similar in patients with and without repeated RTL measurements (median T/S = 0.58 vs. 0.52,  $P = 0.27$ ).

In the repeated RTL measurement analyses, and when compared with expected based on RTL attrition from relatives' cross-sectional data, a more rapid RTL decline was noted in DM1 in the discovery cohort (T/S decline/year =  $-0.013$  vs.  $-0.005$  for DM1 and controls, respectively,  $P = 0.04$ ). A similar (non-significant) trend was noted in the validation cohort (T/S decline/year =  $-0.005$  vs.  $-0.002$ ,  $P = 0.33$ ) (**Fig. 3A and B, Table S3**).



**Figure 3.** Comparison of annual relative telomere length attrition between DM1 patients and their healthy relative controls. (A) Discovery cohort, (B) Validation cohort.

## DISCUSSION

In this analysis of a large cohort of patients with genetically confirmed DM1 and clinically healthy relative controls, we observed no difference in leukocyte RTL measured at genetic testing between patients and controls, yet, a higher rate of annual telomere length attrition was noted in DM1 patients.

Prior DM1 telomere length studies have been limited to few small in-vitro investigations focusing on its possible role in muscle precursor cell dysfunction. In agreement with our results of similar leukocyte RTL in DM1 and controls, a study comparing telomere length in distal (with clinical and pathological alterations) and proximal muscles (relatively spared) from four DM1 patients showed no telomere length difference<sup>14</sup>. Yet, we showed a higher rate of RTL attrition overtime in DM1 patients than expected based on RTL attrition rate from controls. Our findings were also consistent with a study of muscle satellite cells in fetuses/infants with congenital DM1 which showed a faster telomeric DNA loss per cell division ( $171.9 \pm 17$  base pairs) when compared with control cells ( $108.1 \pm 10$  base pairs); the authors concluded that large CTG expansion repeats may interfere with telomere homeostasis in those patients<sup>9</sup>. Of note, we found no association between patients' leukocyte RTL and CTG repeat size; suggesting no direct role for repeat expansion size in the observed telomeric attrition. However, our data were limited by the unavailability of progenitor repeat size. Also, testing this hypothesis in blood cell (not known to be affected in DM1), may not be directly applicable to somatic changes in affected organs such as the muscles. Somatic mosaicism and instability in repeat expansion size are well-described in DM1<sup>15</sup>. It is possible that the accelerated telomere attrition observed in our DM1 patients is a consequence of the cellular exposure to oxidative stress. The triple-guanine sequence in telomeric DNA (TTAGGG)<sub>n</sub> is very sensitive to oxidative damage<sup>16</sup>, resulting in accelerated telomere shortening<sup>17</sup>. Previous studies have shown a significant increase in blood



level of free radicals and oxidative stress biomarkers in DM1 patients<sup>18,19</sup>, suggesting a role for oxidative stress in disease progression.

The observed differences in the rate of TL attrition between the discovery and validation cohort could be affected by the difference in the time interval between samples (median interval = 9 years in the discovery, and 3 years in the validation). It has been shown that TL elongation in longitudinal studies is mostly artifact related to measurement errors in studies with short follow-up ( $\leq 5$  years) where TL changes are usually small and hard to capture<sup>20</sup>.

Our study strengths include a relatively large sample size, the genetic diagnosis confirmation, the objectively healthy status of controls, and the availability of repeat expansion size. Limitations include the small sample size of patients with serial samples, who were not systematically sampled. Due to short time period between blood sampling, observed TL elongation in some patients could be artifactual<sup>20</sup>. Our control data were based on baseline measurement of RTL in relatives because of the unavailability of serial samples; a prior study has shown small differences in TL attrition rate calculated from cross-sectional or longitudinal data in the general population (24.6 vs. 31 bp per year).<sup>20</sup> The qPCR assay is sensitive to pre-analytic processing, notably DNA extraction method. Consequently, we presented our results stratified by DNA extraction method. Although similar trends were observed in the two datasets, we cannot rule out the possibility that the difference in DNA extraction methods and/or time between serial samples contributed to the observed difference in the rate of TL attrition between the two sets.

In conclusion, our results suggest that telomere shortening does not play a direct role in DM1 etiology but may be a consequence of molecular alterations over time, possibly secondary to oxidative stress. It is possible that accelerated telomere shortening may mediate the age-related phenotypic presentation of DM1.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study participants**

We used data and samples from 379 DM1 patients and 235 DM1-free relative controls from the Spanish Guipúzcoa historical myotonic dystrophy cohort<sup>10</sup>. Participants' demographics and clinical information were obtained through medical records review. We excluded 30 individuals (28 missing age, one twin, and one with failed quality control metrics for RTL assay). The final analysis included 361 DM1 patients and 223 controls. Twelve participants provided a second sample for RTL measurement, as convenience permitted.

The study was approved by the Donostia University Hospital Ethical Board and by the Office of Human Subjects Research Protections at the National Institutes of Health.

### **DNA extraction and telomere length measurement**

Blood DNA was extracted using the salting out procedure or Qiagen Flexigen DNA kit (QIAGEN, Germantown, MD). We measured RTL after adapting the originally published quantitative polymerase chain reaction (qPCR) method<sup>11</sup>. Method details are available elsewhere<sup>12</sup>. Briefly, qPCR assay measures a ratio between telomere repeats amplification (T) to that of an autosomal single-copy gene (S; *36B4*). The T/S ratio then get normalized using internal QC calibrator samples to yield a standardized T/S ratio. All samples were assayed in triplicate. The coefficient of variation for internal control samples was 4.5%.

### **Statistical analysis**

All analyses were stratified by DNA extraction method to account for known variable qPCR sensitivity to extraction method<sup>13</sup>. Samples extracted by salting out ( $N = 223$  patients and 162 controls) served as a discovery cohort, and those

extracted by Qiagen Flexigen DNA kit ( $N = 138$  patients and 61 controls) served as a validation cohort. RTL data from serial samples extracted by the same method were available for 12 DM patients ( $N = 7$  for discovery,  $N = 5$  for validation cohort).

We used generalized linear models to compare the mean RTL between DM1 and controls, and in DM1 patients by CTG repeat size categories (40–50, 51–249, 250–499,  $\geq 500$ ). A random intercept linear mixed model was used for repeated measurement analysis; RTL annual attrition rate in DM1 patients with repeated samples (median time between samples = 9 years, range = 4–17 years in the discovery, and median time = 3 years, range = 2–3 years in the validation) was compared with that expected from regression models of RTL and age using control cross-sectional data using R package 'lme4'. Differences in RTL attrition rates between DM1 patients and controls were assessed by an interaction term between DM1-control status and age. Statistical analyses were conducted using SAS version 9.4 and R version 3.4.4.

## REFERENCES

1. Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: Expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 1992; 68: 799– 808.
2. Gadalla SM, Lund M, Pfeiffer RM, et al. Cancer risk among patients with myotonic muscular dystrophy. *JAMA* 2011; 306(22): 2480– 2486.
3. Bird TD. Myotonic Dystrophy Type 1. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, editors., et al. GeneReviews((R)). Seattle (WA), 1993.
4. Meinke P, Hintze S, Limmer S, Schoser B. Myotonic Dystrophy-A Progeroid Disease? *Frontiers Neurol* 2018; 9: 601.
5. O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 171– 181.
6. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345: 458– 460.
7. Decary S, Hamida CB, Mouly V, et al. Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children. *Neuromuscul Disord* 2000; 10: 113– 120.
8. Chang AC, Ong SG, LaGory EL, et al. Telomere shortening and metabolic compromise underlie dystrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113: 13120– 13125.

## CAPÍTULO 2

9. Bigot A, Klein AF, Gasnier E, et al. Large CTG repeats trigger p16-dependent premature senescence in myotonic dystrophy type 1 muscle precursor cells. *Am J Pathol* 2009; 174: 1435– 1442.
10. Fernández-Torrón R, García-Puga M, Emparanza J-I, et al. Cancer risk in DM1 is sex-related and linked to miRNA-200/141 downregulation. *Neurology* 2016; 87: 1250– 1257.
11. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e47.
12. Gadalla SM, Wang T, Dagnall C, et al. Effect of recipient age and stem cell source on the association between donor telomere length and survival after allogeneic unrelated hematopoietic cell transplantation for severe aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016; 22: 2276– 2282.
13. Dagnall CL, Hicks B, Teshome K, et al. Effect of pre-analytic variables on the reproducibility of qPCR relative telomere length measurement. *PLoS ONE* 2017; 12:e0184098.
14. Thornell LE, Lindstom M, Renault V, et al. Satellite cell dysfunction contributes to the progressive muscle atrophy in myotonic dystrophy type 1. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2009; 35: 603– 613.
15. Ashizawa T, Dubel JR, Harati Y. Somatic instability of CTG repeat in myotonic dystrophy. *Neurology* 1993; 43: 2674– 2678.
16. Henle ES, Han Z, Tang N, et al. Sequence-specific DNA cleavage by Fe<sup>2+</sup>-mediated fenton reactions has possible biological implications. *J Biol Chem* 1999; 274: 962– 971.
17. von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 2002; 27: 339– 344.
18. Toscano A, Messina S, Campo GM, et al. Oxidative stress in myotonic dystrophy type 1. *Free Radical Res* 2005; 39: 771– 776.
19. Ihara Y, Mori A, Hayabara T, et al. Free radicals, lipid peroxides and antioxidants in blood of patients with myotonic dystrophy. *J Neurol* 1995; 242: 119– 122.
20. Chen W, Kimura M, Kim S, et al. Longitudinal versus cross-sectional evaluations of leukocyte telomere length dynamics: age-dependent telomere shortening is the rule. *J Gerontol Series A* 2011; 66A: 312– 319.

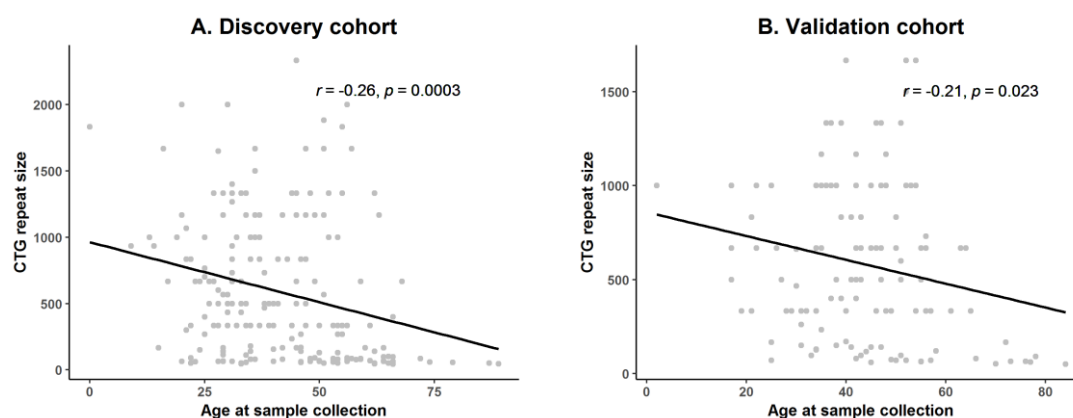
## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank the patients and their family members for their participation. The authors declare no conflict of interest.

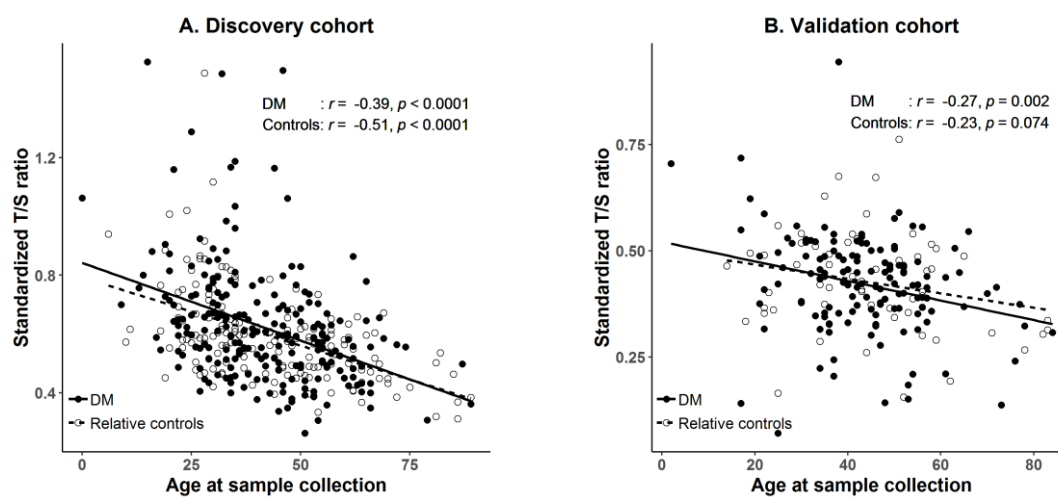
## **FUNDING INFORMATION**

The study was supported by the Intramural Research Program of the Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, National Institutes of Health.

## SUPPLEMENTARY MATERIALS



**Supplemental Figure 1.** Correlation between CTG repeat size and age in DM1 patients. A. Discovery cohort, B. Validation cohort.



**Supplemental Figure 2.** Correlation between relative telomere length and age. A. Discovery cohort, B. Validation cohort.

**Supplemental Table 1.** Baseline characteristics of DM1 patients and their unaffected relative controls, stratified by DNA extraction method.

Characteristics	Discovery cohort		Validation cohort	
	DM (n=223)	Relative controls (n=162)	DM (n=138)	Relative controls (n=61)
Age, median (range)	40 (0-89)	38.5 (6-89)	43.5 (2-84)	44 (14-83)
CTG repeat size, median (range) <sup>1</sup>	433 (43-2333)		500 (50-1667)	
Muscular Impairment Rating Scale <sup>2</sup>				
1	38 (33%)		25 (19%)	
2	25 (22%)		26 (20%)	
3	30 (26%)		46 (35%)	
4	22 (19%)		32 (24%)	
5	1 (1%)		2 (2%)	
Male, n (%)	98 (44%)	67 (41%)	67 (49%)	31 (51%)
Calendar year at sample collection, n (%)				
1989-2001	60 (27%)	54 (33%)	4 (3%)	0 (0%)
2002-2005	82 (37%)	48 (30%)	0 (0%)	0 (0%)
2006-2011	65 (29%)	53 (33%)	15 (11%)	13 (21%)
2012-2016	16 (7%)	7 (4%)	119 (86%)	48 (79%)

<sup>1</sup> CTG repeat size are unknown in 43 DM1 patients (discovery cohort n=26, validation cohort n=17).

<sup>2</sup> Muscular Impairment Rating Scale (MIRS) was unknown or not clearly defined in 114 DM1 patients (discovery cohort n=107, validation cohort n=7).

**Supplemental Table 2.** Comparison of baseline characteristics of DM1 patients with and without repeated relative telomere length measurement.

Characteristics	DM1 patients		p
	No subsequent sample (N=349)	With subsequent sample (N=12)	
Age, median (min, max)	42.0 (0, 89.0)	37.5 (22.0, 59.0)	0.50 <sup>1</sup>
CTG repeat size <sup>2</sup> , median (range)	500.0 (43.0, 2333.0)	167.0 (45.0, 1333.0)	0.17 <sup>1</sup>
Muscular Impairment Rating Scale <sup>3</sup>			0.28 <sup>4</sup>
1	58 (25%)	5 (42%)	
2	48 (20%)	3 (25%)	
3	72 (31%)	4 (33%)	
4	54 (23%)	0 (0%)	
5	3 (1%)	0 (0%)	
Male, n (%)	158 (45%)	7 (58%)	0.37 <sup>5</sup>
Calendar year at sample collection, n (%)			0.01 <sup>4</sup>
1989-2001	60 (17%)	4 (33%)	
2002-2005	78 (22%)	4 (33%)	
2006-2011	76 (22%)	4 (33%)	
2012-2016	135 (39%)	0 (0%)	

<sup>1</sup> Wilcoxon rank-sum test<sup>2</sup> CTG repeat size are unknown in 43 DM patients (discovery cohort N=26, validation cohort N=17).<sup>3</sup> Muscular Impairment Rating Scale (MIRS) was unknown or not clearly defined in 114 DM1 patients (discovery cohort n=107, validation cohort n=7).<sup>4</sup> Fisher's exact test<sup>5</sup> Chi-square test**Supplemental Table 3.** Telomere length attrition in DM1 patients and controls.

Effect	Discovery cohort (DM1 N=7, controls N=162)			Validation cohort (DM1 N=5, controls N=61)		
	$\beta$	SE	p	$\beta$	SE	p
Intercept	0.798	0.029	<.0001	0.526	0.046	<.0001
DM1 vs. controls	0.420	0.155	0.031	0.104	0.130	0.468
Age	-0.005	0.001	0.0001	-0.002	0.001	0.134
DM*Age	-0.008	0.003	0.036	-0.003	0.003	0.333
Sex	-0.017	0.021	0.437	-0.047	0.029	0.178

\* Models included age, DM, age-DM interaction term and sex.





## ***RESULTADOS: CAPÍTULO 3***

---



# CAPÍTULO 3

## **Whole transcriptome analysis and functional studies reveal that senescence plays a pivotal role in Myotonic Dystrophy type 1**

Artículo aceptado con revisión en

Nature Communications

Factor de Impacto 11.88 - Decil 1

**García-Puga M**, Saenz-Antoñanzas A, Gerenu G, Arrieta-Legorburu A, Fernández-Torrón R, Zulaica M, Saenz A, Araúzo-Bravo M, López de Munain A, Matheu A. **Whole transcriptome analysis and functional studies reveal that senescence plays a pivotal role in Myotonic Dystrophy type 1.**

Submitted: 18 November 2019. Accepted with major revision: 26 February 2020.



## ***RESULTADOS: CAPÍTULO 4***

---



# CAPÍTULO 4

## **Myotonic Dystrophy type 1 cells display impaired metabolism and mitochondrial dysfunction that are reversed by metformin**

Artículo publicado en Aging

Factor de Impacto 5.52 - Decil 1

**García-Puga M\***, Saenz-Antonñanzas A, Fernández-Torrón R, López de Munain A, Matheu A. **Myotonic Dystrophy type 1 cells display impaired metabolism and mitochondrial dysfunction that are reversed by metformin.** Aging (Albany NY). 2020 Apr 8;12(7):6260-6275. doi: 10.18632/aging.103022. Epub 2020 Apr 8.

Submitted: 1 December 2019. Accepted: 2 March 2020. Published: 8 April





## **Myotonic Dystrophy type 1 cells display impaired metabolism and mitochondrial dysfunction that are reversed by metformin**

Mikel García-Puga<sup>1,2</sup>, Ander Saenz-Antoñanzas<sup>2</sup>, Roberto Fernández-Torrón<sup>1,3,6</sup>,  
Adolfo López de Munain<sup>1,3,6,7\*</sup> and Ander Matheu<sup>2,4,5\*</sup>

<sup>1</sup> Neuroscience Area, Biodonostia Health Research Institute, San Sebastian, Spain

<sup>2</sup> Cellular Oncology group, Biodonostia Health Research Institute, San Sebastian, Spain

<sup>3</sup> Neurology Department, Donostia University Hospital, San Sebastian, Spain

<sup>4</sup> IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain

<sup>5</sup> CIBERfes, Carlos III Institute, Madrid, Spain

<sup>6</sup> CIBERNED, Carlos III Institute, Madrid, Spain

<sup>7</sup> Faculty of Medicine and Nursery, Department of Neurosciences. University of the Basque Country, San Sebastian, Spain

### Corresponding authors:

#### **Dr. Ander Matheu**

Cellular Oncology Group, Biodonostia Health Research Institute

Paseo Dr. Beguiristain s/n, 20014, San Sebastian, Spain.

Phone number: (+34) 943006073.

E-mail: [ander.matheu@biodonostia.org](mailto:ander.matheu@biodonostia.org)

#### **Dr. Adolfo López de Munain**

Neuromuscular Diseases Group, Biodonostia Health Research Institute

Paseo Dr. Beguiristain s/n, 20014, San Sebastian, Spain.

Phone number: (+34) 943006294.

E-mail: [adolfo.lopezdemunainarregui@osakidetza.eus](mailto:adolfo.lopezdemunainarregui@osakidetza.eus)

### Key words:

Myotonic Dystrophy type 1, cellular metabolism, OXPHOS activity, mitochondria, metformin, fibroblasts

## **RESUMEN**

En este trabajo caracterizamos el impacto del metabolismo celular y de la función mitocondrial en pacientes con DM1, tanto en muestras de fibroblastos como de PBMC derivadas de pacientes con DM1.

Nuestros resultados describen un descenso en la fosforilación oxidativa con un menor nivel de respiración basal, así como de producción de ATP por la vía mitocondrial. Por otro lado, también observamos una alteración en los procesos de fusión y fisión mitocondrial, así como en la producción de ROS total y específica de mitocondria.

Además, el tratamiento con metformina revirtió el descenso en el metabolismo mitocondrial, además de otros procesos como la proliferación celular, la producción de ROS y los procesos de fusión y fisión mitocondrial. Todos ellos procesos que se encuentran alterados durante el envejecimiento fisiológico.

En este trabajo identificamos al metabolismo mitocondrial como uno de los mecanismos implicados en la DM1 y cómo el tratamiento con metformina lo revierte.

## **CONTRIBUCIÓN**

Mi contribución en este trabajo ha sido la realización de toda la experimentación, además del análisis de los resultados generados y la contribución en la escritura del manuscrito.

**ABSTRACT**

Myotonic dystrophy type 1 (DM1; OMIM #160900) is an autosomal dominant disorder, clinically characterized by progressive muscular weakness and multisystem degeneration. The broad phenotypes observed in patients with DM1 resemble the appearance of a multisystem accelerated aging process. However, the molecular mechanisms underlying these phenotypes remain largely unknown.

In this study, we characterized the impact of metabolism and mitochondria on fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) derived from patients with DM1 and healthy individuals. Our results revealed a decrease in oxidative phosphorylation system (OXPHOS) activity, oxygen consumption rate (OCR), ATP production, energy metabolism, mitochondrial dynamics in DM1 fibroblasts, as well as increased accumulation of reactive oxygen species (ROS). PBMCs of DM1 patients also displayed reduced mitochondrial dynamics and energy metabolism.

Moreover, treatment with metformin reversed the metabolic and mitochondrial defects as well as additional accelerated aging phenotypes, such as impaired proliferation, in DM1 derived fibroblasts. Our results identified impaired cell metabolism and mitochondrial dysfunction as important drivers of DM1 pathophysiology and therefore, revealed the efficacy of metformin treatment in a pre-clinical setting.

## INTRODUCTION

Myotonic dystrophy is the most common type of muscular dystrophy in adults and is inherited in an autosomal dominant manner [1]. There are two clinically similar but genetically distinct types: DM type 1 (DM1, also known as Steinert's disease; OMIM #160900), caused by an unstable expansion of a CTG trinucleotide repeat in the noncoding region of the dystrophin myotonic-protein kinase gene (*DMPK*) [2], and DM type 2 (DM2; OMIM #602668), caused by a tetranucleotide repeat CCTG expansion in the zinc finger 9 (*CNBP*) gene [3]. CTG and CCTG mutations lead to formation of transcript aggregates in the nucleus, which interfere with proteins that play an important role in RNA metabolism, including members of the muscleblind (MBNL) and CUGBP RNA-Binding Protein Elav-Like Family Member 1 (CELF1) family of RNA-binding proteins [4]. Both diseases are characterized by missplicing of several downstream effector genes with negative effects on multiple tissues, thus contributing to the multisystem pathogenesis of DM [5]. DM1 is more common than DM2 and represents a more severe phenotype. In DM1, unaffected individuals carry less than 50 triplet repeats, whereas expansions ranging between 50 and 4000 CTG repeats have been found in affected individuals [6].

Patients with DM1 present a multisystem degenerative process that includes progressive muscular weakness and atrophy, myotonia, cardiomyopathy, insulin-resistance, cataracts, increased cancer incidence, neurodegeneration, metabolic syndrome, or premature death. This multisystem degenerative process strongly resembles an accelerated aging process [7,8]. From a cellular point of view, different pathogenic mechanisms, such as alteration of autophagy, increased senescence, telomere shortening, or genomic instability, all of them hallmarks of aging [9], have been proposed to explain how the expansion in the genome of affected patients leads to the DM multisystem phenotypes [7]. However, detailed

experimental validation of these mechanisms remains incomplete and has not yet been clarified.

It is well known the existence of several metabolic alterations, which accumulate over time, and affect longevity, aging and neurodegeneration [10,11]. As a consequence, deregulated nutrient sensing and mitochondrial dysfunction have been proposed as hallmarks of aging [9] and metabolism is a pillar of aging [12]. In DM1, patients present several metabolic defects such as hyperinsulinemia, glucose resistance, and in some cases, diabetes mellitus [7]. Moreover, muscle samples *in vitro* and blood samples *in vivo* show reduced Coenzyme Q10 (CoQ10) levels, a component of the electron transport chain that participates in aerobic cellular respiration [13,14], indicative of mitochondrial dysfunction. However, the role of metabolism and mitochondria in the pathogenesis of DM1 has not been addressed in detail.

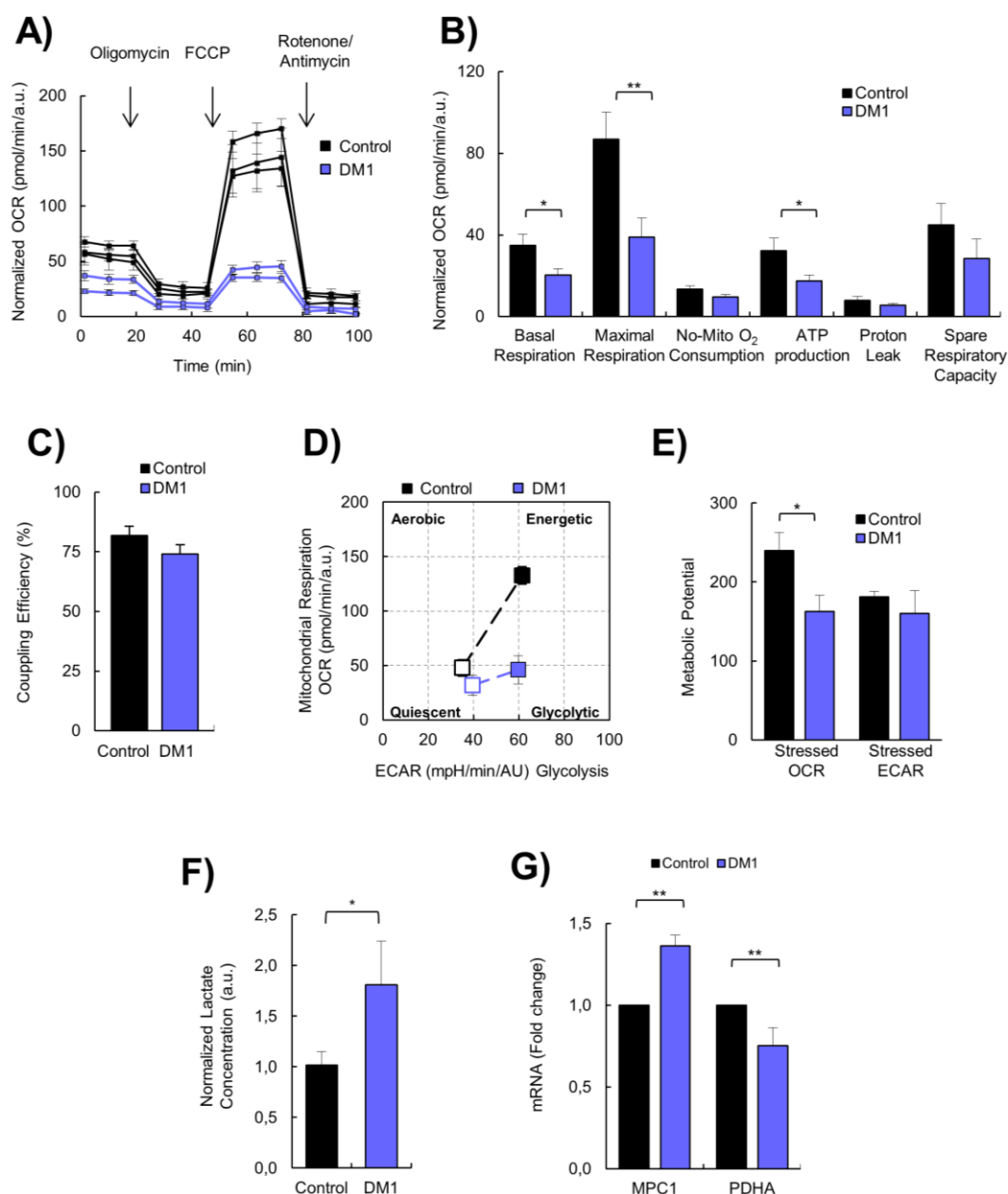
In this work, we studied their contribution using human primary fibroblasts and PBMCs derived from healthy donors and patients with DM1 as models. Our results indicated that DM1 fibroblasts showed impaired metabolism and mitochondrial dysfunction resulting in lower levels of ATP production and increased reactive oxygen species (ROS) production. PBMCs from DM1 patients also showed impaired mitochondrial dynamics and energy homeostasis. Interestingly, treatment with metformin resulted in the restoration of these phenotypes.

## RESULTS

### DM1-derived fibroblasts present impaired metabolism

To investigate the role of cellular metabolism in the pathogenesis of DM1, we first measured the oxygen consumption rate (OCR) in the fibroblasts of patients with DM1 and healthy donors. DM1 fibroblasts showed a 40% and 50% reduction in basal respiration and maximal respiration, respectively, compared to controls, which leads to a 50% reduction in ATP production via the Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System (OXPHOS) activity (**Fig 1 A,B**). Next, we hypothesized that the reduction in OXPHOS activity could be responsible for a reduction in the glycolysis pathway. To examine this hypothesis, we measured extracellular acidification (ECAR) as a measure of glycolysis [15]. We did not find any alteration in the glycolysis pathway (**Fig Suppl 1**), suggesting that all glucose taken by DM1 fibroblasts was coupled to pyruvate production. In the canonical pathway, pyruvate is converted to acetyl-CoA and transported to the mitochondria, but in some pathological conditions it could be transformed to lactate. We measure the levels of lactate in DM1 cells and we found an elevation of 1.8-fold of this metabolite (**Fig 1F**). Moreover, we found an elevation of the mitochondrial carrier of pyruvate *MCP1* and reduced expression of the pyruvate dehydrogenase *PDHA* (**Fig 1G**) that catalyzes the overall conversion of pyruvate to acetyl-CoA and CO<sub>2</sub>, and provides the primary link between glycolysis and the tricarboxylic acid cycle.

The addition of carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) simulates an exacerbated physiological energy demand by stimulating the respiratory chain to operate at maximum capacity. DM1 cells were not able to respond to this stress as efficiently as controls, indicating impaired maximal respiration (**Fig 1 A,B**). However, we did not find any difference in the proton-leak nor the coupling efficiency (**Fig 1A-C**). Therefore, it seems that all the protons generated are coupled to ATP production. Moreover, DM1 fibroblasts have a more



**Figure 1. DM1-derived fibroblasts present impaired metabolism.**

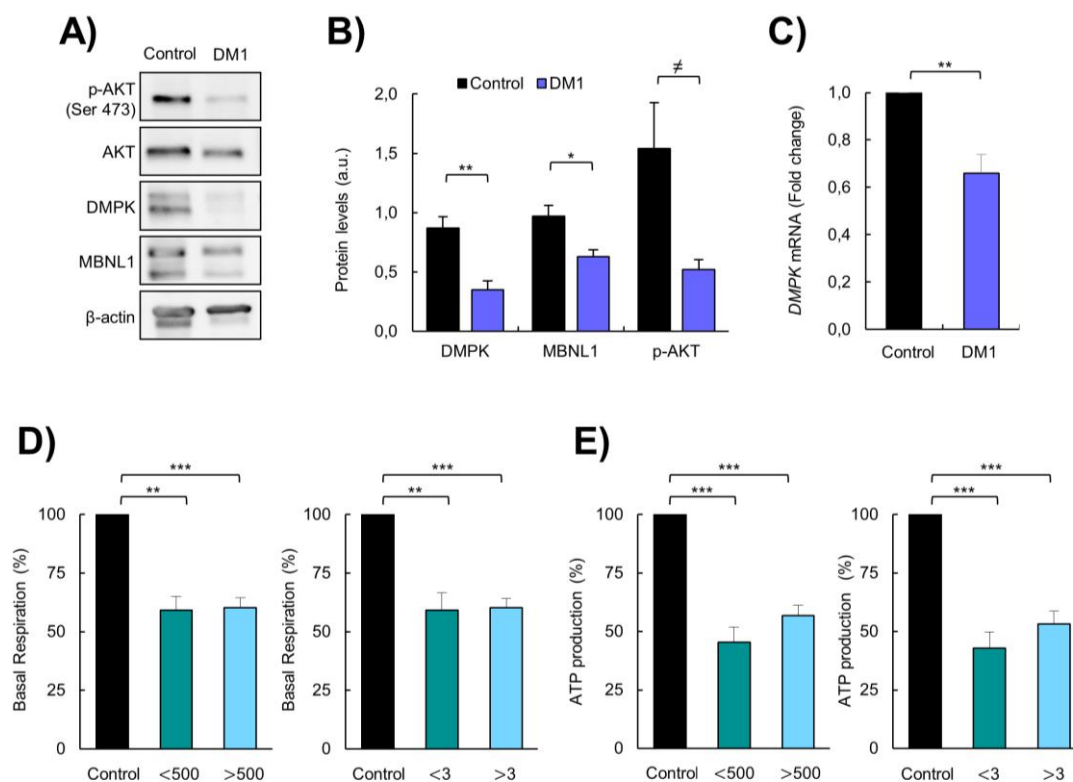
**A)** Kinetic normalized OCR response in DM1 and control fibroblasts in basal conditions and after consecutive addition of Oligomycin 1.5  $\mu$ M, FCCP 1.5  $\mu$ M and Antimycin-A/Rotenone 1.5  $\mu$ M. A representative experiment out of 3 is shown with 3 independent control and 2 DM1. **B,C)** Quantification of mitochondrial respiratory functions and coupling efficiency in DM1 (n=7) and control fibroblasts (n=3). **D)** Representative energy map and **E)** Quantification of metabolic potential of DM1 and control fibroblasts. *Stressed* indicates the values of OCR and ECAR after the injection of Oligomycin and FCCP simultaneously in DM1 (n=5) and control fibroblasts (n=3). **F)** Lactate production in DM1 (n=4) and control fibroblasts (n=2). **G)** mRNA levels of *MPC1* and *PDHA* in DM1 (n=5) and controls (n=2).

quiescent metabolism compared to healthy controls and simulate a stress condition. DM1 fibroblasts could not switch to a more energetic metabolism (**Fig 1D,E**), resulting in a lower metabolic potential. Consistent with these results, DM1 fibroblasts presented lower AKT activation (measured as phosphorylated AKT) (**Fig 2A,B**), which is the central mediator of the PI3K pathway that serves a key role in multiple cellular processes, including glucose metabolism [16]. In summary, DM1-derived fibroblasts present decreased metabolism.

### **Correlation between impaired metabolism and markers of disease pathophysiology**

Next, we attempted to associate the impaired metabolism of DM1-derived fibroblasts with several pathophysiological characteristics of the disease. First, we found that the decrease in AKT phosphorylation in DM1-derived fibroblasts correlated with lower expression of DMPK and MBNL1, both at the protein (**Fig 2A,B**), and mRNA levels (**Fig 2C**). Moreover, we examined whether there was a correlation between the severity of the metabolic alterations and both the number of CTG expansions and the Muscular Impairment Rating Scale (MIRS) score. We did not detect significant differences in basal and maximal respiration or in ATP production when fibroblasts were divided into those with less or more than 500 CTG repeats and 3 MIRS score (**Fig 2D,E and Fig Suppl 2**). Moreover, there were no marked differences between cells obtained from DM1 patients of different ages, although the cells from a 71-year-old patient showed slightly higher impairment than others (**Table 1, Fig Suppl 3**). Overall, metabolic dysfunction in fibroblasts derived from patients with DM1 seems not to be significantly altered by the repeat expansion of patients with DM1.





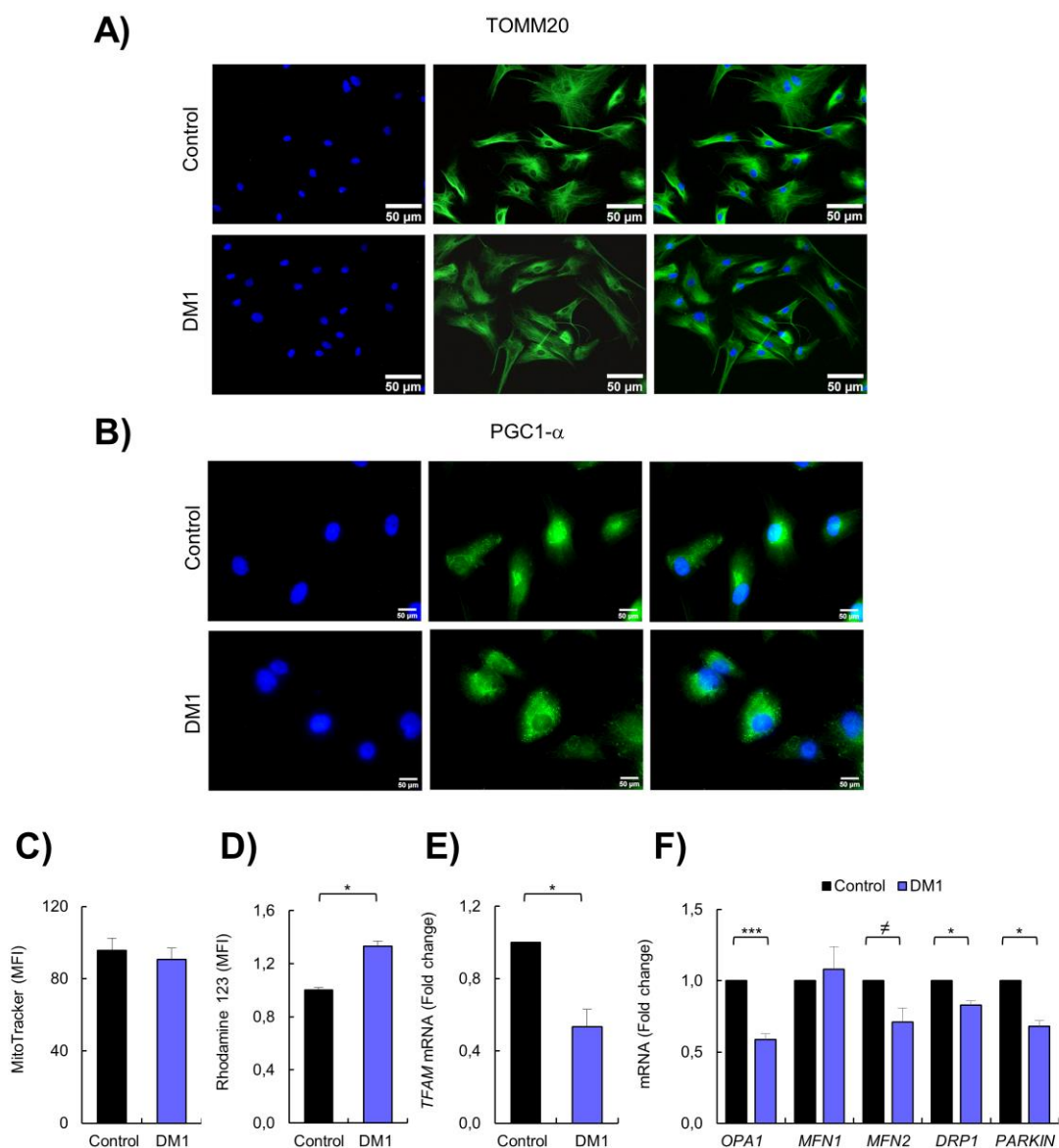
**Figure 2. Correlation between impaired metabolism and markers of disease pathophysiology.**

**A)** Representative immunoblots and **B)** Quantification of phospho-AKT, AKT, DMPK and MBNL1 protein levels (n=4). **C)** mRNA levels of *DMPK* in DM1 fibroblasts (n=7) and controls (n=3). **D)** Basal respiration levels in controls (n=3) and DM1 fibroblasts stratified by CTG expansion in <500 (n=4) and >500 (n=3) (left) and MIRS scale in <3 (n=2) and >3 (n=5) (right). **E)** ATP production levels using the same stratification by CTG expansion and MIRS scale.

## **DM1-derived fibroblasts display mitochondrial dysfunction but no changes in mitochondrial biogenesis**

The results presented above indicate that the mitochondria of patients with DM1 could function normally, but with a reduced OXPHOS activity. We further investigated this by examining the biogenesis of mitochondria [17]. First, we evaluated the levels of two markers of mitochondrial content and biogenesis such as TOMM20 and PGC1- $\alpha$ . Immunofluorescence showed that expression of these two markers was not markedly altered in cells from DM1 compared to healthy controls (**Fig 3A, B**). In addition, flow cytometry was used to analyze another marker of mitochondrial content, MitoTracker, obtaining similar results. Indeed, no differences were detected in the mitochondrial content in DM1 and control cells (**Fig 3C**). Moreover, the mitochondrial membrane potential remained elevated in DM1 cells (**Fig 3D**). However, the expression of the mitochondrial transcription factor A (*TFAM*), gene that participates in the regulation of the mitochondrial genome [18], was reduced by 50% in DM1 fibroblasts (**Fig 3E**). These results suggest that the impaired cellular bioenergetics were not related to substantial alterations in mitochondrial biogenesis and content.

Mitochondria are organelles with high dynamic plasticity to rapidly adapt in response to stress situations. Mitochondrial dynamic is regulated by a machinery of pro-fusion and pro-fission proteins, which constitutes an important part of the mitochondria quality control as it facilitates the elimination of damaged mitochondria by mitochondrial selective autophagy (mitophagy) [19]. We studied the expression of *OPA1*, *MFN1* and *MFN2* fusion related genes, *DRP1* fission related gene, and *PARKIN*, which is involved in mitophagy [20]. Interestingly, the levels of *OPA1*, *MFN2*, *DRP1*, and *PARKIN* were decreased in DM1-derived fibroblasts (**Fig 3F**). Overall, DM1-derived fibroblasts show mitochondrial dysfunction.



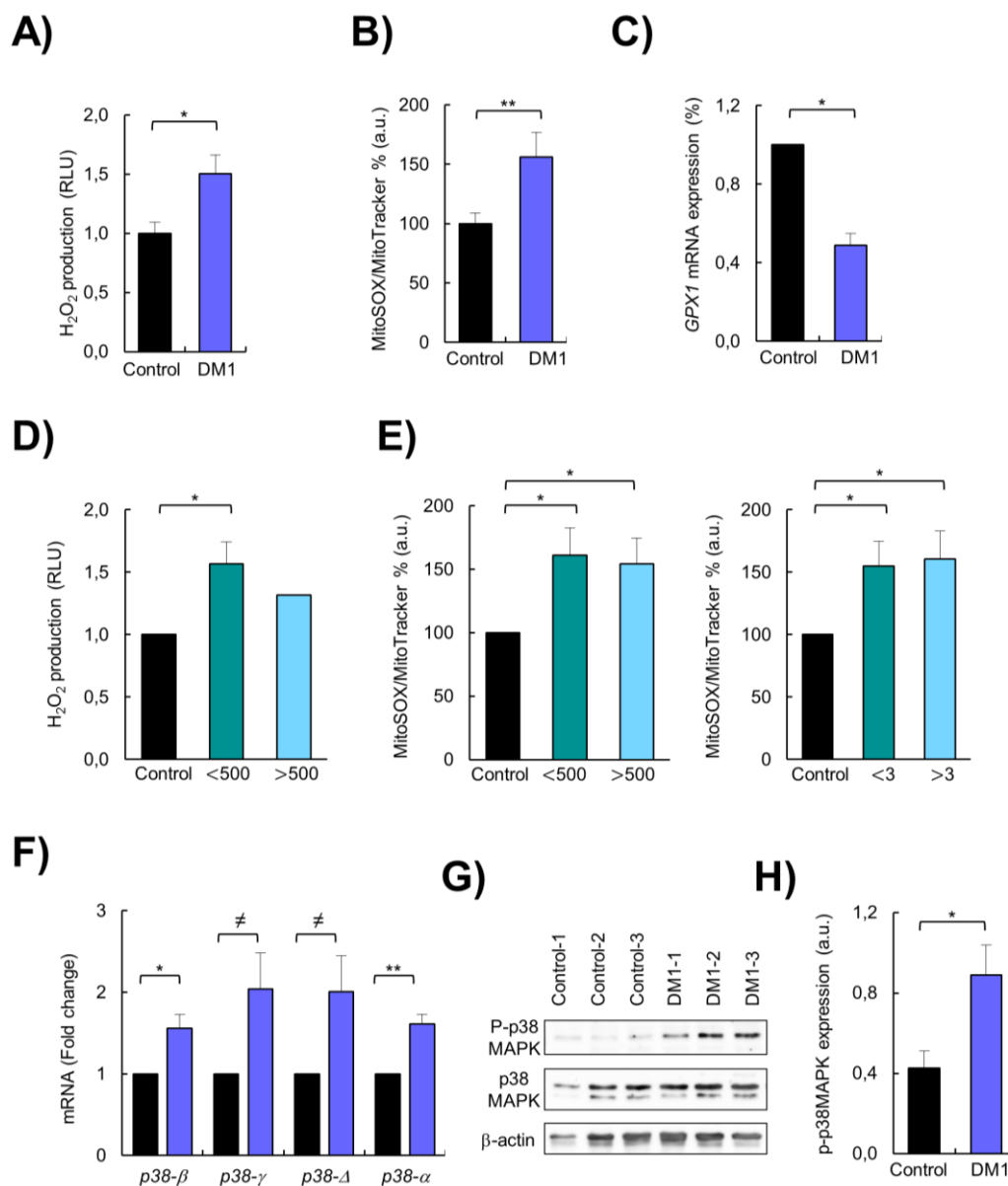
**Figure 3. DM1-derived fibroblasts have no changes in mitochondria biogenesis.**

**A,B)** Representative images of immunofluorescence of TOMM20 and PGC1- $\alpha$  in DM1 (n=3) and control fibroblasts (n=3). Medium fluorescence intensity of **C)** MitoTracker Red FM in control (n=3) and DM1 cells (n=5); and **D)** Rhodamine 123 in DM1 (n=3) and control fibroblasts (n=3). **E)** mRNA levels of *TFAM* transcription factor in control (n=3) and DM1 cells (n=3). **F)** mRNA levels of *OPA1*, *MFN1*, *MFN2*, *DRP1* and *PARKIN* in DM1 (n $\geq$ 2) and control fibroblasts (n=3).

## **DM1-derived fibroblasts present accumulation of ROS and p38MAPK activation**

Production of ROS is enhanced in several pathological conditions in which the respiratory chain is impaired [23]. Therefore, we measured ROS production and found a 50% increase in total ROS in DM1 cells compared to controls (**Fig 4A**). Similar results were obtained when specific ROS produced by the mitochondria were measured in DM1 fibroblasts and compared to controls (**Fig 4B**). Further, the expression of glutathione peroxidase 1 (*GPX1*) antioxidant gene was decreased by 50% in DM1 cells (**Fig 4C**). In agreement with metabolic studies, we did not observe differences in ROS accumulation when fibroblasts were divided based on the number of CTG repeats and MIRS score (**Fig 4D,E**).

p38MAPK is a stress-activated protein kinase, which accumulates with aging and it is activated by the presence of ROS [24, 25]. Consequently, we measured the different p38 isoforms and we found that all isoforms, p38- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\Delta$ , - $\gamma$ , were elevated in DM1 cells (**Fig 4F**). In addition, the total levels of p38MAPK and its phosphorylated form (P-p38MAPK) were an over 2-fold increase in the levels of P-p38MAPK in DM1-derived fibroblasts compared to control cells (**Fig 4G,H**). In summary, DM1 fibroblasts display increased ROS production, which is associated with an enhanced activation of p38MAPK.

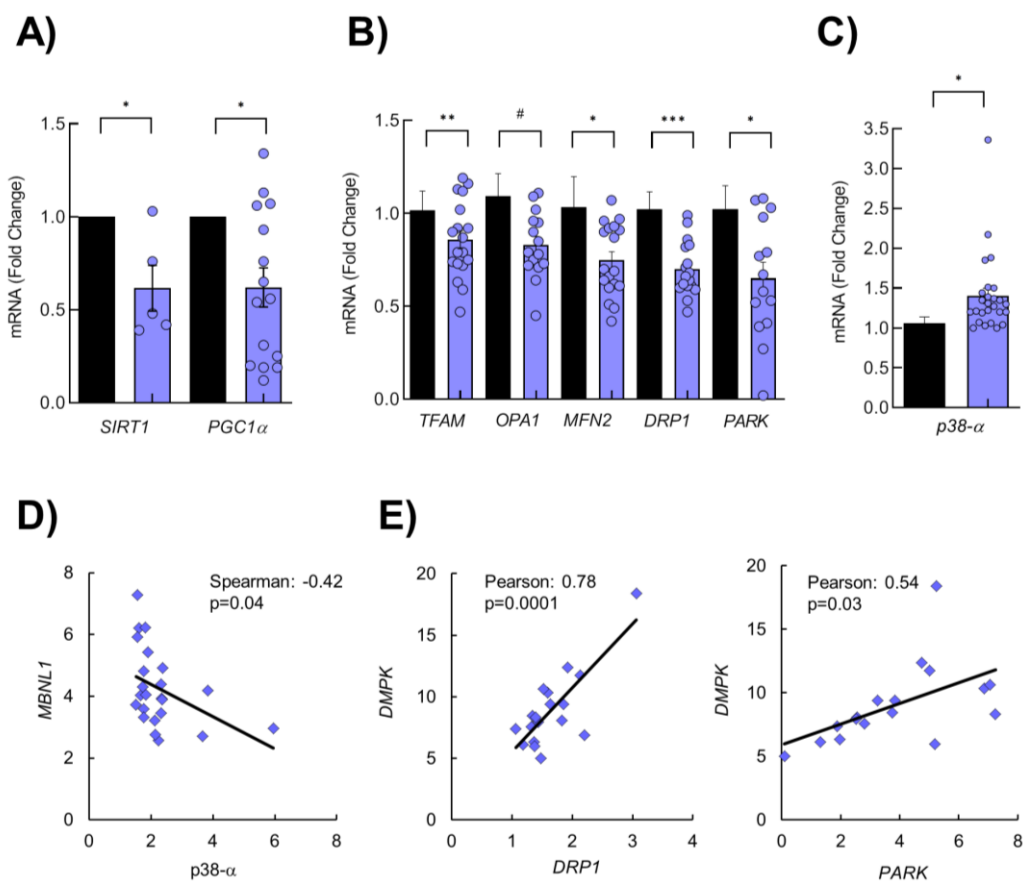


**Figure 4. DM1 fibroblasts present accumulation of ROS and p38MAPK activation.**

**A)** Luminescence signal proportional to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in DM1 (n=4) and control fibroblasts (n=3). **B)** Medium fluorescence intensity of MitoSOX+ values normalized to mean fluorescence of MitoTracker values in controls (n=3) and DM1(n=5). **C)** *GPX1* mRNA levels in DM1 (n=2) and control fibroblasts (n=2). **D)** Luminescence signal proportional to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in controls (n=3) and DM1 fibroblasts stratified by CTG expansion in <500 CTG (n=3) and >500 CTG (n=1). **E)** Medium fluorescence intensity of MitoTracker Red FM in controls (n=3) and DM1 stratified by CTG expansion in <500 (n=3) and >500 (n=2) (left) and MIRS scale in <3 (n=2) and >3 (n=3) (right). **F)** mRNA levels of the different p38 isoforms in DM1 (n=3) and control fibroblasts (n=3). **G)** Representative immunoblot and **H)** Quantification of P-p38MAPK and p38MAPK protein levels in DM1 and control fibroblasts (n=3).

**DM1-derived blood samples show mitochondria dysfunction**

Next, we investigated whether these results could be translated to the clinical setting. Therefore, we measured the expression levels of several of the aforementioned genes in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from a cohort of patients with DM1 established in Guipúzcoa (Basque Country, Spain) [36]. Interestingly, we found lower expression levels of *SIRT1* and *PGC1 $\alpha$* , two key metabolic sensor that modulates a large variety of cellular processes such as energy metabolism stress response and aging [22] (**Fig 5A**). Interestingly, lower expression levels of genes involved in mitochondrial genome maintenance, such as *TFAM*; mitochondrial fusion, such as *OPA1*, *MFN2*; mitochondrial fission, such as *DRP1* and, mitophagy, such as *PARK*, were detected in DM1 samples (**Fig 5B**). On the contrary, the levels of p38- $\alpha$  were elevated in blood samples from DM1 patients (**Fig 5C**). Correlation analysis confirmed significant positive correlations between *MBNL1* and p38- $\alpha$  ( $r=-0.42$   $p<0.05$ ) (**Fig 5D**), and between *DMPK* vs. *DRP1* ( $r=0.78$   $p<0.001$ ) and between *DMPK* vs. *PARK* ( $r=0.54$   $p<0.05$ ) (**Fig 5E**), further supporting the relevance of the results obtained in cell culture and highlighting the importance of metabolism and mitochondria for the disease.



**Figure 5. DM1-derived blood samples also show mitochondria dysfunction.**

**A)** mRNA levels of *SIRT1* and *PGC1 $\alpha$*  in PBMCs derived from DM1 (n $\geq$ 4) and control (n=4). **B)** mRNA levels of *TFAM*, *OPA1*, *MFN2*, *DRP1* and *PARK* in PBMCs derived from DM1 (n $\geq$ 15) and control (n=4). **C)** mRNA levels of *p38- $\alpha$*  in PBMCs derived from DM1 (n=15) and control (n=4). **D)** Correlation analysis between *MBNL1* vs. *p38- $\alpha$*  in DM1 samples (n=22). **E)** Correlation analysis between *DMPK* vs. *DRP1* and between *DMPK* vs. *PARK* in DM1 samples (n $\geq$ 16).

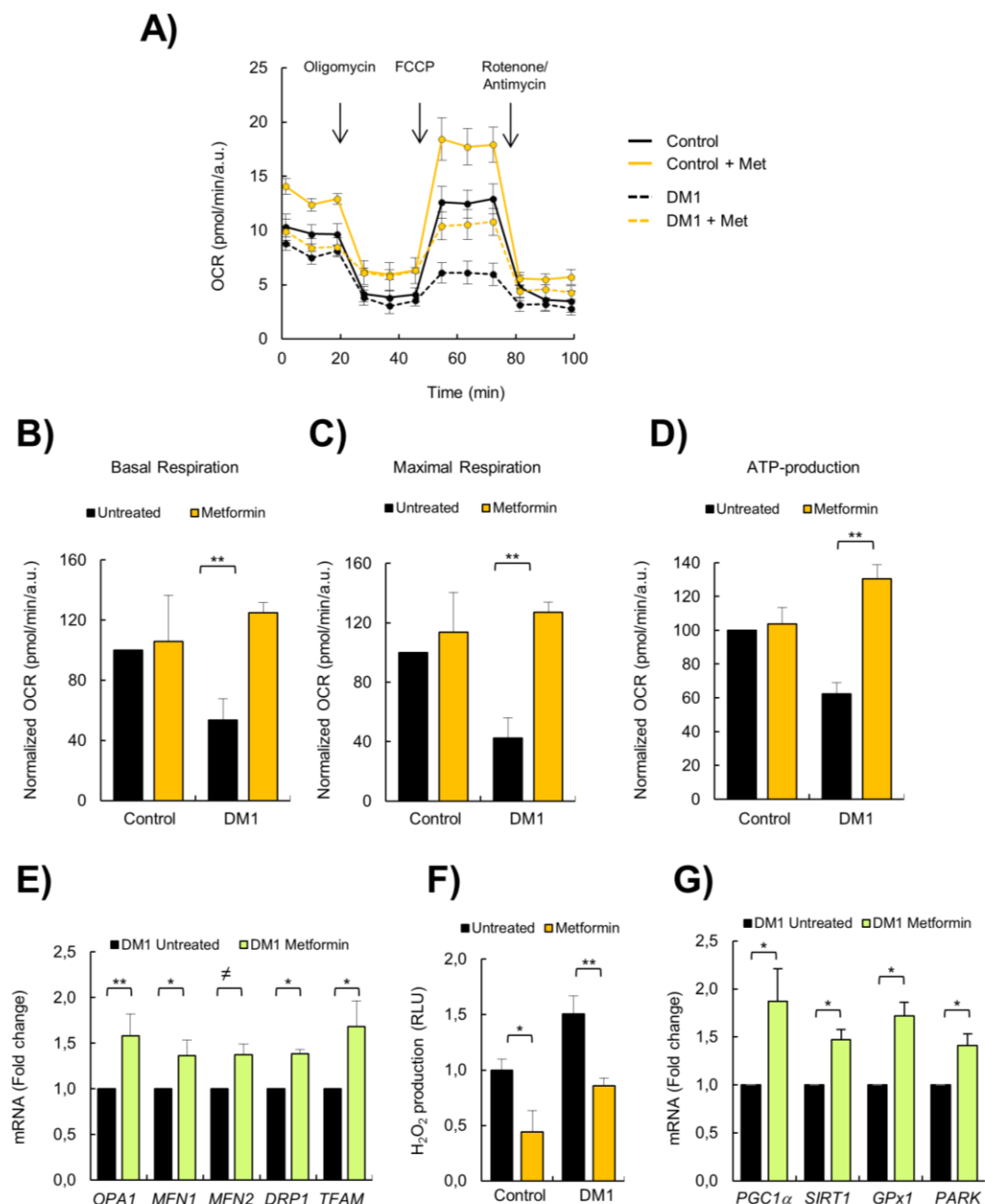
## Metformin restores metabolism and mitochondria activity

Metformin is a first-line anti-diabetic agent that functions mainly through the suppression of glucose production and alleviation of insulin resistance and has recently been shown to improve mitochondrial respiratory activity [26, 27]. We examined whether metformin could improve the impaired OXPHOS activity in patients with DM1. To test this idea, we treated DM1 and control fibroblasts with 1  $\mu$ M of metformin for 72 hours and evaluated cellular metabolism and mitochondrial activity. Interestingly, metformin improved the basal oxygen consumption rate and maximal respiration of DM1 fibroblasts by more than twice (**Fig 6A-C**), which resulted in an increased ATP production via OXPHOS (**Fig 6A,D**). Moreover, it increased the levels of *OPA1*, *MFN1*, *MFN2*, *DRP1* and *TFAM* in DM1 cells by at least 1.5-fold (**Fig 6E**).

Next, we measured ROS production and found that treatment with metformin significantly decreased ROS production in control as well as DM1 fibroblasts (**Fig 6F**). In accordance, the levels of *GPX1* and *PARKIN* were elevated in the presence of metformin in DM1 cells (**Fig 6G**). The levels of *PGC1 $\alpha$*  and *SIRT1*, critical downstream targets, were also induced in DM1 cells cultured in the presence of metformin, validating the effect of metformin in metabolic pathways (**Fig 6G**).

In summary, metformin restores the impaired metabolism and mitochondrial activity in DM1 fibroblasts.





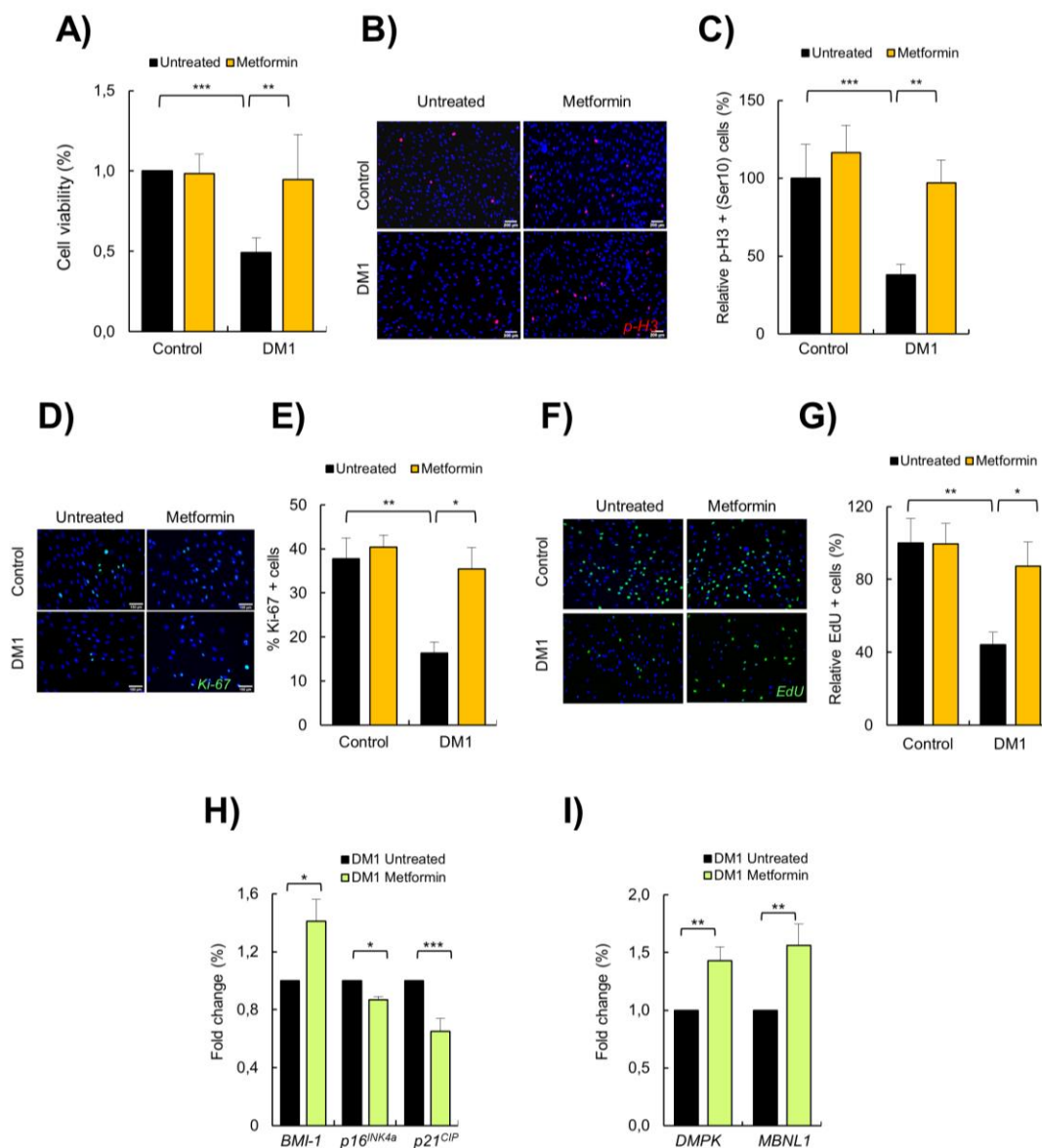
**Figure 6. Metformin restores OXPHOS activity and ROS production in DM1 fibroblasts.**

**A)** Representative kinetic normalized OCR response in DM1 (n=6) and control fibroblasts (n=3) after treatment with 1  $\mu$ M of metformin for 72 h. DM1 and control fibroblast were plated at 5.000 cells/well 24 hours prior to the assay. A representative experiment out of 3 is shown. **B-D)** Quantification of mitochondrial basal respiration, maximal respiration, and ATP production, respectively, after treatment with 1  $\mu$ M of metformin for 72h in controls (n=3) and DM1 fibroblasts (n=6). **E)** mRNA levels of *OPA1*, *MFN1*, *MFN2*, *DRP1* and *TFAM* after treatment with 1  $\mu$ M of metformin 72 h (n $\geq$ 2). **F)** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production after treatment with 1  $\mu$ M of metformin for 72 h (n=3). **G)** mRNA levels of *PGC1 $\alpha$* , *SIRT1*, *GPX1* and *PARKIN* in DM1 and control fibroblasts (n=3) after treatment with 1  $\mu$ M of metformin 72 h (n $\geq$ 2).

**Metformin restores additional DM1 associated phenotypes**

Metformin exerts a potent anti-aging activity, in part by increasing proliferation and inhibiting senescence [28,29]. It has been previously reported that DM1 fibroblasts display decreased cell proliferation and enhanced senescence accumulation [8,30]. Next, we investigated the impact of metformin in the proliferative potential of DM1 fibroblasts. For this, we treated DM1 and control fibroblasts with 1 and 10  $\mu$ M of metformin and measured cell viability. As expected, DM1 cells had lower viability than controls but, importantly, the treatment increased significantly the viability of DM1 fibroblasts, reaching almost the levels of control cells (**Fig 7A and Fig Suppl 4**). Moreover, we measured the number of cells positive for phospho-Histone H3, Ki-67 and EdU, which are well-established markers of mitosis and cell division, and found reduced numbers in those markers in DM1 cells (**Fig 7B-G**). Importantly, metformin increased the number of pH3, Ki-67 and EdU positive cells by almost 2-fold in DM1 cells (**Fig 7C,E,G**).

These functional results were further validated at the molecular level. Metformin modulated the expression of critical genes involved in cell proliferation and cell cycle activity such as *BMI1*, *p16<sup>INK4a</sup>* and *p21<sup>CIP</sup>*. In particular, treatment for 72 h increased the levels of *BMI1*, and partially decreased the levels of *p16<sup>INK4a</sup>* and *p21<sup>CIP</sup>* cell cycle inhibitors (**Fig 7F**). Finally, we also detected that metformin restored by 1.5-fold the levels of *DMPK* and *MBNL1* (**Fig 7G**). Overall, metformin rescues multiple phenotypes associated to DM1 cells.



**Figure 7. Metformin restores cell viability and proliferation in DM1 fibroblasts.**

**A)** Cell viability of DM1 (n=5) and control (n=3) fibroblasts measured in MTT studies after treatment with 1  $\mu$ M of metformin for 72 h. **B,C)** Representative image and quantification of phospho-Histone H3 (Ser10) staining in controls (n=3) and DM1 fibroblasts (n=7). **D,E)** Representative image of Ki-67 staining and quantification in controls (n=2) and DM1 cells (n=3). **F,G)** Representative image of EdU staining and quantification in controls (n=2) and DM1 cells (n=3). **H)** mRNA levels of *BMI1*, *p16<sup>INK4a</sup>* and *p21<sup>CIP</sup>* in cells treated or not with 1  $\mu$ M of metformin 72h (n $\geq$ 2). **G)** mRNA levels of *DMPK* and *MBNL1* in same conditions (n=3).

## DISCUSSION

We established primary cultures of fibroblasts derived from patients with DM1 and found that they display impaired metabolism and mitochondrial dysfunction. In particular, DM1 fibroblasts present lower production of ATP by OXPHOS, less efficient mitochondrial electron transport chain, impaired mitochondrial dynamics, and higher production of ROS compared with healthy control-derived fibroblasts. Interestingly, some of these defects, such as energy homeostasis and mitochondrial dynamics, were also detected in PBMCs from patients with DM1, together revealing the impact of metabolism and mitochondrial function on the pathophysiology of DM1.

These results show that fibroblasts, which are a well-established model for cell aging studies *in vitro* [31], might be a good cellular model to characterize the pathophysiology of the disease, as they resemble multiple molecular and cellular phenotypes of the disease. However, we did not detect a correlation between the severity of the phenotypes and the number of CTG repeats. This result might be potentially biased by methodological reasons because CTG was measured several years before isolation of skin fibroblasts, from blood samples, and could be also related because of experiments were performed at early passage.

Our results reveal novel processes involved in the pathophysiology of the disease. Indeed, the role of mitochondria in DM1 remained practically unknown. A previous study observed an inverse correlation between the expression of Coenzyme Q10, an electron carrier in the mitochondrial respiratory chain, and lactate production with CTG expansion in PBMC samples [14], whereas mitochondrial dysfunction was suggested to occur in muscles of patients with DM1 as well [32]. The results of these studies are in line with our data and are indicative of mitochondrial dysfunction in DM1. The lower mitochondrial efficiency detected in our study could be due to the conversion of pyruvate, generated during glycolysis,

to lactate instead of acetyl CoA, which is transported to mitochondria and enters into the Krebs cycle. Moreover, our results show that mitochondrial biogenesis seems to be normal in DM1 cells, but they are not able to maintain the metabolic state as a consequence of unbalance remodeling of mitochondrial network morphology, which is not correctly controlled by the machinery of pro-fusion and fission proteins, and impaired elimination through mitophagy.

DM1 patients develop a large variety of symptoms in multiple systems that strongly resemble the clinical signs of accelerated aging, including some related to metabolism and mitochondria dysfunction such as insulin resistance, glucose intolerance, hyperinsulinemia, and increased risk of type 2 diabetes [33, 34]. Our results shed light in the underlying molecular mechanisms of these symptoms. Given that mitochondria is the main energy hub of the cell and the main intracellular source of ROS, our results might be extended to additional DM1 symptoms, particularly in the muscle, since a shift in energy production anticipates muscle atrophy with aging. Finally, our results further support the link between DM1 and accelerated aging [8], since cellular metabolism and mitochondrial dysfunction are critical mechanisms in aging.

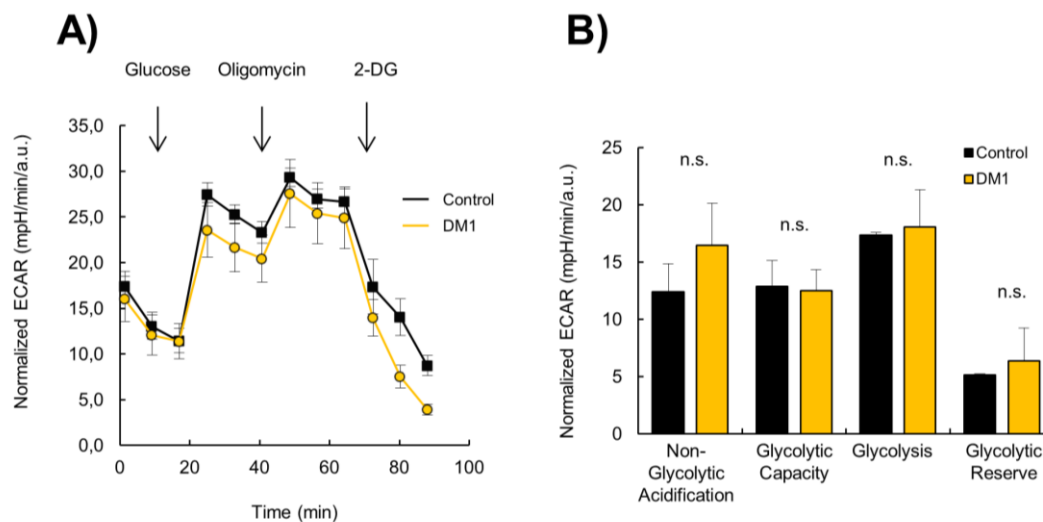
DM1 is a rare, clinically variable disease with no currently available treatment to slow or stop disease progression. Supportive treatments, preventative measures and clinical surveillance are the only options available for patients with DM1 [35]. Metformin is a synthetic biguanide that is currently one of the most recommended medications for type 2 diabetes treatment around the world. Interestingly, studies in both vertebrates and invertebrates have shown that metformin delays aging and increases longevity [29]. Moreover, a meta-analysis has suggested that metformin reduces all-cause mortality and aging-related diseases in humans independent of its effect on diabetes [36]. We show here that metformin improves ATP production by OXPHOS and decreases the production of ROS in DM1 cells even at a much lower concentration compared to its current

therapeutic dose (1  $\mu\text{M}$  vs 75  $\mu\text{M}$ ). In line with our results, it has been recently shown that mitochondria might be a target of metformin [27]. We also found that metformin treatment reverses additional DM1-related phenotypes such as impaired proliferation, suggesting that its mechanism of action in DM1 is wider. In support, low doses of metformin may also correct several alternative splicing defects in DM1 myoblasts *in vitro* [37], the use of metformin reduced the risk of cancer in patients with DM1 having diabetes [38], and also improved mobility of DM1 patients in a small randomized clinical trial [39]. If the hypothesis of an accelerated aging in patients with DM1 is validated, our results add to the potential benefits of expanding metformin use in DM1, outside of the management of T2D, to include cancer prevention [38] and also phenotypes associated with aging. In summary, our results showed the efficacy of metformin in a pre-clinical setting and suggest that it warrants further assessment as a candidate drug for DM1 treatment.

**Table 1.** Characteristics of human primary fibroblasts used in the present study.

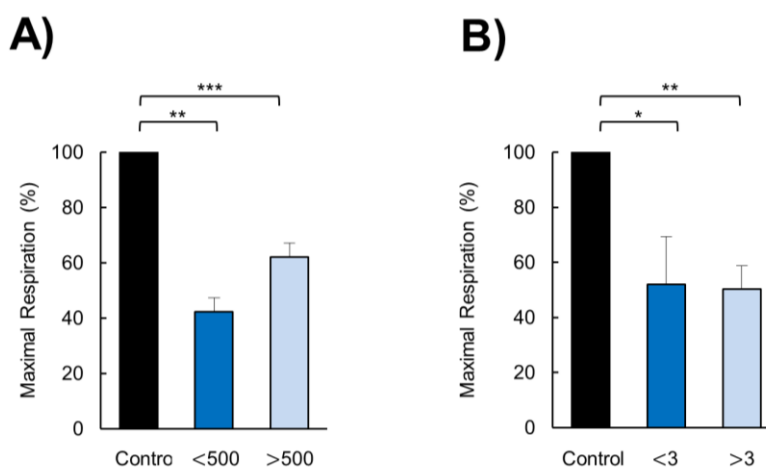
<b>Fibroblasts</b>	<b>Status</b>	<b>Gender</b>	<b>Age biopsy (years)</b>	<b>MIRS</b>	<b>CTG (n) in blood</b>	<b>Age diagnosis (years)</b>
<b>C1</b>	Control	M	49			
<b>C2</b>	Control	F	48			
<b>C3</b>	Control	Unknown	53			
<b>DM1-1</b>	DM1	M	71	3	167	53
<b>DM1-2</b>	DM1	F	45	2	333	41
<b>DM1-3</b>	DM1	F	59	3	333	26
<b>DM1-4</b>	DM1	F	44	2	833	27
<b>DM1-5</b>	DM1	M	56	3	1333	20
<b>DM1-6</b>	DM1	F	34	4	1650	12
<b>DM1-7</b>	DM1	M	50	5	233	20

MIRS: Muscle impairment rating scale.



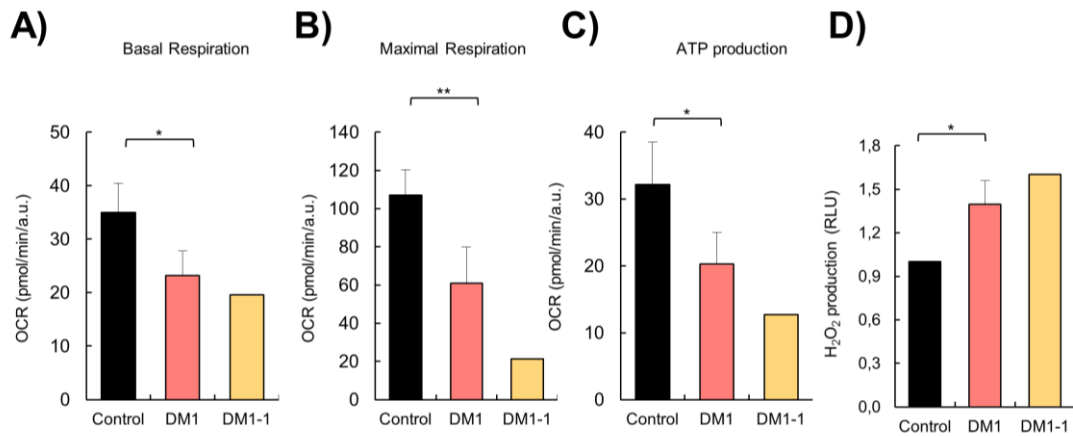
**Figure Supplementary 1. DM1-derived fibroblasts have no changes in glycolysis.**

**A)** Kinetic normalized ECAR response in DM1 and control fibroblasts obtained in basal condition and after consecutive addition of Glucose 10 mM, Oligomycin 1  $\mu$ M and 2-D-Deoxy-Glucose 50 mM. DM1 and control fibroblast were plated at 5.000 cells/well, in XF96 cell culture plates, 24–28 hours prior to the assays. The assay medium was the substrate-free base medium supplemented with 2 mM glutamine. Upon completion of an assay, cells were normalized using violet crystal. A representative experiment is shown here (n=3 controls and n=4 DM1 patients). **B)** Quantification of glycolytic functions in DM1 and control fibroblasts (n=3 controls and n=4 DM1 patients).

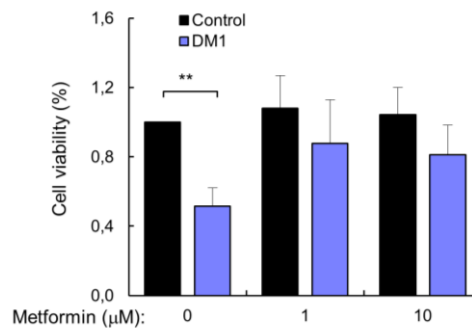


**Figure Supplementary 2. DM1-derived fibroblasts have no changes in maximal respiration after stratification by CTG amplification and MIRS scale.**

Maximal respiration in DM1 derived fibroblasts stratified by **A)** CTG expansion (n=3 controls; n=4 <500 CTG and n=3 >500 CTG DM1 patients) and **B)** MIRS scale (n=3 controls; n=2 MIRS <3 and n=5 MIRS >3 DM1 patients).



**Figure Supplementary 3. A) Basal, B) Maximal respiration, C) ATP production and D) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in control fibroblasts (first bar), in DM1 derived fibroblasts excluding the case with 71 years old (second bar) and in the specific case of the patient with 71 years old (third bar).**



**Figure Supplementary 4. Metformin restores cell viability in DM1-derived fibroblasts.**

Cell viability of DM1 and control fibroblasts after treatment with 1 and 10 μM of metformin 72 h (n=3 controls and n=5 DM1 patients).



## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study approval**

This study was approved by the Donostia University Hospital Ethical Board (approval number 15-57) and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki's ethical standards. All subjects gave written informed consent before sample donation.

### **Reagents and Cell culture**

For the isolation of primary fibroblasts, punch skin biopsies were chopped into 2–3 mm<sup>3</sup> fragments and placed on a surface moistened with modified Eagle's medium containing 13% newborn calf serum, 0.4% penicillin/streptomycin (Gibco, Waltham, MA, USA) and 2 mM L-glutamine (Gibco). Flasks were incubated vertically for 3–6 hours at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and then returned to the horizontal position. Human fibroblasts were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 1% L-glutamine (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco). 7 independent cultures from different patients with DM1 and 3 from healthy controls were established (see Table 1 for patient characteristics). When indicated, fibroblasts were treated with metformin (Sigma-Aldrich) for 72 hours. Experiments were performed in early passage cultures (range 5 to 10 passages).

### **PBMCs sample extraction and RNA isolation**

Peripheral blood samples (PBMCs) were stored in the Basque Biobank. Briefly, blood sample was extracted by venipuncture and PBMCs were immediately isolated using Ficoll. Total RNA was isolated using RNeasy Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. RNA samples were then resuspended in DNase/RNase-free water and maintained at -80°C until use. RNA concentration and

purity were measured using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific).

### **Metabolic measurements**

Measurement of OCR and ECAR were performed in XF96 plates with *XF Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience). Fibroblasts were seeded in collagen (BD Biosciences) coated XF 96-well plates (Seahorse/Agilent) in octuplicate at  $1.2 \times 10^4$  cells/well in 100  $\mu$ l growth medium. In the metformin treatment experiments, cells were plated at  $5 \times 10^3$  cells/well 24–28 hours prior to the assay.

*Mitochondrial activity* was evaluated using the *Seahorse XF Cell Mito stress Test Kit*, according to manufacturer's instructions (Agilent). Oligomycin (75351, Sigma-Aldrich), FCCP (C2920, Sigma-Aldrich), and Rotenone/Antimycin A (R8875 and A8674, Sigma-Aldrich) were used at 1.5  $\mu$ M concentration, after a titration experiment.

*Glycolytic activity* was evaluated using the *XF Glycolysis Stress Test* according to manufacturer's instructions (Agilent). Glucose (G8769, Sigma-Aldrich) was used at 10 mM, oligomycin at 1  $\mu$ M and 2-D-Deoxy-Glucose at 50 mM (D6134, Sigma-Aldrich).

*Cell content* was normalized using crystal violet. The post-normalization values of OCR and ECAR reflect both the metabolic activities of the cells and the number of cells being measured. Data were further processed according to manufacturer's instructions.

*L-Lactate* was quantified using L-lactate assay kit (ab65331, Abcam) according to the manufacturer's protocol. Briefly, fibroblasts were seeded at  $20 \times 10^4$  cells in T75 flasks. After 48h, fibroblasts were detached and counted for

posterior normalization. Cell pellet was homogenized in 50  $\mu\text{L}$  of lactate assay buffer and deproteinized using TCA (ab204708, Abcam).

### **Total ROS measurement**

A total of  $1 \times 10^3$  fibroblasts were plated in 96-well plates and grown for 3 days. Afterwards, *ROS-Glo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Assay* (G8820, Promega) was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrate was employed that reacts directly with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to generate a luciferin precursor and, upon addition of a detection reagent, the precursor is converted to luciferin, which generates a luminescent signal that is proportional to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration. White flat bottom plates (Corning) were used for final readout in a PHERAstar (BMG Labtech) luminometer plate reader.

### **Mitochondrial ROS production and mitochondrial content measurement**

Mitochondrial ROS analysis was performed using the dye *MitoSOX* (M36008, Invitrogen). Mitochondrial content was assayed using the dye *MitoTracker FM* (M22425, Invitrogen), which passively diffuses across the plasma membrane and accumulates in active mitochondria.

$20 \times 10^4$  fibroblasts per condition were grown for two days, reaching 70% confluence in p100 plates. Cells were detached using trypsin for 5 min at 37 °C. For MitoSOX staining, cells were washed once using warm HBSS, incubated with 5  $\mu\text{M}$  MitoSOX in HBSS for 30 min at 37 °C, washed 3x using warm HBSS and suspended in HBSS. For MitoTracker staining, cells were washed with PBS, incubated with 0.2  $\mu\text{M}$  MitoTracker for 30 min at 37 °C, washed 3x using warm PBS and suspended in PBS. Cells were directly analyzed via flow cytometry. In FSC and SSC, we first gated the population; next, two gates were set on SSC-A vs. SSC-H and SSC-A vs. SSC-W to exclude doublets. Based on an unstained control, MitoSOX+ and MitoTracker+ gates were set. Mean fluorescence of MitoSOX+ was normalized as a

mean fluorescence of MitoTracker values, which represents ROS production per mitochondria. Antimycin was used as a positive control and FCCP as a negative control.

### **Mitochondrial membrane potential measurement**

20x10<sup>4</sup> fibroblasts per condition were grown for 2 days, reaching 70% confluence in p100 plates. Cells were detached using trypsin for 5 min at 37 °C. We used 1 µM of *Rhodamine 123* (Invitrogen) for 15 min at 37 °C to measure the mitochondrial membrane potential. This probe is readily sequestered by functioning mitochondria and is easily washed out of cells once the mitochondria experience a loss in membrane potential.

### **Cell Viability**

Fibroblasts were seeded in 96-well plates followed by treatment with metformin for 72 h. Viable cells were quantified using the modified 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich) assay in six replicates per condition.

### **Fibroblasts mRNA expression analysis**

Total RNA was extracted using TRIzol (Life Technologies). Reverse transcription was performed using random priming and the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, with dsDNase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's guidelines. Quantitative PCR (qPCR) was performed using Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 10 mM of each primer and 20 ng of cDNA, in a CFX384 thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Primer sequences will be given upon request. Variations in RNA input were corrected by analyzing the expression of GAPDH as a housekeeping gene. The  $\Delta\Delta CT$  method was used for relative quantification.

## Western Blot and Immunofluorescence analysis

For *immunofluorescence assays*,  $12 \times 10^3$  fibroblasts (or  $5 \times 10^3$  with metformin treatment) were seeded in immunofluorescence chambers and after 24-28h were processed following standard procedures previously described [40]. To evaluate *cell proliferation*, we use primary antibodies against phospho Histone H3 Ser10 (ab14955, Abcam) and Ki67 (ab15580, Abcam). To evaluate *mitochondria biogenesis*, we use primary antibodies against TOMM20 (11802-1-AP, Proteintech) and PGC1- $\alpha$  (NBP1-04676, Novus Biologicals). For *5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) assay*, Click-iTTM EdU Cell Proliferation Kit for Imaging, Alexa Fluor™ 488 dye was used (C10337, Invitrogen) following manufacturer's protocol. Finally, cells were stained with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) to stain nuclei and slides were mounted with Fluoro-Gel Mounting medium (#17985, Electron Microscopy Sciences). Immunofluorescence images were obtained with a Nikon Eclipse 80i microscope using NIS Elements Advances Research software.

For *western-blot assays*,  $20 \times 10^4$  fibroblasts were seeded in T75 flasks and after 24-28h were processed following standard procedures previously described [57]. We use the following primary antibodies: phospho p38MAPK Thr180/Tyr182 (9211, Cell Signaling), p38MAPK (sc-7972, Santa Cruz Biotechnology) AKT1/2/3 (sc-8312, Santa Cruz Biotechnology), phospho AKT Ser 473 (9271, Cell Signaling), DMPK (sc-134319, Santa Cruz Biotechnology), MBNL1 (ab45899, Abcam) and  $\beta$ -actin (AC-15, Sigma-Aldrich). We used HRP-linked antibodies (Santa Cruz Biotechnology) and the detection was performed by chemiluminescence using *Novex ECL Chemi Substrate* (Thermo Fisher).

## Statistics

Data are presented as mean values  $\pm$  S.E.M., with the number of experiments (n) in parentheses. Unless otherwise indicated, statistical significance (p-values) was calculated using the Student's t -test. Asterisks (\*, \*\*, and \*\*\*)

indicate statistical significance ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.001$ , respectively). Correlation analyses were done using Pearson coefficient when samples were normally distributed or Spearman coefficient when samples were not normally distributed using GraphPad.

### ***ACKNOWLEDGEMENTS AND FUNDING***

MG-P and AS-A are recipients of predoctoral fellowships from the University of the Basque Country (PIF 15/245) and Carlos III Institute (FI17/00250) respectively. The Authors would like to thank Miren Zulaica for technical help with fibroblasts isolation and culture and the Cell Culture Platform of the Biodonostia Health Research Institute, Monica Zufiria and Maddalen Otaegi-Ugartemendia for their help with SeaHorse Experiments. This work was supported by grants from the Instituto Salud Carlos III and FEDER funds (CP16/00039, PI16/01580, PI17/01841) and Health department from Basque Country (2017 and 2018-2017222021).

### ***AUTHOR CONTRIBUTIONS***

MG-P and AS-A performed all the experiments on fibroblasts. MG-P analyzed the results and completed the figures. RF-T and ALM collected clinical data and samples from the patients. AM and ALM directed the project, contributed to data analysis, and wrote the manuscript.

The authors declare no competing financial interests.

## REFERENCES

1. Udd B, Krahe R. The myotonic dystrophies: molecular, clinical, and therapeutic challenges. *Lancet Neurol.* 2012 Oct;11(10):891-905.
2. Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell.* 1992 Feb 21;68(4):799-808.
3. Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, Jacobsen JF, Kress W, Naylor SL, et al. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science.* 2001 Aug 3;293(5531):864-7.
4. Lee JE, Cooper TA. Pathogenic mechanisms of myotonic dystrophy. *Biochem Soc Trans.* 2009 Dec;37(Pt 6):1281-6.
5. Sznajder LJ, Swanson MS. Short Tandem Repeat Expansions and RNA-Mediated Pathogenesis in Myotonic Dystrophy. *Int J Mol Sci.* 2019 Jul 9;20(13).
6. Martorell L, Monckton DG, Gamez J, Johnson KJ, Gich I, Lopez de Munain A, et al. Progression of somatic CTG repeat length heterogeneity in the blood cells of myotonic dystrophy patients. *Hum Mol Genet.* 1998 Feb;7(2):307-12.
7. Mateos-Aierdi AJ, Goicoechea M, Aiastui A, Fernandez-Torron R, Garcia-Puga M, Matheu A, et al. Muscle wasting in myotonic dystrophies: a model of premature aging. *Front Aging Neurosci.* 2015;7:125.
8. Meinke P, Hintze S, Limmer S, Schoser B. Myotonic Dystrophy-A Progeroid Disease? *Front Neurol.* 2018;9:601.
9. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013 Jun 6;153(6):1194-217.
10. Lopez-Otin C, Galluzzi L, Freije JMP, Madeo F, Kroemer G. Metabolic Control of Longevity. *Cell.* 2016 Aug 11;166(4):802-21.
11. Mattson MP, Arumugam TV. Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. *Cell Metab.* 2018 Jun 5;27(6):1176-99.
12. Kennedy BK, Berger SL, Brunet A, Campisi J, Cuervo AM, Epel ES, et al. Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell.* 2014 Nov 06;159(4):709-13.
13. Tedeschi D, Lombardi V, Mancuso M, Martelli F, Sighieri C, Rocchi A, et al. Potential involvement of ubiquinone in myotonic dystrophy pathophysiology: new diagnostic approaches for new rationale therapeutics. *Neurol Sci.* 2000;21(5 Suppl):S979-80.
14. Siciliano G, Mancuso M, Tedeschi D, Manca ML, Renna MR, Lombardi V, et al. Coenzyme Q10, exercise lactate and CTG trinucleotide expansion in myotonic dystrophy. *Brain Res Bull.* 2001 Oct-Nov 1;56(3-4):405-10.
15. Ferrick DA, Neilson A, Beeson C. Advances in measuring cellular bioenergetics using extracellular flux. *Drug Discov Today.* 2008 Mar;13(5-6):268-74.
16. Wu M, Falasca M, Blough ER. Akt/protein kinase B in skeletal muscle physiology and pathology. *J Cell Physiol.* 2011 Jan;226(1):29-36.
17. Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem.* 2010;47:69-84.
18. Kang I, Chu CT, Kaufman BA. The mitochondrial transcription factor TFAM in neurodegeneration: emerging evidence and mechanisms. *FEBS Lett.* 2018 Mar;592(5):793-811.
19. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature reviews.* 2010 Dec;11(12):872-84.
20. Liu L, Liao X, Wu H, Li Y, Zhu Y, Chen Q. Mitophagy and its contribution to metabolic and aging associated disorders. *Antioxid Redox Signal.* 2020 Jan 22.

## CAPÍTULO 4

21. Fernandez-Torron R, Garcia-Puga M, Emparanza JI, Maneiro M, Cobo AM, Poza JJ, et al. Cancer risk in DM1 is sex-related and linked to miRNA-200/141 downregulation. *Neurology*. 2016 Sep 20;87(12):1250-7.
22. Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nature reviews*. 2012 Mar 7;13(4):225-38.
23. Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Dmitriev AA, Alekseev BY, Kardymon OL, Sadritdinova AF, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*. 2016 Jul 19;7(29):44879-905.
24. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J*. 2010 Aug 1;429(3):403-17.
25. Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem*. 1996 Feb 23;271(8):4138-42.
26. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 2017 Sep;60(9):1577-85.
27. Wang Y, An H, Liu T, Qin C, Sesaki H, Guo S, et al. Metformin Improves Mitochondrial Respiratory Activity through Activation of AMPK. *Cell Rep*. 2019 Nov 5;29(6):1511-23 e5.
28. Moiseeva O, Deschenes-Simard X, St-Germain E, Igelmann S, Huot G, Cadar AE, et al. Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF-kappaB activation. *Aging Cell*. 2013 Jun;12(3):489-98.
29. Novelle MG, Ali A, Dieguez C, Bernier M, de Cabo R. Metformin: A Hopeful Promise in Aging Research. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(3).
30. Bigot A, Klein AF, Gasnier E, Jacquemin V, Ravassard P, Butler-Browne G, et al. Large CTG repeats trigger p16-dependent premature senescence in myotonic dystrophy type 1 muscle precursor cells. *Am J Pathol*. 2009 Apr;174(4):1435-42.
31. Tigges J, Krutmann J, Fritsche E, Haendeler J, Schaal H, Fischer JW, et al. The hallmarks of fibroblast ageing. *Mech Ageing Dev*. 2014 Jun;138:26-44.
32. Ueda H, Shimokawa M, Yamamoto M, Kameda N, Mizusawa H, Baba T, et al. Decreased expression of myotonic dystrophy protein kinase and disorganization of sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle of myotonic dystrophy. *J Neurol Sci*. 1999 Jan 1;162(1):38-50.
33. Morrone A, Pegoraro E, Angelini C, Zammarchi E, Marconi G, Hoffman EP. RNA metabolism in myotonic dystrophy: patient muscle shows decreased insulin receptor RNA and protein consistent with abnormal insulin resistance. *J Clin Invest*. 1997 Apr 1;99(7):1691-8.
34. Savkur RS, Philips AV, Cooper TA. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet*. 2001 Sep;29(1):40-7.
35. Gutierrez Gutierrez G, Diaz-Manera J, Almendrote M, Azriel S, Eulalia Barcena J, Cabezudo Garcia P, et al. Clinical guide for the diagnosis and follow-up of myotonic dystrophy type 1, MD1 or Steinert's disease. *Neurologia*. 2019 Apr 16.
36. Campbell JM, Bellman SM, Stephenson MD, Lisy K. Metformin reduces all-cause mortality and diseases of ageing independent of its effect on diabetes control: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev*. 2017 Nov;40:31-44.
37. Laustriat D, Gide J, Barrault L, Chautard E, Benoit C, Auboeuf D, et al. In Vitro and In Vivo Modulation of Alternative Splicing by the Biguanide Metformin. *Molecular therapy Nucleic acids*. 2015 Nov 3;4:e262.
38. Alsaggaf R, Pfeiffer RM, Wang Y, St George DMM, Zhan M, Wagner KR, et al. Diabetes, Metformin, and Cancer Risk in Myotonic Dystrophy Type I. *International journal of cancer*. 2019 Nov 20.
39. Bassez G, Audureau E, Hogrel JY, Arrouasse R, Baghdoyan S, Bhugaloo H, et al. Improved mobility with metformin in patients with myotonic dystrophy type 1: a randomized controlled trial. *Brain*. 2018 Oct 1;141(10):2855-65.







## ***RESULTADOS: CAPÍTULO 5***

---



# **CAPÍTULO 5**

**Ahulkenoids restore multiple phenotypes *in vitro* and  
*in vivo* in Myotonic Dystrophy type 1**

Artículo en preparación





## ***DISCUSIÓN GENERAL***

---



La DM1 es un tipo de distrofia muscular que se caracteriza por la afectación no sólo del sistema muscular sino también del resto de sistemas vitales, lo que la define como un desorden multisistémico complejo. En la DM1 los ARNs producto de las secuencias de ADN que contienen las expansiones CTG se retienen y se acumulan en el núcleo celular interfiriendo con los reguladores de "splicing" de las familias de MBNL y de CUGBP. La alteración en la función de estos dos genes, junto con la expresión reducida de *DMPK* y de los genes adyacentes *SIX5* y *DMWD*, va a desencadenar multitud de alteraciones moleculares en la célula.

La hipótesis de partida de esta tesis es que los pacientes con DM1 presentan a nivel celular una exacerbación o una aparición precoz de los procesos biológicos característicos del envejecimiento fisiológico (López-Otín *et al.*, 2013), que se basa en la observación clínica de múltiples signos de envejecimiento en pacientes DM1 de manera prematura.

En primer lugar, abordamos la caracterización de fibroblastos derivados de pacientes con DM1, que presentan los fenómenos de envejecimiento celular observados en dichos pacientes. Así, observamos, que los fibroblastos derivados de estos pacientes presentan alteraciones de procesos clave del envejecimiento como una disminución en la proliferación y en la división celular, una pérdida en la respuesta al daño en el ADN, un descenso en el metabolismo mitocondrial y una entrada prematura en senescencia. Por otra parte, también describimos un acortamiento telomérico exacerbado en muestras sanguíneas de pacientes con DM1. Además, a nivel clínico observamos que los pacientes con DM1 presentan un mayor riesgo a desarrollar cáncer, identificando, asimismo, las vías moleculares alteradas que se encuentran asociadas a este fenómeno.

El carácter multisistémico de la enfermedad se traduce en la aparición de un conjunto de rasgos como son la atrofia muscular, las cataratas, la alopecia, el síndrome metabólico, los trastornos cardíacos y las alteraciones en el SNC, entre

## DISCUSIÓN

otros. Todas estas alteraciones tomadas globalmente, podrían ser caracterizadas como un proceso de envejecimiento prematuro. Los resultados de esta tesis confirman que los pacientes con DM1 presentan un envejecimiento celular prematuro y un mayor riesgo oncogénico. Por tanto, esta tesis describe los mecanismos biológicos que justifican, al menos en parte, la aparición de este proceso degenerativo.

En la actualidad no existe un tratamiento eficaz que revierta o detenga el desarrollo de la DM1. Las aproximaciones existentes están dirigidas a corregir alteraciones moleculares concretas de la enfermedad, sin una visión global de la entidad.

Empleando un enfoque novedoso, hemos empleado compuestos que han demostrado tener potencial antienvjecimiento, como son los compuestos senolíticos y la metformina, además de nuevas moléculas de desarrollo propio (los compuestos ahulkenoides, AHK). En este sentido, observamos que estas tres nuevas aproximaciones terapéuticas son capaces de revertir, al menos parcialmente, y por mecanismos diferentes, los fenotipos asociados a la DM1, tanto en cultivos celulares como en un modelo animal (*Drosophila melanogaster*) de la enfermedad.

En resumen, en esta tesis constatamos la hipótesis de que los pacientes con DM1 presentan rasgos asociados a un envejecimiento prematuro y proponemos el tratamiento con compuestos antienvjecimiento como una alternativa terapéutica para esta entidad clínica.

## **1. ALTERACIONES DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN EL ENVEJECIMIENTO EN LA DM1**

### **1.1. Alteración del ciclo celular, la división celular y la respuesta al daño en el ADN**

Para la caracterización a nivel celular y molecular de la DM1, hemos establecido como modelo el cultivo primario de fibroblastos aislados de la piel, derivados de pacientes con DM1. Dicho modelo celular recapitula las alteraciones moleculares del proceso del envejecimiento (Tigges *et al.*, 2014).

Hemos observado que las diferentes alteraciones características de la DM1 son recapituladas por los fibroblastos derivados de pacientes con DM1, como son la reducción en la expresión tanto de DMPK, como de *SIX5*, la acumulación nuclear de CUGBP1, la presencia de la isoforma neonatal de *MBNL2*, la cual incluye el exón 7, y la presencia de *foci* nucleares. Estos datos indican que los fibroblastos constituyen un modelo apropiado para el estudio de la DM1.

Por otro lado, el uso de fibroblastos primarios tiene otras ventajas. Frente a las células inmortalizadas genéticamente, son más representativos de la fisiología celular, y frente a las células musculares como mioblastos o células satélite presentan la ventaja de que su obtención y aislamiento es más sencilla y menos invasiva.

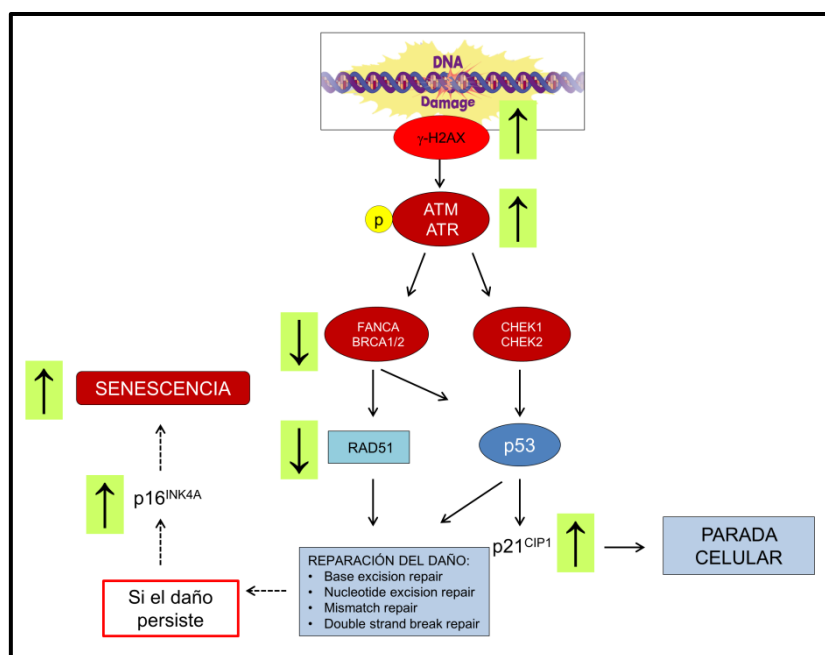
Para caracterizar los procesos moleculares alterados en la DM1 realizamos un análisis del transcriptoma comparando fibroblastos primarios DM1 y fibroblastos control a pase temprano, así como diferentes ensayos funcionales. Describimos que los fibroblastos derivados de pacientes con DM1 presentaban una disminución de los procesos de proliferación y un incremento de la senescencia celular. Sin embargo, nuestro estudio pone de manifiesto la alteración de vías adicionales como la regulación del ciclo celular, la división y replicación celular, el metabolismo

## DISCUSIÓN

celular y la reparación del daño en el ADN. Estas vías moleculares se encuentran alteradas, además de en fibroblastos, también en mioblastos primarios DM1, en los tejidos musculares de dos modelos *in vivo* de la enfermedad como el ratón DMSXL con más de 2.000 repeticiones CTG introducidas de manera multisistémica (Huguet *et al.*, 2012) y el modelo i(CUG)<sub>480</sub> en *D. melanogaster* (García-López *et al.*, 2008), que posee 480 repeticiones en el tejido muscular, así como en las PBMC derivadas de los pacientes con DM1. Todos estos datos refuerzan la idea de que estos procesos son importantes en la enfermedad, ya que se reproducen en varios tipos celulares diferentes. Además, estas vías podrían proveer de nuevos biomarcadores útiles para monitorizar el éxito de las aproximaciones terapéuticas para la DM1 planteadas en esta tesis.

La señalización celular ante un daño en el ADN es uno de los procesos alterados a nivel molecular en los fibroblastos DM1. La ruta de BRCA1/2 - FANCA es la principal ruta que regula la respuesta celular ante el daño en el ADN, cooperando con proteínas señalizadoras de daño como ATM, y con otras proteínas de respuesta a este daño, como RAD51 y POLQ (D'Andrea and Grompe, 2003). En nuestro estudio describimos que los fibroblastos DM1 presentan una señalización anormal cuando se produce el daño en el ADN, y además, una menor reparación del mismo. Esta idea es corroborada funcionalmente en nuestro estudio, ya que, tras inducir un daño en el ADN mediante el tratamiento con el agente intercalante doxorrubicina, los fibroblastos DM1 acumulan mayores niveles de  $\gamma$ -H2AX, marcador de respuesta al daño en el ADN, y una mayor activación de fosfo-ATM (**Figura D1**). Además, el silenciamiento de BRCA1 en fibroblastos DM1 disminuye dichos marcadores, tras la inducción de daño en el ADN y también reduce su capacidad proliferativa. Es importante destacar que existe una interconexión de esta ruta de señalización con los procesos de parada de la proliferación y división celular, ya que se ha observado que AURK activa a BRCA1/FA (Chun *et al.*, 2016) y que la inhibición de CDK2 resulta en un incremento en el daño al ADN (Liu *et al.*, 2020), entre otros ejemplos.

La contribución en la patogénesis de la DM1 de las proteínas implicadas tanto en la reparación como en la señalización tras un daño en el ADN no se había estudiado previamente en profundidad. Sin embargo, sí que había ciertos indicios de que, tanto en la DM1, como en otras enfermedades producidas por expansión de nucleótidos, los mecanismos de reparación del ADN juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (Jones *et al.*, 2017; Kosmider and Wells, 2006). Por un lado, DMPK se activa en respuesta a doxorubicina a través de p53 (Itoh *et al.*, 2019). Además, otros autores han observado que la inestabilidad del triplete CTG está mediada por las proteínas Msh implicadas en la reparación del ADN (Seriola *et al.*, 2011; Tomé *et al.*, 2009; van den Broek *et al.*, 2002). En modelos de otras enfermedades causadas por expansión de trinucleótidos, como en la enfermedad de Huntington, se observa asimismo una acumulación de  $\gamma$ -H2AX (Enokido *et al.*, 2010; Illuzzi *et al.*, 2009).



**Figura D1.** Los fibroblastos derivados de pacientes con DM1 poseen una disminución en la señalización celular tras un daño en el ADN y en la respuesta a la reparación de dicho daño. En la imagen se representa mediante flechas un resumen con las alteraciones principales identificadas en esta tesis; una mayor acumulación del marcador de daño en el ADN  $\gamma$ -H2AX junto con mayores niveles de fosfo-ATM. Además, se observa una disminución en la expresión de *BRCA1* y *2*, *FANCA* y *RAD51*, junto con *POLQ*. La presencia de daño en el ADN provocaría una activación de las rutas de reparación de dicho daño y una parada del ciclo celular.

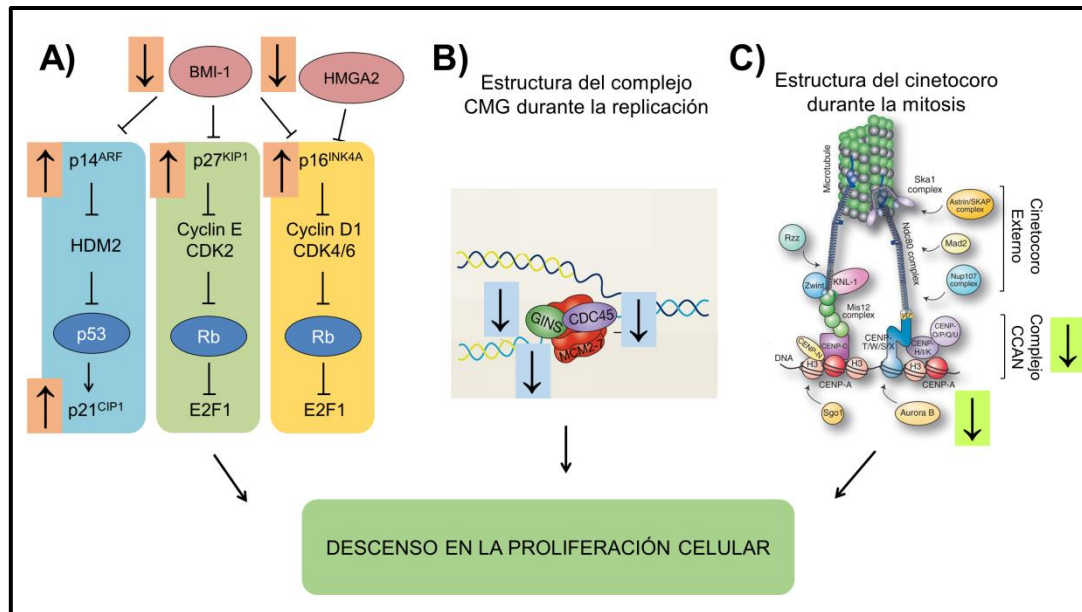
## DISCUSIÓN

Estudios previos habían investigado el potencial proliferativo de células derivadas de pacientes con DM, encontrando una proliferación normal (Hartwig *et al.*, 1982; Wertz *et al.*, 1981) o reducida, junto con una senescencia prematura (Bigot *et al.*, 2009; Denis *et al.*, 2013; Furling *et al.*, 2001; Renna *et al.*, 2014), aunque dichos estudios se habían realizado fundamentalmente en células con un origen muscular. Recientemente, un nuevo estudio ha descrito una proliferación reducida en células madre de origen muscular, rescatada mediante la sobreexpresión de MBNL1 y de mTOR (Song *et al.*, 2020). En nuestro estudio, describimos que tanto los fibroblastos como los mioblastos DM1 presentan una proliferación reducida y una entrada prematura en senescencia. Las diferencias entre nuestro estudio y los estudios previos pueden deberse al propio aislamiento y mantenimiento de los cultivos celulares, así como al método empleado para evaluar la proliferación. En este sentido, en los estudios donde describen una proliferación normal (Hartwig *et al.*, 1982; Wertz *et al.*, 1981), la metodología difiere sustancialmente, ya que no mantienen una densidad celular constante a lo largo de los pases como es nuestro caso. Las diferencias también pueden deberse al tamaño de la expansión CTG, que no ha sido determinada en dichos estudios (Hartwig *et al.*, 1982; Wertz *et al.*, 1981). Otro punto diferencial de los estudios anteriores es que no determinan si los pacientes de los que habían sido aislados los fibroblastos corresponden a DM1 o DM2 (Hartwig *et al.*, 1982; Wertz *et al.*, 1981). En esta dirección, es importante destacar que el mecanismo molecular detrás de la reducción en la capacidad proliferativa parece ser diferente entre DM1 y DM2, ya que no se observa una alteración de p16<sup>INK4a</sup> en células DM2 (Meinke *et al.*, 2018; Renna *et al.*, 2014). En nuestro estudio describimos que los niveles elevados de p16<sup>INK4a</sup> se producen a pase temprano tanto en fibroblastos como en mioblastos, pero dichos niveles se exacerban en células DM1 a pase tardío, cuando las células han sido sometidas a intensas dosis de un estrés continuo por el mero hecho de mantenerlas en cultivo (Sherr and DePinho, 2000).

Por otro lado, el estudio transcriptómico y los ensayos funcionales describieron un mecanismo más complejo, con la alteración de varias rutas celulares que están implicadas en el control del ciclo celular. En este sentido, describimos niveles elevados BMI1 y HMGA2, ambos reguladores de p16<sup>INK4a</sup> (Jacobs *et al.*, 1999; Nishino *et al.*, 2008); un descenso en los moduladores de la transición G0/S como CDK2 y CDK6; y una acumulación de los inhibidores de CDK como p14<sup>ARF</sup>, p21<sup>CIP1</sup> y p27<sup>KIP1</sup>. p16<sup>INK4a</sup> actúa a través de Rb, y p14<sup>ARF</sup> y p21<sup>CIP1</sup> son los reguladores y dianas principales de p53 (Carrasco-García *et al.*, 2017; Matheu *et al.*, 2008), lo que confirma que la reducción en la capacidad proliferativa de las células DM1 no está mediada únicamente por una de las vías.

Adicionalmente estudiamos la expresión de las vías alteradas en el transcriptoma en otros modelos de la DM1 como los mioblastos, el tejido muscular del ratón DMSXL y de *D. melanogaster*, así como las PBMC de pacientes con DM1 y describimos alteraciones similares a las observadas en los fibroblastos DM1 en la expresión de los genes implicados en el control del ciclo celular, la división celular y el daño en el ADN.

Nuestro estudio revela la implicación de la alteración de varias vías moleculares, posiblemente interconectadas, en la DM1, que convergen todas ellas en una pérdida en la capacidad proliferativa de las células DM1 (**Figura D2.**). En este sentido, las alteraciones propias de la DM1, como son una expresión reducida de DMPK, así como la acumulación de los transcritos mutados en la célula, entre otras muchas, podrían estar promoviendo un estrés adicional a la célula al que respondería con una parada en la proliferación celular.



**Figura D2.** La alteración en la regulación del ciclo celular, junto con un descenso en la expresión de las proteínas que forman el complejo helicasa CMG y el nucleosoma provocan un descenso en la proliferación celular en fibroblastos DM1, que se manifiesta con un descenso en los marcadores de proliferación pH3, Ki-67 y EdU. **A)** Se representan los diferentes reguladores del ciclo celular alterados en fibroblastos derivados de pacientes con DM1, donde observamos un descenso en la expresión de BMI1 y *HMGA2* junto con una acumulación de *p16<sup>INK4a</sup>*, *p14<sup>ARF</sup>*, *p27<sup>KIP1</sup>* y *p21<sup>CIP1</sup>*. **B)** El complejo CMG es una helicasa que está formada por las proteínas *CDC45*, *GINS* y el complejo de *MCM2-7*, cuya expresión se ve reducida en fibroblastos DM1. En la imagen se representa su estructura durante la replicación del ADN (modificado de Gaggioli and Zegerman, 2017). **C)** En la imagen se representa la estructura y organización del cinetocoro durante la mitosis. La fosforilación del complejo CDK/Ciclina B provoca la entrada en mitosis y la correcta organización del cinetocoro. En la imagen se representa una expresión reducida de la aurora kinasa B (*AURKB*), cuya función es evitar un ensamblaje incorrecto del cinetocoro a los microtúbulos, así como una reducción de *CENPA*, *CENPE* y *CENPI*, estos últimos pertenecientes al complejo asociado al centrómero (CCAN, del inglés "Constitutive Centromere-Associated Network"). Modificado de Cheeseman, 2014 .



## 1.2. Entrada prematura en senescencia en fibroblastos DM1

La senescencia celular es un proceso biológico que provoca la incapacidad de las células para proliferar, quedándose retenidas en la fase G0 del ciclo celular, aunque éstas siguen siendo activas metabólicamente. Es un mecanismo fisiológico conservado que se encarga del remodelado tisular durante el desarrollo embrionario, pero que también se produce en la edad adulta cuando existe un daño (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

Nuestros resultados describen un descenso en los procesos del control del ciclo celular, de la división celular y de la replicación y reparación del ADN como eventos previos al desarrollo de una senescencia prematura en fibroblastos primarios DM1. El mantenimiento de las células primarias en cultivo en altas concentraciones de oxígeno conlleva un estrés que provoca que vayan perdiendo su capacidad proliferativa hasta entrar en senescencia (Hayflick and Moorhead, 1961), debido a la activación de las vías de p16/Rb, de p53 y al acortamiento telomérico que se produce en cada división celular (Gorgoulis *et al.*, 2019). En nuestro trabajo observamos que los fibroblastos DM1 experimentan el cese de la proliferación y la entrada en estado senescente, tras un número inferior de divisiones celulares respecto a los fibroblastos derivados de sujetos sanos. Además, este proceso se acompaña de alteraciones moleculares características, como una mayor expresión de p16<sup>INK4a</sup>, p14<sup>ARF</sup>, p21<sup>CIP1</sup> y p27<sup>KIP1</sup>, y fisiológicas, como una actividad  $\beta$ -galactosidasa incrementada y un cambio en la morfología.

Las células senescentes se comunican con su entorno secretando un conjunto de factores solubles y citoquinas proinflamatorias. Se trata del fenotipo denominado *SASP* (del inglés "*Senescence Associated Secretory Phenotype*") (Acosta *et al.*, 2013; Coppé *et al.*, 2008; Herranz and Gil, 2018; Kuilman *et al.*, 2010), mediante el cual las células senescentes interactúan con las células de su entorno a través de un mecanismo paracrino. En este sentido, observamos que los

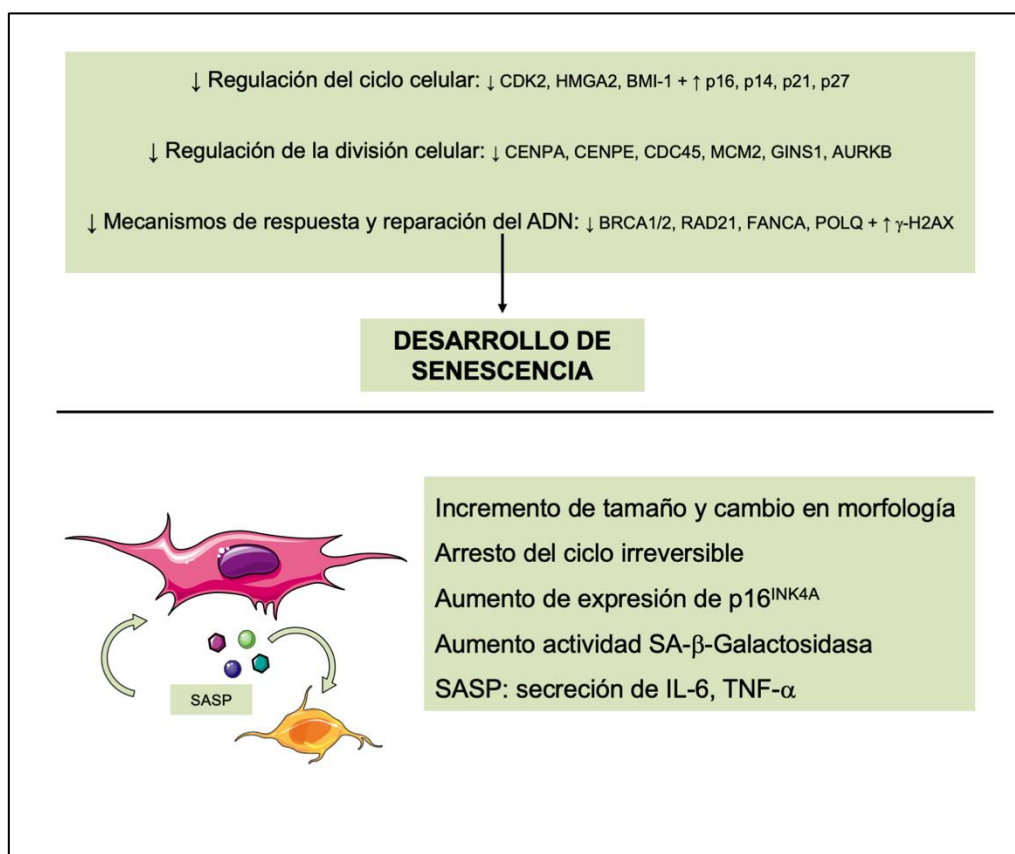
## DISCUSIÓN

fibroblastos DM1 tienen un perfil de secreción inflamatorio diferente al de las células control, con una mayor secreción de distintas citoquinas proinflamatorias, entre ellas IL-1, IL-8, INF- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y CCL5. Validamos que los niveles de expresión de IL-6, TNF- $\alpha$  y CCL5 están aumentados en fibroblastos DM1 a pase temprano y especialmente a pase tardío. En este sentido, las células DM1 presentan un perfil de expresión de citoquinas diferencial que sugiere presencia de SASP. En esta dirección, se ha observado un aumento de la inflamación en pacientes con DM1, asociándose niveles elevados de TNF- $\alpha$  con la resistencia a la insulina, la dislipemia y la función cardiaca (Fernández-Real *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 2000; Mammarella *et al.*, 2002).

La expresión aumentada de p16<sup>INK4a</sup>, p14<sup>ARF</sup>, p21<sup>CIP1</sup> y p27<sup>KIP1</sup> se ha observado también en mioblastos y PBMC (que como se discutirá más adelante, presentan además un acortamiento telomérico prematuro) así como en los tejidos musculares de los modelos animales de DM1 en ratón y mosca, evidencias que sugieren la existencia de una senescencia incrementada *in vivo* en células de DM1. IL-6 es la citoquina pro-inflamatoria clave en el desarrollo de la senescencia y característica del SASP (Mosteiro *et al.*, 2016). Los niveles aumentados en fibroblastos, así como en PBMC refuerzan la idea de una senescencia prematura en la DM1 y sugieren que podría estar jugando un papel importante en la patogénesis de esta enfermedad. En este sentido, se ha descrito una asociación entre los niveles elevados de IL-6 y el grado de inmadurez muscular en la forma congénita de la DM1. Además, se ha determinado que la introducción exógena de las repeticiones CTG y su consiguiente acumulación aumentan el estrés celular, y con ello la secreción de dicha citoquina, contribuyendo, a su vez, a una mayor atrofia y desgaste muscular (Muñoz-Cánoves *et al.*, 2013; Nakamori *et al.*, 2017).

Nuestros resultados demuestran que la alteración en el ciclo celular, la proliferación, la división celular, así como en la reparación del ADN, provocan que

las células DM1 no puedan responder de manera adecuada al estrés fisiológico y, posteriormente, entren prematuramente en senescencia (**Figura D3**).



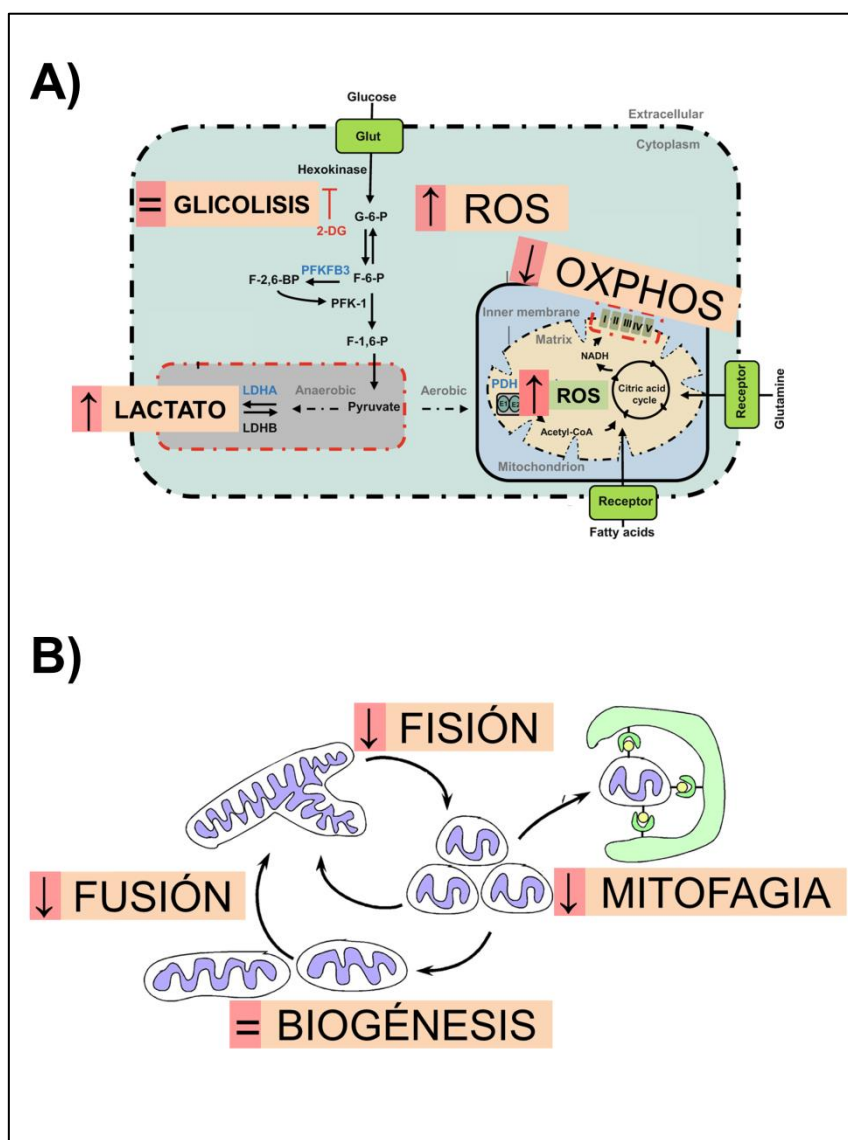
**Figura D3.** En la parte superior se enumeran los procesos moleculares alterados en este estudio en fibroblastos, mioblastos, tejido muscular del ratón DMSXL y de la mosca DM1, así como en PBMC derivadas de pacientes con DM1. Estos procesos serían previos al desarrollo de la senescencia celular. En la parte inferior se enumeran las características que presenta un fibroblasto senescente derivado de pacientes con DM1: un incremento en su tamaño y cambios en su morfología, un arresto del ciclo celular mediante un aumento en la expresión de reguladores del ciclo celular como p16<sup>INK4</sup>, p14<sup>ARF</sup>, p21<sup>CIP1</sup> y p27<sup>KIP1</sup>, y un descenso de BMI1, HMGA2 y CDK2, así como un aumento en la actividad SA  $\beta$ -galactosidasa y una secreción al entorno de factores y citoquinas pro-inflamatorias.

### 1.3. Disfunción mitocondrial en DM1

En nuestro estudio también observamos que los fibroblastos DM1 tienen una menor producción de ATP mediante fosforilación oxidativa, con una menor eficiencia en la cadena de transporte de electrones mitocondrial y una mayor producción de lactato. Además, observamos una mayor acumulación de ROS total, pero también un incremento de ROS producido específicamente por las mitocondrias, junto a una mayor acumulación de p38 MAPK, mediador principal de la respuesta al estrés celular (Cuadrado and Nebreda, 2010). Por otra parte, nuestro estudio revela que, aunque no haya cambios en la biogénesis de las mitocondrias en células DM1, sí existe una alteración en los procesos de fusión (*OPA1*, *MFN1* y *MFN2*) y fisión (*DRP1*) mitocondrial y de mitofagia (*PARK*), encontrándose todos ellos reprimidos en los fibroblastos DM1. **(Figura D4)**. Los procesos de fusión y de fisión, así como de autofagia mitocondrial son procesos esenciales para mantener una mitocondria sana y funcional (Sharma *et al.*, 2019). La fisión es esencial para la eliminación de las mitocondrias defectuosas mediante mitofagia y se ha observado que dicho proceso desciende con el envejecimiento (Sharma *et al.*, 2019). En cambio, los procesos de fusión mitocondrial ayudan a mitigar el estrés mitocondrial al fusionar el contenido de mitocondrias parcialmente dañadas con mitocondrias no dañadas (Sharma *et al.*, 2019). En este sentido, en nuestro estudio estaríamos en un escenario donde, aunque no observamos un cambio en el número total de mitocondrias, sí observamos un descenso en su funcionalidad.

Este estudio es el primero que involucra el estado funcional de la mitocondria con la fisiopatología de la DM1, ya que hasta la fecha el rol de la mitocondria en esta enfermedad era prácticamente desconocido. Existían algunos estudios correlativos donde se habían descrito mayores niveles de lactato en sangre (Siciliano *et al.*, 2001), así como en cerebro de pacientes con DM1 (Gramegna *et al.*, 2018) y una acumulación de mitocondrias en el músculo (Ueda *et al.*, 1999). Estos estudios, junto con el nuestro, ponen de manifiesto la implicación de la

disfunción mitocondrial en la DM1, aspectos en el que futuros estudios deberán profundizar.



**Figura D4.** La respiración mitocondrial, la producción de ROS y los procesos dinámicos mitocondriales de fusión y fisión, además de la proliferación celular, se encuentran disminuidos en fibroblastos DM1. **A)** En la imagen se representa el metabolismo de la glucosa, donde en la glicólisis se produce piruvato que puede transformarse en lactato o entrar en la mitocondria hacia el ciclo del ácido cítrico para generar NADH, que se acopla a la producción de ATP mediante fosforilación oxidativa. Además, se muestra la producción de ROS total y mitocondrial. Se representa mediante flechas una mayor producción de lactato y de ROS, y una menor producción de ATP, todos ellos procesos alterados en fibroblastos DM1. Modificado de Yetkin-Arik *et al.*, 2019. **B)** En la imagen se representan los procesos de biogénesis, fusión, fisión y autofagia mitocondrial. Con flechas se indican aquellos procesos disminuidos en fibroblastos DM1. Modificado de Boland *et al.*, 2013.

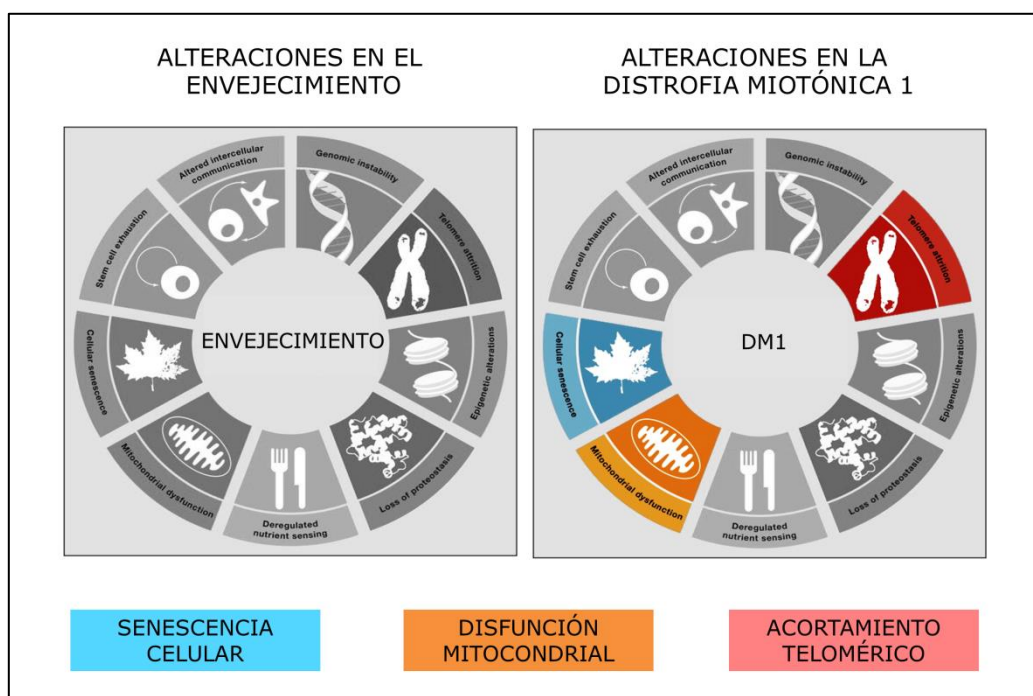
#### 1.4. Mayor acortamiento de los telómeros en DM1

El acortamiento telomérico es uno de los mecanismos moleculares más importantes del envejecimiento. Por ello estudiamos la longitud telomérica en PBMC de una cohorte compuesta por 379 pacientes con DM1 y 223 individuos sanos, observando que los pacientes con DM1 no presentaban cambios en la longitud telomérica. Además, no encontramos una asociación entre la longitud telomérica y el número de repeticiones CTG o la escala MIRS (Mathieu *et al.*, 2001). Estos resultados no fueron los esperados debido a la relevancia que tiene la longitud telomérica para el envejecimiento y la homeostasis. Sin embargo, están en línea con otros autores que tampoco encontraron diferencias o incluso observaron una mayor longitud telomérica *in vitro* en otras poblaciones celulares como en un número reducido de mioblastos y de células satélite derivados de pacientes con DM1 (Bigot *et al.*, 2009; Renna *et al.*, 2014; Thornell *et al.*, 2009).

Nuestro estudio completó un estudio longitudinal en un subgrupo de pacientes en los que se obtuvo una muestra sanguínea a dos tiempos sucesivos y pudimos analizar la longitud telomérica con el paso del tiempo. Mediante este abordaje, pudimos describir que los pacientes con DM1 poseían un acortamiento telomérico mayor que los controles sanos con el paso del tiempo. En línea con esto, sí que se había visto *in vitro* que las células satélite de formas congénitas de la DM1 presentaban un acortamiento telomérico mayor en cada división celular (Bigot *et al.*, 2009). De esta manera el acortamiento telomérico no sería un biomarcador diagnóstico de la enfermedad, pero sí podría plantearse la tasa de acortamiento telomérico como un biomarcador de progresión para esta enfermedad.

En la actualidad se desconoce por completo el mecanismo por el cual se produce este defecto en pacientes con DM1, proponiéndose que las expansiones CTG podrían interferir en la homeostasis de los telómeros (Bigot *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha propuesto que el estrés oxidativo podría estar jugando un papel

importante en este proceso. Se sabe que los telómeros son muy sensibles a dicho estrés y que se produce un acortamiento telomérico mayor en presencia de daño oxidativo (Henle *et al.*, 1999; von Zglinicki, 2002). En este sentido, nuestros resultados en fibroblastos revelan elevados niveles de estrés oxidativo, y otros trabajos han identificado un aumento de radicales libres y de estrés oxidativo en muestras de sangre de pacientes con DM1, circunstancias que podrían estar erosionando al telómero (Ihara *et al.*, 1995; Toscano *et al.*, 2005).



**Figura D5.** A la izquierda se representan las características moleculares implicadas en el proceso del envejecimiento y a la derecha, se resaltan en color aquellas que han sido estudiadas en el presente trabajo y que están alteradas en la DM1: la senescencia celular, el acortamiento telomérico y la disfunción mitocondrial. Modificado de López-Otín *et al.*, 2013.

El descenso en los procesos de división celular, la parada proliferativa, la acumulación de daño en el ADN, el aumento en la inflamación, el acortamiento telomérico, y la disfunción mitocondrial, son todos ellos procesos que ocurren durante el envejecimiento fisiológico (López-Otín *et al.*, 2013). En nuestro trabajo

describimos como todos ellos se encuentran alterados de manera exacerbada en la DM1 (**Figura D5**). Hemos identificado estas alteraciones tanto en fibroblastos como en mioblastos y en PBMC, pero también en el modelo murino DMSXL y en el modelo en mosca, presentando ambos modelos animales una supervivencia global comprometida (García-López *et al.*, 2008; Huguet *et al.*, 2012). Los resultados de esta tesis refuerzan la idea de considerar a la DM1 como una enfermedad multisistémica caracterizada por un envejecimiento prematuro (Mateos-Aierdi *et al.*, 2015; Meinke *et al.*, 2018).

## **1.5. Identificación del mayor riesgo oncogénico y sus vías moleculares implicadas en DM1**

### *1.5.1. Identificación del mayor riesgo oncogénico en DM1.*

El envejecimiento es el factor de riesgo más importante para el desarrollo del cáncer (Niccoli and Partridge, 2012). En este trabajo estudiamos el riesgo a desarrollar cáncer en DM1, a través del análisis de nuestra cohorte compuesta por más de 400 pacientes con DM1 y observamos un mayor riesgo para el desarrollo de neoplasias malignas, siendo el riesgo superior en mujeres que en hombres.

Nuestros resultados replican los de otro estudio previo realizado en Suecia y Dinamarca, aunque dicho estudio incluía pacientes sin distinción entre DM1 y DM2 (Gadalla *et al.*, 2011). Además, otros estudios confirmaron posteriormente estos resultados en cohortes poblaciones adicionales de Francia y de distintas regiones de Estados Unidos (**Tabla D1**).

En el estudio original de Gadalla *et al.*, los pacientes con DM presentaban un mayor riesgo de desarrollar cáncer de endometrio, de cerebro, de ovario y de colon. De manera muy similar, en nuestra cohorte el riesgo fue mayor para los



tumores de tiroides, de cerebro, de endometrio y de ovario. Además, no encontramos una correlación significativa entre el mayor riesgo a desarrollar cáncer con el número de repeticiones CTG y la escala MIRS. No obstante, cabe señalar que la determinación molecular de la expansión CTG se realizó en sangre y en el momento del diagnóstico de DM1, pero no en el momento del diagnóstico del cáncer ni en el propio tejido tumoral, pudiendo haber variaciones temporales y tisulares en ese intervalo de tiempo.

A día de hoy, además de nuestro trabajo, se han publicado 5 estudios adicionales de cohortes de pacientes con DM1 donde se analiza el riesgo de desarrollar cáncer (Abbott *et al.*, 2016; Alsaggaf *et al.*, 2018; Gadalla *et al.*, 2011; Mohamed *et al.*, 2013; Win *et al.*, 2012), y un metanálisis recopilatorio realizado por nuestro grupo (Emparanza *et al.*, 2018). En 4 cohortes se observa un mayor riesgo de desarrollar cáncer de tipo ginecológico, representado por cáncer de endometrio y/o de ovario, sugiriendo un riesgo mayor en mujeres que en hombres, coincidiendo con nuestros resultados. Por otro lado, las alteraciones en el tiroides y el desarrollo de melanoma se han observado en 2 estudios, seguido por el cáncer de cerebro. Los resultados del metanálisis (Emparanza *et al.*, 2018), confirmaron un mayor riesgo para las neoplasias anteriores, junto con el cáncer de testículos y colorrectal. Curiosamente, estos tipos tumorales no son los más frecuentes en la población general, a excepción del cáncer colorrectal.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar dicho riesgo a desarrollar cáncer que implican la presencia de mutaciones en la ruta de  $\beta$ -catenin, la inestabilidad genómica y la toxicidad celular provocada por las repeticiones CTG, y mutaciones en genes involucrados en la reparación del daño en el ADN (Mueller *et al.*, 2009; Rübben *et al.*, 2020). Sin embargo, la causa por la que estos pacientes tienen un mayor riesgo a desarrollar cáncer no se conoce con exactitud.

**Tabla D1.** Se presentan los diferentes estudios que han analizado el riesgo de desarrollar cáncer en pacientes con DM1.

Tipo tumoral	Fernández-Torrón & García-Puga et al., 2016	Emparanza et al., 2019	Gadalla et al., 2011	Win et al., 2012	Mohamed et al., 2013	Abbott et al., 2016	Alsaggaf et al., 2018
Tiroides	<b>23.33*</b>	<b>8.52*</b>	<b>7.10*</b>	5.54		3.78	<b>15.93*</b>
Cerebro	<b>9.80*</b>	6.20	<b>5.30*</b>	1.54			4.99
Ovario	<b>8.33*</b>	<b>5.56*</b>	<b>5.20*</b>	1.66	<b>9.30*</b>		<b>14.88*<sup>a</sup></b>
Endometrio	<b>6.86*</b>	<b>7.48*</b>	<b>7.60*</b>	1.07	<b>21.70*</b>	<b>6.98*</b>	
Testículo	14.25	<b>5.95*</b>	1.40	5.09		<b>10.74*</b>	
Melanoma	1.72	<b>2.45*</b>	2.30	<b>27.54*</b>	7.10	0.89	<b>5.98*</b>
Colorrectal	2.06	<b>2.20*</b>		1.09			1.82
Ocular			<b>12.00*</b>				
Otros del aparato reproductor femenino			<b>9.60*</b>				
Páncreas			<b>3.20*</b>				2.92
Colon			<b>2.90*</b>		5.00	2.15	
Timoma					<b>100*</b>		
Linfoma no-Hodgkin	2.86	2.75	1.80			<b>4.25*</b>	
Riñón	2.53	2.12	1.70	2.39			2.26
Pulmón	1.18	1.72	1.70	0.86	6.00		1.21
Próstata	0.46	1.19		0.70		1.43	
Mama	1.04	1.11	1.20	0.95			0.52 <sup>b</sup>
Nariz			9.00				
Hígado	2.54		4.20				

**Tabla D1.** Continuación.

Tipo tumoral	Presente estudio: Fernández-Torrón & García-Puga et al., 2016	Emparanza et al., 2019	Gadalla et al., 2011	Win et al., 2012	Mohamed et al., 2013	Abbott et al., 2016	Alsaggaf et al., 2018
<b>Esófago</b>			3.40				
<b>Recto</b>			2.20			4.56	
<b>Leucemia</b>	3.80	2.38		2.19			
<b>Leucemia aguda</b>			2.00			8.75	
<b>Leucemia crónica</b>						12.70	
<b>Vejiga</b>	0.64			1.07			
<b>Otros urinarios</b>				0.40			
<b>Mieloma múltiple</b>				3.19			
<b>Linfoma</b>				2.41			
<b>Faringe</b>			1.80				
<b>Cérvix</b>			0.90				
<b>Cabeza y cuello</b>	0.94				5.90	1.50	
<b>Estómago</b>	1.57						

\* muestra la significancia estadística  $p < 0.05$ .

<sup>a</sup> En este estudio se incluye cáncer de útero.

<sup>b</sup> En este estudio se incluyen solo mujeres.

En los estudios de Fernández-Torrón & García-Puga et al., 2016; Emparanza et al., 2019; Gadalla et al., 2011 y Win et al., 2012 se indican los SIR (del inglés, "Standardized Incidence Ratio").

En los estudios de Mohamed et al., 2013 y Abbott et al., 2016 se indica el riesgo relativo (RR).

En el estudio de Alsaggaf et al., 2019 se indica el cociente de riesgo HR (del inglés, "Hazard Ratio").

1.5.2. Identificación de las vías moleculares asociadas al mayor riesgo oncogénico en DM1.

La identificación de los mecanismos moleculares asociados al mayor riesgo de desarrollar cáncer en pacientes con DM1 era una cuestión por resolver al inicio de esta tesis. Para la identificación del mecanismo molecular responsable del mayor riesgo oncogénico realizamos un estudio de expresión génica en muestras de PBMC de pacientes con DM1 y de controles sanos. Encontramos una firma molecular asociada a pacientes con DM1 con un patrón de expresión característico de dos genes diferencialmente expresados: el pseudogén RNA5SP211 y el receptor del gusto TAS2R13. Sin embargo, cuando el análisis consideraba el sexo de los individuos, se detectaron alteraciones en la expresión en 4 genes adicionales en hombres y de otros 10 genes en mujeres.

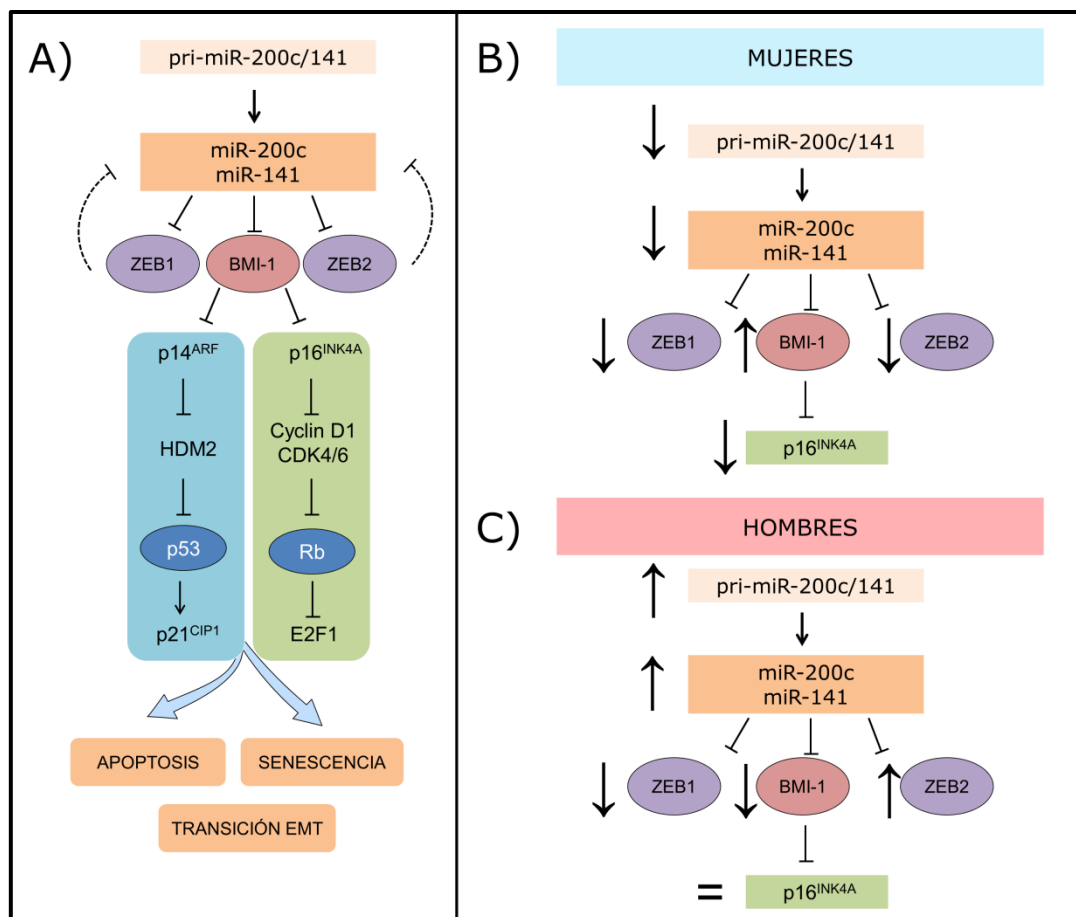
De estos 14 genes diferencialmente expresados, 8 habían sido previamente asociados a la presencia de cáncer. Entre ellos, la glicoproteína CD24 (Kristiansen *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2017; Ooki *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2017), la caspasa 5 (Flood *et al.*, 2015), la piruvato deshidrogenasa 4 o PDK4 (Leclerc *et al.*, 2017; Woolbright *et al.*, 2018), la proteína quinasa 1 asociada a muerte celular o DAPK1, la fosfolipasa PLA2G7 (Lehtinen *et al.*, 2017; Vainio *et al.*, 2011a; Vainio *et al.*, 2011b), el factor de transcripción ZEB2 (Caramel *et al.*, 2018; Goossens *et al.*, 2017) así como los miARNs miR-200c y miR-141 (Feng *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2018).

En nuestro estudio encontramos una expresión aumentada de caspasa 5, PLA2G7 y CD24 en varones con DM1. En cambio, en mujeres observamos una expresión aumentada de PDK4 y reducida de ZEB2, DAPK1 y del precursor de los miR-200/141. En este sentido, niveles elevados de CD24, PDK4 y PLA2G7 se han asociado a una mayor agresividad tumoral, siendo factores oncogénicos. De entre ellos cabe destacar CD24 que es un marcador de célula madre tumoral en cáncer

de ovario (Gao *et al.*, 2010) y PDK4 que posee un rol oncogénico tanto en cáncer de ovario como en glioblastoma (Liu *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019a).

El miR-200c y el miR-141 se han asociado al desarrollo de cáncer, siendo biomarcadores tanto de diagnóstico como de pronóstico en varios tipos tumorales (Peter, 2009), y tienen como dianas a ZEB2, BMI1 y p16<sup>INK4a</sup>. Junto con sus dianas, estos miR están involucrados en el control de la plasticidad celular y de la progresión del cáncer a través de la modulación del proceso de transición epitelio-mesénquima, de la regulación de la senescencia y de la actividad de las células madre tumorales, formando entre ellos un bucle autorregulatorio. En concreto, se han descrito unos niveles reducidos de los miARN, de ZEB y de p16<sup>INK4a</sup>, y aumentados de BMI1, en muestras de tumores primarios, de metástasis y en la población de células madre tumorales.

Se ha descrito que ambos miR inhiben a sus dianas ZEB1 y ZEB2, pero de la misma manera se ha descrito que ZEB1 es capaz de regular a ambos miR. Así la activación de un grupo de factores afectará fuertemente a la expresión del otro grupo. Al ser los factores ZEB potentes inductores de la transición epitelio mesénquima, la sobreexpresión del miR-200 provocaría una represión de ZEB y con ello una mayor diferenciación epitelial, y viceversa (Brabletz *et al.*, 2011; Brabletz and Brabletz, 2010; Díaz-Riascos *et al.*, 2019; Feng *et al.*, 2014; Hill *et al.*, 2013).



**Figura D6.** En la imagen se representan las vías moleculares alteradas en pacientes con DM1. **A)** En primer lugar, la inhibición de BMI1 y ZEB1/2 por parte de los miR-200c y miR-141. La inhibición de BMI1 provoca a su vez la inhibición tanto de p14<sup>ARF</sup> como de p16<sup>INK4a</sup>, y esto desencadenaría los procesos de senescencia y apoptosis. En las figuras **B)** y **C)** se representa patrón diferencial en la expresión encontrada entre mujeres y hombres con DM1.

En nuestra cohorte observamos unos niveles reducidos tanto del miR-200 como de los factores ZEB y p16<sup>INK4a</sup> en las mujeres con DM1, y una mayor expresión de BMI1, lo que apoyaría la observación de una mayor presencia de cáncer en mujeres con DM1. En cambio, en los varones con DM1 observamos unos niveles elevados de dicha familia de miARNs junto con niveles superiores de ZEB2 y p16<sup>INK4a</sup> y menores de BMI1 (**Figura D6**).

Por otra parte, en estudios en células no tumorales se ha descrito que el miR-141 controla la proliferación y la entrada en senescencia de los fibroblastos a través de BMI1 y de p16<sup>INK4a</sup>. En este sentido, se ha observado que la elevación del miR-141 inhibe la proliferación, aumenta el número de células senescentes y de las

células con daño en el ADN. A su vez, la inhibición del miR-141 rescata todos estos procesos (Dimri *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2019). Además, se ha propuesto a los miR-141 y miR-200c como marcadores de envejecimiento hepático, ya que se ha demostrado que su expresión aumenta con la edad (Capri *et al.*, 2017; Moimas *et al.*, 2019).

No obstante, se ha descrito que el cáncer de ovario está ligado a mutaciones en genes implicados en la reparación del daño en el ADN como BRCA1, BRCA2, ATM y RAD51; genes que hemos visto que se encuentran alterados en pacientes con DM1. Recientemente se han descrito mutaciones en  $\beta$ -catenin y ATM en tumores derivados de pacientes con DM1 (Rübben *et al.*, 2020). Por otra parte, entre los factores de riesgo más importantes para el desarrollo del cáncer de ovario se encuentran una baja maternidad, el desarrollo de abortos y el uso de una terapia hormonal tras la menopausia (Momenimovahed *et al.*, 2019), entre otros factores que están ligeramente alterados en pacientes con DM1 (Higgs *et al.*, 2019).

Estos datos sugieren que las vías que están implicadas en el envejecimiento celular también lo están en el desarrollo de tumores en pacientes DM1, debido a que hemos observado que la vía BMI1/p16<sup>INK4a</sup> se encuentra alterada durante el envejecimiento celular, pero también está implicada en el mayor riesgo de desarrollar cáncer de los pacientes con DM1. Su expresión se observa en diferente dirección según esté involucrada en el proceso de envejecimiento o de cáncer, coherente con la idea de que los procesos biológicos y los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo tanto del cáncer como del envejecimiento tienen un origen común y están interconectados, aunque actúen de manera opuesta y con diferente intensidad según el contexto celular (Hanahan and Weinberg, 2000; López-Otín *et al.*, 2013).

## 2. Nuevas terapias en DM1

En los últimos años se han planteado una gran cantidad de estrategias terapéuticas frente a la DM1, pero a día de hoy, ninguna de ellas ha logrado pasar a la clínica e implantarse como terapia efectiva para estos pacientes. En este sentido, cabe destacar el gran esfuerzo que se ha realizado en la búsqueda de nuevas moléculas pequeñas (Konieczny *et al.*, 2017) y, por otro lado, en el desarrollo de oligonucleótidos antisentido (ASO) (Pandey *et al.*, 2015), aunque actualmente ninguna de estas aproximaciones ha superado los ensayos clínicos. Esto puede ser debido a que estas terapias han sido dirigidas a alteraciones puntuales de la enfermedad, como es el caso de los ASO, que interfieren en la expresión del ARN de DMPK, pero que no afectan, por ejemplo, a otros procesos implicados en la enfermedad como la expresión reducida de *SIX5* o *DMWD*, entre otros (Thornton *et al.*, 2017). Lo mismo sucede con otro tipo de estrategias, como las encaminadas a la inhibición del secuestro de MBNL1 por el transcrito mutado o las estrategias basadas en reducir los niveles de CUGBP1/CELF1 (Thornton *et al.*, 2017). Estas estrategias se centran en un mecanismo concreto de la enfermedad, lo que puede resultar insuficiente en una enfermedad tan compleja y de carácter multisistémico. Otro aspecto que puede haber contribuido a que dichas terapias no se hayan implantado puede ser debido a la deficiente distribución de estas moléculas en los tejidos diana, que en algunos casos se reveló muy escasa tras su administración sistémica (Sardone *et al.*, 2017).

Por todo ello, se requieren nuevas estrategias encaminadas a resolver los problemas celulares de una manera global. Dado que hemos observado que los pacientes con DM1 poseen alteraciones en varios de los mecanismos principales implicados en el envejecimiento fisiológico, valoramos el uso de compuestos que han demostrado un beneficio en el envejecimiento fisiológico, como es el caso de los compuestos senolíticos, la metformina o compuestos de nueva síntesis como los compuestos ahulkenoides.



## 2.1. Terapia senolítica en DM1

La senescencia celular es un proceso conservado implicado en la remodelación tisular durante el desarrollo embrionario pero que también se activa en la edad adulta cuando se produce un daño en el tejido con el objetivo de repararlo (Muñoz-Espín and Serrano, 2014). Sin embargo, es posible que su acción como remodelador tisular no se complete de manera eficiente en los tejidos envejecidos y, por lo tanto, provoca una acumulación de células senescentes en dichos tejidos (Childs *et al.*, 2015). Esto conduce a una disfunción tisular que desencadena el envejecimiento fisiológico, además de un amplio espectro de enfermedades relacionadas con la edad (Baker *et al.*, 2016; Baker *et al.*, 2011; Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

Quercetina, dasatinib y navitoclax son los tres compuestos con acción senolítica más estudiados y que mejores resultados han proporcionado. Se ha demostrado en modelos animales que la quercetina y el dasatinib aumentan la supervivencia y reducen el riesgo de mortalidad y mejoran la actividad funcional de ratones envejecidos naturalmente y la de ratones a los que se les han trasplantado células senescentes (Xu *et al.*, 2018). También revierten otros procesos implicados en el envejecimiento (Cavalcante *et al.*, 2020; Chandra *et al.*, 2020; Ogrodnik *et al.*, 2017), en todos los casos con una baja toxicidad. Además, se ha observado que el dasatinib reduce la fibrosis (Cavalcante *et al.*, 2020; Cruz *et al.*, 2016; Kanemaru *et al.*, 2018) y que el navitoclax rejuvenece el nicho de célula madre hematopoyética y muscular en modelos de ratón (Chang *et al.*, 2016). Asimismo, en humanos se ha observado que la quercetina y el dasatinib reducen el número de células p16<sup>INK4a</sup> positivas en epidermis y en tejido adiposo, mejorando la capacidad funcional pulmonar de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (Hickson *et al.*, 2019; Justice *et al.*, 2019).

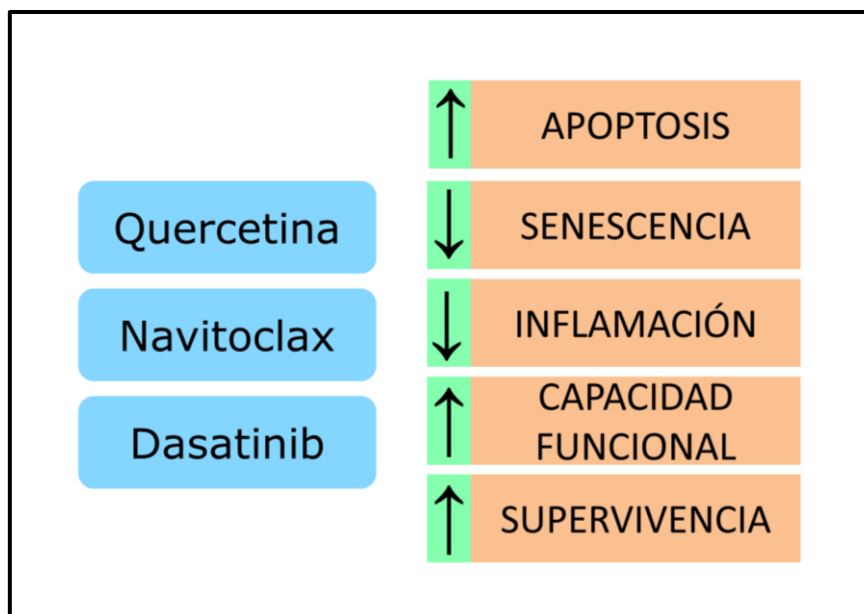
## DISCUSIÓN

Nuestros resultados demuestran que tres compuestos senolíticos, la quercetina, el dasatinib y el navitoclax promueven la eliminación de células senescentes mediante apoptosis y revierten parcialmente el SASP. Además, la quercetina rescata los niveles de *Mbnl*, *Dacapo* (homólogo de p27/p21) y *Psc* (homólogo de BMI1) en tejido muscular de mosca y tanto ésta como el dasatinib aumentan de manera considerable la supervivencia global de las moscas con DM1, así como su actividad locomotora (**Figura D7**).

La acumulación de células senescentes se ha descrito en diferentes patologías asociadas a la edad como la diabetes mellitus tipo 2 (Chesnokova *et al.*, 2009; Sone and Kagawa, 2005), la sarcopenia (Cosgrove *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2014; Sousa-Victor *et al.*, 2014) o el desarrollo de cataratas (Baker *et al.*, 2008), entre otras. Dichos procesos se dan de una manera más frecuente en pacientes con DM1 y la terapia con compuestos senolíticos dirigida a la eliminación de células senescentes podría suponer un beneficio terapéutico para estos pacientes.

Por otra parte, es interesante mencionar que tanto el navitoclax como el dasatinib se desarrollaron como tratamientos antitumorales. En este sentido, el dasatinib ha mostrado efectividad en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (Rousselot *et al.*, 2016; Slayton *et al.*, 2018) y en el cáncer de mama (Tian *et al.*, 2018), mientras que el navitoclax es útil para el tratamiento del cáncer de pulmón (Gandhi *et al.*, 2011), lo que refuerza la idea de una complementariedad de los procesos moleculares implicados tanto en el cáncer como en el envejecimiento.

En definitiva, esta es la primera prueba de concepto en la que se describe que las terapias senolíticas tienen un efecto beneficioso para los pacientes con DM1, tanto en un modelo *in vitro* como en un modelo *in vivo* de la enfermedad, lo que abre las puertas a una nueva y prometedora aproximación terapéutica para el tratamiento de la DM1 que deberá ser validada en futuros ensayos clínicos.



**Figura D7.** En la figura se enumeran los procesos sobre los que actúan los compuestos senolíticos en DM1, eliminando las células senescentes, con un aumento de la apoptosis y un descenso en la inflamación. Además en el modelo de mosca de DM1 mejoran tanto la capacidad funcional como su supervivencia.

## 2.2. Terapia con metformina en DM1

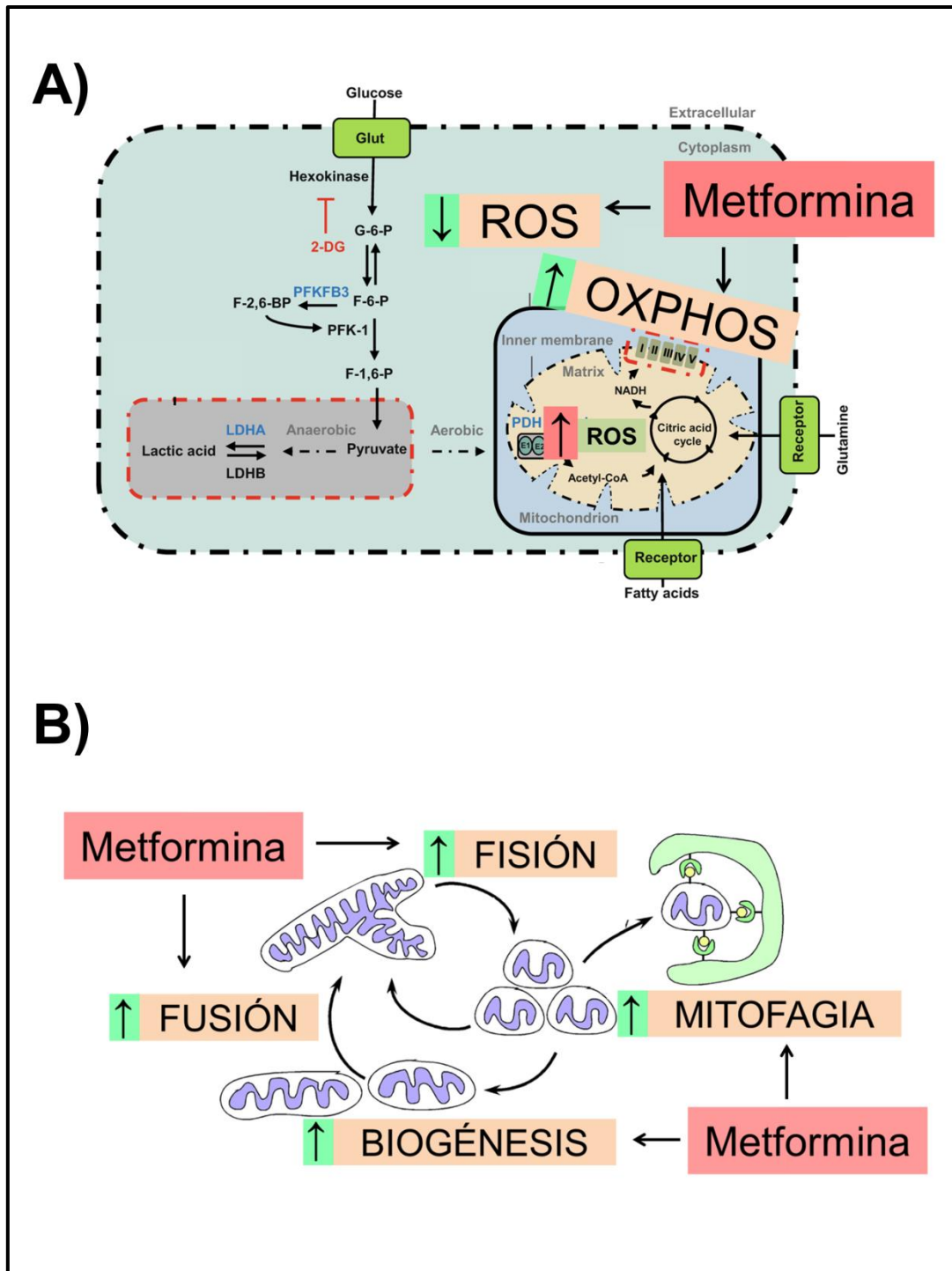
El tratamiento con metformina es otra alternativa como potencial tratamiento de la DM1 con resultados preliminares. En mioblastos DM1 se ha observado que la metformina es capaz de rescatar el *splicing* alternativo (Laustriat *et al.*, 2015). Por otra parte, se ha descrito que los pacientes con DM1 tienen una mayor incidencia de diabetes y que principalmente son tratados con metformina (Alsaggaf *et al.*, 2018), prescripción que se da también en poblaciones mayores sanas (Hostalek *et al.*, 2015). En este sentido, los pacientes con DM1 y diabéticos presentan un mayor riesgo a desarrollar cáncer, riesgo que se reduce significativamente por el tratamiento con metformina (Alsaggaf *et al.*, 2019). Además, en un ensayo clínico de 1 año con pacientes DM1 tratados con metformina se observó una mejora en su movilidad (Bassez *et al.*, 2018). Recientemente se ha descrito que la metformina inhibe la traducción no asociada a ATG (*RAN translation*), fenómeno presente en la DM1, en dos enfermedades producidas por

## DISCUSIÓN

expansiones de repeticiones como la demencia frontotemporal y la esclerosis lateral amiotrofia (Zu *et al.*, 2020).

En este estudio, describimos que la metformina incrementa la producción de ATP mediante la cadena de transporte de electrones mitocondrial y disminuye la producción de ROS en fibroblastos DM1. Por otra parte, observamos que este fármaco rescata otros fenotipos alterados en fibroblastos DM1 tales como la proliferación celular y la dinámica de fusión y fisión mitocondrial (**Figura D.8**). Resultados similares se han obtenido en fibroblastos derivados de pacientes con síndrome de Down, las cuales también presentan una disfunción mitocondrial (Izzo *et al.*, 2017) y en hepatocitos sanos primarios (Wang *et al.*, 2019b), donde se observa que la metformina rescata tanto el metabolismo mitocondrial como los procesos de fisión y fusión mitocondrial. En esta línea, se ha observado que la metformina revierte los procesos de senescencia, aumenta la proliferación y reduce la apoptosis *in vitro* (Chen *et al.*, 2016; Mu *et al.*, 2018). Estas acciones podrían indicar que el efecto de la metformina en DM1 puede estar relacionado con su acción anti-envejecimiento.

La acción anti-envejecimiento de la metformina radica en múltiples procesos. Así, se ha observado que tiene efectos múltiples en la célula reduciendo los niveles de insulina a través de ERBB2 (Kim *et al.*, 2016), como inhibidor de mTOR (Amin *et al.*, 2019), reduciendo los niveles de inflamación asociados al proceso de senescencia a través del bloqueo de la ruta de NF-kB (Moiseeva *et al.*, 2013), reduciendo los niveles de ROS (Batandier *et al.*, 2006), activando AMPK (Howell *et al.*, 2017) y reduciendo el daño en el ADN (Algire *et al.*, 2012). En este sentido, hemos observado que la metformina provoca una reducción en los niveles de producción de ROS, activando la defensa antioxidante a través de GPx1, lo que refuerza la idea de que su acción es la suma de todos los mecanismos.



**Figura D8.** El tratamiento con metformina recupera la respiración mitocondrial, la producción de ROS, los procesos dinámicos mitocondriales de fusión y fisión, además de la proliferación celular y de DMPK y MBNL1 en fibroblastos DM1. **A)** En la imagen se representan los procesos revertidos por el tratamiento con metformina como la producción de ROS y la producción de ATP por vía mitocondrial. Modificado de Yetkin-Arik *et al.*, 2019 . **B)** El tratamiento con metformina también revierte los procesos de biogénesis, fusión, fisión y autofagia mitocondrial. Modificado de Boland *et al.*, 2013 .

### 2.3. Terapia con compuestos AHK

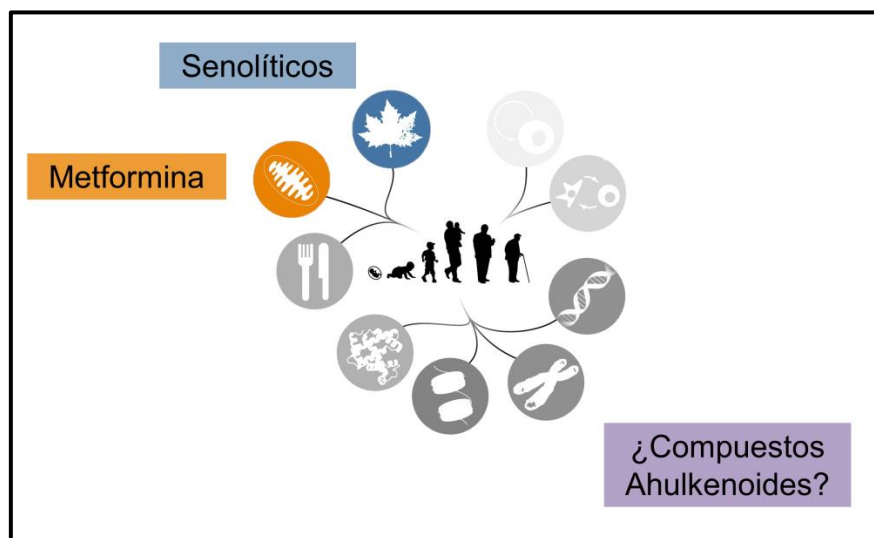
Los compuestos AHK fueron diseñados en origen para normalizar la homeostasis del calcio celular mediante la estabilización de la interacción entre rianodina y calstabinina en la distrofia muscular de Duchenne.

En este trabajo describimos el potencial de los compuestos AHK en la DM1. En el modelo de fibroblasto vemos que tanto el AHK6 como el AHK7 incrementan la proliferación celular y la producción de ATP por vía mitocondrial, y también reducen la producción de ROS, sin tener un efecto tóxico para la célula. A pesar de que en nuestro modelo no vemos una alteración en los niveles de calcio celular en fibroblastos derivados de pacientes con DM1, sí que observamos una clara reversión del fenotipo en estas células, sugiriendo una acción independiente de la homeostasis del calcio. En línea con esta idea, el AHK revierte de manera muy significativa la longevidad reducida del modelo de mosca.

El estudio de RNA-seq realizado está ayudando a identificar las vías de acción del AHK. En este sentido, dicho análisis sugirió la acción de los compuestos ahulkenoides a través de la señalización celular, la regulación del ciclo y la regulación del metabolismo celular. Tanto la regulación del ciclo celular como el metabolismo celular son dos de los procesos que hemos descrito como alterados en células DM1 y son rescatados parcialmente por los Ahulkenoides. Además, datos preliminares del grupo sugieren que estos compuestos actúan a través de la ruta mTOR (datos no publicados). Se ha descrito que la inhibición de mTOR con rapamicina incrementa la supervivencia en varios modelos animales como en *C. elegans* (Blackwell *et al.*, 2019), *D. melanogaster* (Bjedov *et al.*, 2010) y en ratón (Anisimov *et al.*, 2010; Harrison *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2012). En DM1, se ha descrito *in vitro* un descenso de la fosforilación dependiente de mTOR y que su sobreexpresión en un modelo de mosca de DM1 rescata su supervivencia global

(Bargiela *et al.*, 2015). Estos datos preliminares sugieren una acción sobre varios mecanismos en DM1.

Por todo ello, serían necesarios nuevos estudios que describan las vías moleculares moduladas por los compuestos AHK en DM1.



**Figura D.9.** En la figura se representan los procesos celulares implicados en el envejecimiento fisiológico y en color se representan aquellos que hemos demostrado que se encuentran alterados en DM1 y que tienen una intervención terapéutica. Los compuestos senolíticos eliminan a las células senescentes y la metformina incide sobre el metabolismo mitocondrial. Se representan también los compuestos ahulkenoides sin especificar un mecanismo concreto. Modificado de López-Otín *et al.*, 2013.

En definitiva, en esta tesis describimos la alteración de varios procesos implicados en el envejecimiento fisiológico que se producen de manera prematura en la DM1, como son la disminución en la regulación de los procesos de proliferación y división celular, una alteración en los mecanismos de respuesta al daño en el ADN, una entrada prematura en senescencia, así como una alteración en varios procesos mitocondriales y un acortamiento telomérico prematuro. Además, observamos un mayor riesgo de desarrollar cáncer en pacientes con DM1. Por otro lado, caracterizamos los efectos de tres estrategias terapéuticas dirigidas a revertir este envejecimiento prematuro que podrían ser beneficiosas para los pacientes con DM1 (**Figura D.9**).





## ***CONCLUSIONES***

---



1. Fibroblastos y mioblastos derivados de pacientes con DM1 tienen disminuida la regulación del ciclo celular, la división celular y la respuesta al daño en el ADN, así como una entrada prematura en senescencia. Estas alteraciones son debidas, en parte, a la vía mediada por BMI1 y p16<sup>INK4a</sup>.
2. Los fibroblastos derivados de pacientes con DM1 presentan una menor respiración y como consecuencia una menor producción de ATP por la vía mitocondrial, generando una mayor producción de ROS que se asocian a una activación de la vía de señalización de p38MAPK.
3. No existen diferencias en la longitud telomérica en muestras de PBMC entre pacientes con DM1 y controles sanos, pero el proceso de acortamiento telomérico a lo largo del tiempo está acelerado en los pacientes con respecto a los controles.
4. Los pacientes con DM1 tienen un riesgo dos veces superior que la población normal a desarrollar cáncer, especialmente de cáncer de tiroides, de cerebro, de ovario y de endometrio, siendo este riesgo mayor en mujeres que en hombres.
5. El mayor riesgo de desarrollo de cáncer se asocia con un patrón molecular diferencial, que en mujeres se caracteriza por una menor expresión de la familia del miR-200 y de p16<sup>INK4a</sup> y con una mayor expresión de BMI1.

6. Los compuestos senolíticos quercetina, dasatinib y navitoclax rescatan varios elementos constitutivos del fenotipo del envejecimiento prematuro característico de la DM1, como es la eliminación de células senescentes, además de un aumento significativo de la longevidad y la capacidad de locomoción en el modelo de DM1 en *Drosophila melanogaster*.
7. El tratamiento con metformina rescata los déficits mitocondriales presentes en los modelos celulares de DM1, además de otros elementos característicos del fenotipo de envejecimiento prematuro como es la capacidad de proliferación, la producción de ROS y la actividad de la vía BMI1/p16<sup>INK4a</sup> asociados a la DM1.
8. Los compuestos ahulkenoides no provocan toxicidad celular y, al igual que la metformina, rescatan varios de los rasgos del fenotipo de envejecimiento prematuro presentes en fibroblastos DM1, como son la producción de ATP por la vía mitocondrial, la producción de ROS y la proliferación celular, además de aumentar la supervivencia global del modelo de *Drosophila melanogaster*.





## ***BIBLIOGRAFÍA***

---





- Abbott, D., Johnson, N.E., and Cannon-Albright, L.A. (2016). A population-based survey of risk for cancer in individuals diagnosed with myotonic dystrophy. *Muscle Nerve* 54, 783-785.
- Achiron, A., Barak, Y., Magal, N., Shohat, M., Cohen, M., Barar, R., and Gadoth, N. (1998). Abnormal liver test results in myotonic dystrophy. *J Clin Gastroenterol* 26, 292-295.
- Acosta, J.C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J.P., Athineos, D., Kang, T.W., Lasitschka, F., Andrulis, M., et al. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* 15, 978-990.
- Aldanondo G. Effect of novel ryanodine receptor modulators in mouse and human models of Duchenne muscular dystrophy: Doctoral Thesis from University of Basque Country, 2017.
- Aldenbratt, A., Lindberg, C., and Svensson, M.K. (2017). Reduced renal function in patients with Myotonic Dystrophy type 1 and the association to CTG expansion and other potential risk factors for chronic kidney disease. *Neuromuscul Disord* 27, 1038-1042.
- Algire, C., Moiseeva, O., Deschenes-Simard, X., Amrein, L., Petruccelli, L., Birman, E., Viollet, B., Ferbeyre, G., and Pollak, M.N. (2012). Metformin reduces endogenous reactive oxygen species and associated DNA damage. *Cancer Prev Res (Phila)* 5, 536-543.
- Allard, J.S., Pérez, E.J., Fukui, K., Carpenter, P., Ingram, D.K., and de Cabo, R. (2016). Prolonged metformin treatment leads to reduced transcription of Nrf2 and neurotrophic factors without cognitive impairment in older C57BL/6J mice. *Behav Brain Res* 301, 1-9.
- Alsaggaf, R., Pfeiffer, R.M., Wang, Y., St George, D.M.M., Zhan, M., Wagner, K.R., Amr, S., Greene, M.H., and Gadalla, S.M. (2019a). Diabetes, metformin and cancer risk in myotonic dystrophy type I. *Int J Cancer*.
- Alsaggaf, R., St George, D.M.M., Zhan, M., Pfeiffer, R.M., Wang, Y., Anderson, L.A., Liu, Z., Koshiol, J., Bauer, A.J., Wagner, K.R., et al. (2019b). Benign tumors in myotonic dystrophy type I target disease-related cancer sites. *Ann Clin Transl Neurol* 6, 1510-1518.
- Alsaggaf, R., Wang, Y., Marini-Bettolo, C., Wood, L., Nikolenko, N., Lochmuller, H., Greene, M.H., and Gadalla, S.M. (2018). Benign and malignant tumors in the UK myotonic dystrophy patient registry. *Muscle Nerve* 57, 316-320.
- Alwazzan, M., Newman, E., Hamshere, M.G., and Brook, J.D. (1999). Myotonic dystrophy is associated with a reduced level of RNA from the DMWD allele adjacent to the expanded repeat. *Hum Mol Genet* 8, 1491-1497.
- Amin, S., Lux, A., and O'Callaghan, F. (2019). The journey of metformin from glycaemic control to mTOR inhibition and the suppression of tumour growth. *Br J Clin Pharmacol* 85, 37-46.
- AMO-Pharma. Updates on Development of AMO Pharma's AMO-02 Presented at International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting [online]. Available at: <https://www.prnewswire.com/news-releases/updates-on-development-of-amo-pharmas-amo-02-presented-at-international-myotonic-dystrophy-consortium-meeting-300866512.html>. Accessed 17/02/2020.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L., and Orntoft, T.F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64, 5245-5250.
- Andersson, D.C., Betzenhauser, M.J., Reiken, S., Meli, A.C., Umanskaya, A., Xie, W., Shiomi, T., Zalk, R., Lacampagne, A., and Marks, A.R. (2011). Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. *Cell Metab* 14, 196-207.
- Andersson, D.C., Meli, A.C., Reiken, S., Betzenhauser, M.J., Umanskaya, A., Shiomi, T., D'Armiento, J., and Marks, A.R. (2012). Leaky ryanodine receptors in beta-sarcoglycan deficient mice: a potential common defect in muscular dystrophy. *Skelet Muscle* 2, 9.

- Andre, L.M., Ausems, C.R.M., Wansink, D.G., and Wieringa, B. (2018). Abnormalities in Skeletal Muscle Myogenesis, Growth, and Regeneration in Myotonic Dystrophy. *Front Neurol* 9, 368.
- Angelidis, I., Simon, L.M., Fernández, I.E., Strunz, M., Mayr, C.H., Greiffo, F.R., Tsitsiridis, G., Ansari, M., Graf, E., Strom, T.M., et al. (2019). An atlas of the aging lung mapped by single cell transcriptomics and deep tissue proteomics. *Nat Commun* 10, 963.
- Anisimov, V.N., Berstein, L.M., Egormin, P.A., Piskunova, T.S., Popovich, I.G., Zabezhinski, M.A., Tyndyk, M.L., Yurova, M.V., Kovalenko, I.G., Poroshina, T.E., et al. (2008). Metformin slows down aging and extends life span of female SHR mice. *Cell Cycle* 7, 2769-2773. Pérez
- Anisimov, V.N., Zabezhinski, M.A., Popovich, I.G., Piskunova, T.S., Semenchenko, A.V., Tyndyk, M.L., Yurova, M.N., Antoch, M.P., and Blagosklonny, M.V. (2010). Rapamycin extends maximal lifespan in cancer-prone mice. *Am J Pathol* 176, 2092-2097.
- Antonini, G., Giubilei, F., Mammarella, A., Amicucci, P., Fiorelli, M., Gragnani, F., Morino, S., Ceschin, P.V., Fragola, P.V., and Gennarelli, M. (2000). Natural history of cardiac involvement in myotonic dystrophy: correlation with CTG repeats. *Neurology* 55, 1207-1209.
- Antonini, G., Soscia, F., Giubilei, F., De Carolis, A., Gragnani, F., Morino, S., Ruberto, A., and Tatarelli, R. (2006). Health-related quality of life in myotonic dystrophy type 1 and its relationship with cognitive and emotional functioning. *J Rehabil Med* 38, 181-185.
- Apponi, L.H., Corbett, A.H., and Pavlath, G.K. (2011). RNA-binding proteins and gene regulation in myogenesis. *Trends Pharmacol Sci* 32, 652-658.
- Arambula, J.F., Ramisetty, S.R., Baranger, A.M., and Zimmerman, S.C. (2009). A simple ligand that selectively targets CUG trinucleotide repeats and inhibits MBNL protein binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16068-16073.
- Arsenault, M.E., Prevost, C., Lescault, A., Laberge, C., Puymirat, J., and Mathieu, J. (2006). Clinical characteristics of myotonic dystrophy type 1 patients with small CTG expansions. *Neurology* 66, 1248-1250.
- Ashizawa, T., Anvret, M., Baiget, M., Barcelo, J.M., Brunner, H., Cobo, A.M., Dallapiccola, B., Fenwick, R.G., Jr., Grandell, U., Harley, H., et al. (1994). Characteristics of intergenerational contractions of the CTG repeat in myotonic dystrophy. *Am J Hum Genet* 54, 414-423.
- Ashizawa, T., Dubel, J.R., and Harati, Y. (1993). Somatic instability of CTG repeat in myotonic dystrophy. *Neurology* 43, 2674-2678.
- Ashizawa, T., and Epstein, H.F. (1991). Ethnic distribution of myotonic dystrophy gene. *Lancet* 338, 642-643.
- Ashizawa, T., Gagnon, C., Groh, W.J., Gutmann, L., Johnson, N.E., Meola, G., Moxley, R., 3rd, Pandya, S., Rogers, M.T., Simpson, E., et al. (2018). Consensus-based care recommendations for adults with myotonic dystrophy type 1. *Neurol Clin Pract* 8, 507-520.
- Baar, M.P., Brandt, R.M.C., Putavet, D.A., Klein, J.D.D., Derks, K.W.J., Bourgeois, B.R.M., Stryeck, S., Rijksen, Y., van Willigenburg, H., Feijtel, D.A., et al. (2017). Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* 169, 132-147 e116.
- Baker, D.J., Childs, B.G., Durik, M., Wijers, M.E., Sieben, C.J., Zhong, J., Saltness, R.A., Jeganathan, K.B., Verzosa, G.C., Pezeshki, A., et al. (2016). Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530, 184-189.
- Baker, D.J., Pérez-Terzic, C., Jin, F., Pitel, K.S., Niederlander, N.J., Jeganathan, K., Yamada, S., Reyes, S., Rowe, L., Hiddinga, H.J., et al. (2008). Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency. *Nat Cell Biol* 10, 825-836.
- Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonja, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., van de Sluis, B., Kirkland, J.L., and van Deursen, J.M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479, 232-236.

- Ballester-López, A., Linares-Pardo, I., Koehorst, E., Núñez-Manchón, J., Pintos-Morell, G., Coll-Canti, J., Almendrote, M., Lucente, G., Arbex, A., Magana, J.J., et al. (2020). The Need for Establishing a Universal CTG Sizing Method in Myotonic Dystrophy Type 1. *Genes (Basel)* 11.
- Bannister, C.A., Holden, S.E., Jenkins-Jones, S., Morgan, C.L., Halcox, J.P., Schernthaner, G., Mukherjee, J., and Currie, C.J. (2014). Can people with type 2 diabetes live longer than those without? A comparison of mortality in people initiated with metformin or sulphonylurea monotherapy and matched, non-diabetic controls. *Diabetes Obes Metab* 16, 1165-1173.
- Barbé, L., Lanni, S., López-Castel, A., Franck, S., Spits, C., Keymolen, K., Seneca, S., Tome, S., Miron, I., Letourneau, J., et al. (2017). CpG Methylation, a Parent-of-Origin Effect for Maternal-Biased Transmission of Congenital Myotonic Dystrophy. *Am J Hum Genet* 100, 488-505.
- Barbi, E., Lagona, F., Marsili, M., Vaupel, J.W., and Wachter, K.W. (2018). The plateau of human mortality: Demography of longevity pioneers. *Science* 360, 1459-1461.
- Bargiela, A., Cerro-Herreros, E., Fernández-Costa, J.M., Vilchez, J.J., Llamusi, B., and Artero, R. (2015). Increased autophagy and apoptosis contribute to muscle atrophy in a myotonic dystrophy type 1 *Drosophila* model. *Dis Model Mech* 8, 679-690.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444, 633-637.
- Barzilai, N., Crandall, J.P., Kritchevsky, S.B., and Espeland, M.A. (2016). Metformin as a Tool to Target Aging. *Cell Metab* 23, 1060-1065.
- Bassez, G., Audureau, E., Hogrel, J.Y., Arrouasse, R., Baghdoyan, S., Bhugaloo, H., Gourlay-Chu, M.L., Le Corvoisier, P., and Peschanski, M. (2018). Improved mobility with metformin in patients with myotonic dystrophy type 1: a randomized controlled trial. *Brain* 141, 2855-2865.
- Batandier, C., Guigas, B., Demaille, D., El-Mir, M.Y., Fontaine, E., Rigoulet, M., and Leverve, X.M. (2006). The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. *J Bioenerg Biomembr* 38, 33-42.
- Batra, R., Charizanis, K., Manchanda, M., Mohan, A., Li, M., Finn, D.J., Goodwin, M., Zhang, C., Sobczak, K., Thornton, C.A., et al. (2014). Loss of MBNL leads to disruption of developmentally regulated alternative polyadenylation in RNA-mediated disease. *Mol Cell* 56, 311-322.
- Batra, R., Manchanda, M., and Swanson, M.S. (2015). Global insights into alternative polyadenylation regulation. *RNA Biol* 12, 597-602.
- Beffy, P., Del Carratore, R., Masini, M., Furling, D., Puymirat, J., Masiello, P., and Simili, M. (2010). Altered signal transduction pathways and induction of autophagy in human myotonic dystrophy type 1 myoblasts. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 1973-1983.
- Behar, D.M., Harmant, C., Manry, J., van Oven, M., Haak, W., Martínez-Cruz, B., Salaberria, J., Oyharzabal, B., Bauduer, F., Comas, D., et al. (2012). The Basque paradigm: genetic evidence of a maternal continuity in the Franco-Cantabrian region since pre-Neolithic times. *Am J Hum Genet* 90, 486-493.
- Bellinger, A.M., Mongillo, M., and Marks, A.R. (2008a). Stressed out: the skeletal muscle ryanodine receptor as a target of stress. *J Clin Invest* 118, 445-453.
- Bellinger, A.M., Reiken, S., Carlson, C., Mongillo, M., Liu, X., Rothman, L., Matecki, S., Lacampagne, A., and Marks, A.R. (2009). Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat Med* 15, 325-330.
- Bellinger, A.M., Reiken, S., Dura, M., Murphy, P.W., Deng, S.X., Landry, D.W., Nieman, D., Lehnart, S.E., Samaru, M., LaCampagne, A., et al. (2008b). Remodeling of ryanodine receptor complex causes "leaky" channels: a molecular mechanism for decreased exercise capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2198-2202.

- Bellini, M., Biagi, S., Stasi, C., Costa, F., Mumolo, M.G., Ricchiuti, A., and Marchi, S. (2006). Gastrointestinal manifestations in myotonic muscular dystrophy. *World J Gastroenterol* 12, 1821-1828.
- Benders, A.A., Groenen, P.J., Oerlemans, F.T., Veerkamp, J.H., and Wieringa, B. (1997). Myotonic dystrophy protein kinase is involved in the modulation of the Ca<sup>2+</sup> homeostasis in skeletal muscle cells. *J Clin Invest* 100, 1440-1447.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11-21.
- Berul, C.I., Maguire, C.T., Aronovitz, M.J., Greenwood, J., Miller, C., Gehrmann, J., Housman, D., Mendelsohn, M.E., and Reddy, S. (1999). DMPK dosage alterations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model. *J Clin Invest* 103, R1-7.
- Bhat, R., Crowe, E.P., Bitto, A., Moh, M., Katsetos, C.D., García, F.U., Johnson, F.B., Trojanowski, J.Q., Sell, C., and Torres, C. (2012). Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *PLoS One* 7, e45069.
- Bigot, A., Klein, A.F., Gasnier, E., Jacquemin, V., Ravassard, P., Butler-Browne, G., Mouly, V., and Furling, D. (2009). Large CTG repeats trigger p16-dependent premature senescence in myotonic dystrophy type 1 muscle precursor cells. *Am J Pathol* 174, 1435-1442.
- Bjedov, I., Toivonen, J.M., Kerr, F., Slack, C., Jacobson, J., Foley, A., and Partridge, L. (2010). Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metab* 11, 35-46.
- Blackwell, T.K., Sewell, A.K., Wu, Z., and Han, M. (2019). TOR Signaling in *Caenorhabditis elegans* Development, Metabolism, and Aging. *Genetics* 213, 329-360.
- Blagosklonny, M.V. (2017). From rapalogs to anti-aging formula. *Oncotarget* 8, 35492-35507.
- Bland, C.S., Wang, E.T., Vu, A., David, M.P., Castle, J.C., Johnson, J.M., Burge, C.B., and Cooper, T.A. (2010). Global regulation of alternative splicing during myogenic differentiation. *Nucleic Acids Res* 38, 7651-7664.
- Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 6, 611-622.
- Blasco, M.A., Lee, H.W., Hande, M.P., Samper, E., Lansdorp, P.M., DePinho, R.A., and Greider, C.W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91, 25-34.
- Boland, M.L., Chourasia, A.H., and Macleod, K.F. (2013). Mitochondrial dysfunction in cancer. *Front Oncol* 3, 292.
- Bondy-Chorney, E., Crawford Parks, T.E., Ravel-Chapuis, A., Klinck, R., Rocheleau, L., Pelchat, M., Chabot, B., Jasmin, B.J., and Cote, J. (2016). Stauf1 Regulates Multiple Alternative Splicing Events either Positively or Negatively in DM1 Indicating Its Role as a Disease Modifier. *PLoS Genet* 12, e1005827.
- Boucher, C.A., King, S.K., Carey, N., Krahe, R., Winchester, C.L., Rahman, S., Creavin, T., Meghji, P., Bailey, M.E., Chartier, F.L., et al. (1995). A novel homeodomain-encoding gene is associated with a large CpG island interrupted by the myotonic dystrophy unstable (CTG)<sub>n</sub> repeat. *Hum Mol Genet* 4, 1919-1925.
- Bowker, S.L., Majumdar, S.R., Veugelers, P., and Johnson, J.A. (2006). Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. *Diabetes Care* 29, 254-258.
- Brabletz, S., Bajdak, K., Meidhof, S., Burk, U., Niedermann, G., Firat, E., Wellner, U., Dimmler, A., Faller, G., Schubert, J., et al. (2011). The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *EMBO J* 30, 770-782.
- Brabletz, S., and Brabletz, T. (2010). The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep* 11, 670-677.

- Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C.A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436, 660-665.
- Braz, S.O., Acquaire, J., Gourdon, G., and Gomes-Pereira, M. (2018). Of Mice and Men: Advances in the Understanding of Neuromuscular Aspects of Myotonic Dystrophy. *Front Neurol* 9, 519.
- Brockhoff, M., Rion, N., Chojnowska, K., Wiktorowicz, T., Eickhorst, C., Erne, B., Frank, S., Angelini, C., Furling, D., Ruegg, M.A., et al. (2017). Targeting deregulated AMPK/mTORC1 pathways improves muscle function in myotonic dystrophy type I. *J Clin Invest* 127, 549-563.
- Brook, J.D., McCurrach, M.E., Harley, H.G., Buckler, A.J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V.P., Thirion, J.P., Hudson, T., et al. (1992). Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68, 799-808.
- Bruens, L., Ellenbroek, S.I.J., Suijkerbuijk, S.J.E., Azkanaz, M., Hale, A.J., Toonen, P., Flanagan, D.J., Sansom, O.J., Snippet, H.J., and van Rheenen, J. (2020). Calorie Restriction Increases the Number of Competing Stem Cells and Decreases Mutation Retention in the Intestine. *Cell Rep* 32, 107937.
- Brunner, H.G., Bruggenwirth, H.T., Nillesen, W., Jansen, G., Hamel, B.C., Hoppe, R.L., de Die, C.E., Howeler, C.J., van Oost, B.A., Wieringa, B., et al. (1993). Influence of sex of the transmitting parent as well as of parental allele size on the CTG expansion in myotonic dystrophy (DM). *Am J Hum Genet* 53, 1016-1023.
- Bungener, C., Jouvent, R., and Delaporte, C. (1998). Psychopathological and emotional deficits in myotonic dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65, 353-356.
- Campanati, A., Giannoni, M., Buratti, L., Cagnetti, C., Giuliadori, K., Ganzetti, G., Silvestrini, M., Provinciali, L., and Offidani, A. (2015). Skin features in myotonic dystrophy type 1: an observational study. *Neuromuscul Disord* 25, 409-413.
- Campbell, C., Levin, S., Siu, V.M., Venance, S., and Jacob, P. (2013). Congenital myotonic dystrophy: Canadian population-based surveillance study. *J Pediatr* 163, 120-125 e121-123.
- Campione, E., Botta, A., Di Prete, M., Rastelli, E., Gibellini, M., Petrucci, A., Bernardini, S., Novelli, G., Bianchi, L., Orlandi, A., et al. (2017). Cutaneous features of myotonic dystrophy types 1 and 2: Implication of premature aging and vitamin D homeostasis. *Neuromuscul Disord* 27, 163-169.
- Campisi, J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol* 75, 685-705.
- Campisi, J., Andersen, J.K., Kapahi, P., and Melov, S. (2011). Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol* 21, 354-359.
- Canela, A., Martín-Caballero, J., Flores, J.M., and Blasco, M.A. (2004). Constitutive expression of *tert* in thymocytes leads to increased incidence and dissemination of T-cell lymphoma in Lck-Tert mice. *Mol Cell Biol* 24, 4275-4293.
- Cantwell, A.R., Jr., and Reed, W.B. (1965). Myotonia atrophica and multiple calcifying epithelioma of Malherbe. *Acta Derm Venereol* 45, 387-390.
- Capri, M., Olivieri, F., Lanzarini, C., Remondini, D., Borelli, V., Lazzarini, R., Graciotti, L., Albertini, M.C., Bellavista, E., Santoro, A., et al. (2017). Identification of miR-31-5p, miR-141-3p, miR-200c-3p, and GLT1 as human liver aging markers sensitive to donor-recipient age-mismatch in transplants. *Aging Cell* 16, 262-272.
- Caramel, J., Ligier, M., and Puisieux, A. (2018). Pleiotropic Roles for ZEB1 in Cancer. *Cancer Res* 78, 30-35.
- Cardani, R., Bugiardini, E., Renna, L.V., Rossi, G., Colombo, G., Valaperta, R., Novelli, G., Botta, A., and Meola, G. (2013). Overexpression of CUGBP1 in skeletal muscle from adult classic myotonic dystrophy type 1 but not from myotonic dystrophy type 2. *PLoS One* 8, e83777.
- Cardani, R., Mancinelli, E., Saino, G., Bonavina, L., and Meola, G. (2008). A putative role of ribonuclear inclusions and MBNL1 in the impairment of gallbladder smooth muscle

- contractility with cholelithiasis in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord* 18, 641-645.
- Carpentier, G. (2010). Protein Array Analyze for ImageJ (<http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?Protein-Array-Analyzer-for-ImageJ&lang=en>).
- Carrasco-García, E., Moreno, M., Moreno-Cugnon, L., and Matheu, A. (2017). Increased Arf/p53 activity in stem cells, aging and cancer. *Aging Cell* 16, 219-225.
- Cavalcante, M.B., Saccon, T.D., Nunes, A.D.C., Kirkland, J.L., Tchkonja, T., Schneider, A., and Masternak, M.M. (2020). Dasatinib plus quercetin prevents uterine age-related dysfunction and fibrosis in mice. *Aging (Albany NY)* 12, 2711-2722.
- Cawthon, R.M., Smith, K.R., O'Brien, E., Sivatchenko, A., and Kerber, R.A. (2003). Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* 361, 393-395.
- Celsi, F., Pizzo, P., Brini, M., Leo, S., Fotino, C., Pinton, P., and Rizzuto, R. (2009). Mitochondria, calcium and cell death: a deadly triad in neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 1787, 335-344.
- Chan, E.F., Gat, U., McNiff, J.M., and Fuchs, E. (1999). A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin. *Nat Genet* 21, 410-413.
- Chandra, A., Lagnado, A.B., Farr, J.N., Monroe, D.G., Park, S., Hachfeld, C., Tchkonja, T., Kirkland, J.L., Khosla, S., Passos, J.F., et al. (2020). Targeted Reduction of Senescent Cell Burden Alleviates Focal Radiotherapy-Related Bone Loss. *J Bone Miner Res*.
- Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R.M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N.E., Ding, S., Feng, W., et al. (2016). Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* 22, 78-83.
- Chang, S., Multani, A.S., Cabrera, N.G., Naylor, M.L., Laud, P., Lombard, D., Pathak, S., Guarente, L., and DePinho, R.A. (2004). Essential role of limiting telomeres in the pathogenesis of Werner syndrome. *Nat Genet* 36, 877-882.
- Charizanis, K., Lee, K.Y., Batra, R., Goodwin, M., Zhang, C., Yuan, Y., Shiue, L., Cline, M., Scotti, M.M., Xia, G., et al. (2012). Muscleblind-like 2-mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron* 75, 437-450.
- Check Hayden, E. (2015). Anti-ageing pill pushed as bona fide drug. *Nature* 522, 265-266.
- Cheeseman, I.M. (2014). The kinetochore. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6, a015826.
- Chen, D., Xia, D., Pan, Z., Xu, D., Zhou, Y., Wu, Y., Cai, N., Tang, Q., Wang, C., Yan, M., et al. (2016). Metformin protects against apoptosis and senescence in nucleus pulposus cells and ameliorates disc degeneration in vivo. *Cell Death Dis* 7, e2441.
- Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., et al. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436, 725-730.
- Cheng, C., Lin, C.H., Tsai, Y.W., Tsai, C.J., Chou, P.H., and Lan, T.H. (2014). Type 2 diabetes and antidiabetic medications in relation to dementia diagnosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69, 1299-1305.
- Cheng, X., Zhang, X., Yu, L., and Xu, H. (2015). Calcium signaling in membrane repair. *Semin Cell Dev Biol* 45, 24-31.
- Chesnokova, V., Wong, C., Zonis, S., Gruszka, A., Wawrowsky, K., Ren, S.G., Benschlomo, A., and Yu, R. (2009). Diminished pancreatic beta-cell mass in securin-null mice is caused by beta-cell apoptosis and senescence. *Endocrinology* 150, 2603-2610.
- Childs, B.G., Durik, M., Baker, D.J., and van Deursen, J.M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med* 21, 1424-1435.
- Childs, B.G., Gluscevic, M., Baker, D.J., Laberge, R.M., Marquess, D., Dananberg, J., and van Deursen, J.M. (2017). Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov* 16, 718-735.
- Chinta, S.J., Lieu, C.A., Demaria, M., Laberge, R.M., Campisi, J., and Andersen, J.K. (2013). Environmental stress, ageing and glial cell senescence: a novel mechanistic link to Parkinson's disease? *J Intern Med* 273, 429-436.

- Choi, J., Dixon, D.M., Dansithong, W., Abdallah, W.F., Roos, K.P., Jordan, M.C., Trac, B., Lee, H.S., Comai, L., and Reddy, S. (2016). Muscleblind-like 3 deficit results in a spectrum of age-associated pathologies observed in myotonic dystrophy. *Sci Rep* 6, 30999.
- Choi, J., Personius, K.E., DiFranco, M., Dansithong, W., Yu, C., Srivastava, S., Dixon, D.M., Bhatt, D.B., Comai, L., Vergara, J.L., et al. (2015). Muscleblind-Like 1 and Muscleblind-Like 3 Depletion Synergistically Enhances Myotonia by Altering Clc-1 RNA Translation. *EBioMedicine* 2, 1034-1047.
- Chun, M.J., Hwang, S.K., Kim, H.G., Goh, S.H., Kim, S., and Lee, C.H. (2016). Aurora A kinase is required for activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway upon DNA damage. *FEBS Open Bio* 6, 782-790.
- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., et al. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642.
- Collins, K., and Mitchell, J.R. (2002). Telomerase in the human organism. *Oncogene* 21, 564-579.
- Coppé, J.P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 6, 2853-2868.
- Cosgrove, B.D., Gilbert, P.M., Porpiglia, E., Mourkioti, F., Lee, S.P., Corbel, S.Y., Llewellyn, M.E., Delp, S.L., and Blau, H.M. (2014). Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles. *Nat Med* 20, 255-264.
- Costa, L.G., Garrick, J.M., Roque, P.J., and Pellacani, C. (2016). Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 2986796.
- Crawford Parks, T.E., Marcellus, K.A., Peladeau, C., Jasmin, B.J., and Ravel-Chapuis, A. (2020). Overexpression of Staufen1 in DM1 mouse skeletal muscle exacerbates dystrophic and atrophic features. *Hum Mol Genet*.
- Cruz-Jentoft, A.J., Baeyens, J.P., Bauer, J.M., Boirie, Y., Cederholm, T., Landi, F., Martín, F.C., Michel, J.P., Rolland, Y., Schneider, S.M., et al. (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* 39, 412-423.
- Cruz, F.F., Horta, L.F., Maia Lde, A., Lopes-Pacheco, M., da Silva, A.B., Morales, M.M., Goncalves-de-Albuquerque, C.F., Takiya, C.M., de Castro-Faria-Neto, H.C., and Rocco, P.R. (2016). Dasatinib Reduces Lung Inflammation and Fibrosis in Acute Experimental Silicosis. *PLoS One* 11, e0147005.
- Cuadrado, A., and Nebreda, A.R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 429, 403-417.
- Cumming, S.A., Hamilton, M.J., Robb, Y., Gregory, H., McWilliam, C., Cooper, A., Adam, B., McGhie, J., Hamilton, G., Herzyk, P., et al. (2018). De novo repeat interruptions are associated with reduced somatic instability and mild or absent clinical features in myotonic dystrophy type 1. *Eur J Hum Genet* 26, 1635-1647.
- Cumming, S.A., Jimenez-Moreno, C., Okkersen, K., Wenninger, S., Daidj, F., Hogarth, F., Littleford, R., Gorman, G., Bassez, G., Schoser, B., et al. (2019). Genetic determinants of disease severity in the myotonic dystrophy type 1 OPTIMISTIC cohort. *Neurology* 93, e995-e1009.
- D'Andrea, A.D., and Grompe, M. (2003). The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* 3, 23-34.
- Dandelot, E., and Gourdon, G. (2018). The flash-small-pool PCR: how to transform blotting and numerous hybridization steps into a simple denatured PCR. *Biotechniques* 64, 262-265.
- Dauvilliers, Y.A., and Laberge, L. (2012). Myotonic dystrophy type 1, daytime sleepiness and REM sleep dysregulation. *Sleep Med Rev* 16, 539-545.

- De Antonio, M., Dogan, C., Hamroun, D., Mati, M., Zerrouki, S., Eymard, B., Katsahian, S., Bassez, G., and French Myotonic Dystrophy Clinical, N. (2016). Unravelling the myotonic dystrophy type 1 clinical spectrum: A systematic registry-based study with implications for disease classification. *Rev Neurol (Paris)* 172, 572-580.
- De Braekeleer, M. (1991). Hereditary disorders in Saguenay-Lac-St-Jean (Quebec, Canada). *Hum Hered* 41, 141-146.
- de Die-Smulders, C.E., Howeler, C.J., Thijs, C., Mirandolle, J.F., Anten, H.B., Smeets, H.J., Chandler, K.E., and Geraedts, J.P. (1998). Age and causes of death in adult-onset myotonic dystrophy. *Brain* 121 ( Pt 8), 1557-1563.
- De Haes, W., Froominckx, L., Van Assche, R., Smolders, A., Depuydt, G., Billen, J., Braeckman, B.P., Schoofs, L., and Temmerman, L. (2014). Metformin promotes lifespan through mitohormesis via the peroxiredoxin PRDX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E2501-2509.
- de Magalhaes, J.P., Stevens, M., and Thornton, D. (2017). The Business of Anti-Aging Science. *Trends Biotechnol* 35, 1062-1073.
- De Temmerman, N., Sermon, K., Seneca, S., De Rycke, M., Hilven, P., Lissens, W., Van Steirteghem, A., and Liebaers, I. (2004). Intergenerational instability of the expanded CTG repeat in the DMPK gene: studies in human gametes and preimplantation embryos. *Am J Hum Genet* 75, 325-329.
- Decker, M.L., Chavez, E., Vulto, I., and Lansdorp, P.M. (2009). Telomere length in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Mech Ageing Dev* 130, 377-383.
- Denis, J.A., Gauthier, M., Rachdi, L., Aubert, S., Giraud-Triboult, K., Poydenot, P., Benchoua, A., Champon, B., Maury, Y., Baldeschi, C., et al. (2013). mTOR-dependent proliferation defect in human ES-derived neural stem cells affected by myotonic dystrophy type 1. *J Cell Sci* 126, 1763-1772.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638-642.
- Díaz-Riascos, Z.V., Ginesta, M.M., Fabregat, J., Serrano, T., Busquets, J., Buscail, L., Cordelier, P., and Capella, G. (2019). Expression and Role of MicroRNAs from the miR-200 Family in the Tumor Formation and Metastatic Propensity of Pancreatic Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids* 17, 491-503.
- Dillin, A., Gottschling, D.E., and Nystrom, T. (2014). The good and the bad of being connected: the integrons of aging. *Curr Opin Cell Biol* 26, 107-112.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9363-9367.
- Dimri, M., Carroll, J.D., Cho, J.H., and Dimri, G.P. (2013). microRNA-141 regulates BMI1 expression and induces senescence in human diploid fibroblasts. *Cell Cycle* 12, 3537-3546.
- Dong, X., Milholland, B., and Vijg, J. (2016). Evidence for a limit to human lifespan. *Nature* 538, 257-259.
- Du, J., Klein, J.D., Hassounah, F., Zhang, J., Zhang, C., and Wang, X.H. (2014). Aging increases CCN1 expression leading to muscle senescence. *Am J Physiol Cell Physiol* 306, C28-36.
- Echenne, B., and Bassez, G. (2013). Congenital and infantile myotonic dystrophy. *Handb Clin Neurol* 113, 1387-1393.
- Ehninger, D., Neff, F., and Xie, K. (2014). Longevity, aging and rapamycin. *Cell Mol Life Sci* 71, 4325-4346.
- Emparanza, J.I., López de Munain, A., Greene, M.H., Matheu, A., Fernández-Torrón, R., and Gadalla, S.M. (2018). Cancer phenotype in myotonic dystrophy patients: Results from a meta-analysis. *Muscle Nerve* 58, 517-522.



- Enokido, Y., Tamura, T., Ito, H., Arumughan, A., Komuro, A., Shiwaku, H., Sone, M., Foulle, R., Sawada, H., Ishiguro, H., et al. (2010). Mutant huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. *J Cell Biol* 189, 425-443.
- Evans, J.M., Donnelly, L.A., Emslie-Smith, A.M., Alessi, D.R., and Morris, A.D. (2005). Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 330, 1304-1305.
- Fardaei, M., Rogers, M.T., Thorpe, H.M., Larkin, K., Hamshere, M.G., Harper, P.S., and Brook, J.D. (2002). Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet* 11, 805-814.
- Feng, X., Wang, Z., Fillmore, R., and Xi, Y. (2014). MiR-200, a new star miRNA in human cancer. *Cancer Lett* 344, 166-173.
- Fernández-Real, J.M., Molina, A., Broch, M., Ricart, W., Gutierrez, C., Casamitjana, R., Vendrell, J., Soler, J., and Gomez-Saez, J.M. (1999). Tumor necrosis factor system activity is associated with insulin resistance and dyslipidemia in myotonic dystrophy. *Diabetes* 48, 1108-1112.
- Finkel, T., Serrano, M., and Blasco, M.A. (2007). The common biology of cancer and ageing. *Nature* 448, 767-774.
- Finsterer, J., Stollberger, C., and Keller, H. (2012). Arrhythmia-related workup in hereditary myopathies. *J Electrocardiol* 45, 376-384.
- Flood, B., Oficjalska, K., Laukens, D., Fay, J., O'Grady, A., Caiazza, F., Heetun, Z., Mills, K.H., Sheahan, K., Ryan, E.J., et al. (2015). Altered expression of caspases-4 and -5 during inflammatory bowel disease and colorectal cancer: Diagnostic and therapeutic potential. *Clin Exp Immunol* 181, 39-50.
- Fontana, L., Meyer, T.E., Klein, S., and Holloszy, J.O. (2004). Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6659-6663.
- Fortune, M.T., Vassilopoulos, C., Coolbaugh, M.I., Siciliano, M.J., and Monckton, D.G. (2000). Dramatic, expansion-biased, age-dependent, tissue-specific somatic mosaicism in a transgenic mouse model of triplet repeat instability. *Hum Mol Genet* 9, 439-445.
- Freund, A., Orjalo, A.V., Desprez, P.Y., and Campisi, J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med* 16, 238-246.
- Freyermuth, F., Rau, F., Kokunai, Y., Linke, T., Sellier, C., Nakamori, M., Kino, Y., Arandel, L., Jollet, A., Thibault, C., et al. (2016). Splicing misregulation of SCN5A contributes to cardiac-conduction delay and heart arrhythmia in myotonic dystrophy. *Nat Commun* 7, 11067.
- Frisch, R., Singleton, K.R., Moses, P.A., González, I.L., Carango, P., Marks, H.G., and Funanage, V.L. (2001). Effect of triplet repeat expansion on chromatin structure and expression of DMPK and neighboring genes, SIX5 and DMWD, in myotonic dystrophy. *Mol Genet Metab* 74, 281-291.
- Fu, Y.H., Friedman, D.L., Richards, S., Pearlman, J.A., Gibbs, R.A., Pizzuti, A., Ashizawa, T., Perryman, M.B., Scarlato, G., Fenwick, R.G., Jr., et al. (1993). Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science* 260, 235-238.
- Fugier, C., Klein, A.F., Hammer, C., Vassilopoulos, S., Ivarsson, Y., Toussaint, A., Tosch, V., Vignaud, A., Ferry, A., Messaddeq, N., et al. (2011). Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat Med* 17, 720-725.
- Furling, D., Coiffier, L., Mouly, V., Barbet, J.P., St Guily, J.L., Taneja, K., Gourdon, G., Junien, C., and Butler-Browne, G.S. (2001). Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 10, 2079-2087.
- Gadalla, S.M., Hilbert, J.E., Martens, W.B., Givens, S., Moxley, R.T., 3rd, and Greene, M.H. (2017). Pigmentation phenotype, photosensitivity and skin neoplasms in patients with myotonic dystrophy. *Eur J Neurol* 24, 713-718.

- Gadalla, S.M., Lund, M., Pfeiffer, R.M., Gortz, S., Mueller, C.M., Moxley, R.T., 3rd, Kristinsson, S.Y., Bjorkholm, M., Shebl, F.M., Hilbert, J.E., et al. (2011). Cancer risk among patients with myotonic muscular dystrophy. *JAMA* 306, 2480-2486.
- Gaggioli, V., and Zegerman, P. (2017). Terminating the replication helicase. *Nat Cell Biol* 19, 410-412.
- Gallais, B., Montreuil, M., Gargiulo, M., Eymard, B., Gagnon, C., and Laberge, L. (2015). Prevalence and correlates of apathy in myotonic dystrophy type 1. *BMC Neurol* 15, 148.
- Gandhi, L., Camidge, D.R., Ribeiro de Oliveira, M., Bonomi, P., Gandara, D., Khaira, D., Hann, C.L., McKeegan, E.M., Litvinovich, E., Hemken, P.M., et al. (2011). Phase I study of Navitoclax (ABT-263), a novel Bcl-2 family inhibitor, in patients with small-cell lung cancer and other solid tumors. *J Clin Oncol* 29, 909-916.
- Gandini, S., Puntoni, M., Heckman-Stoddard, B.M., Dunn, B.K., Ford, L., DeCensi, A., and Szabo, E. (2014). Metformin and cancer risk and mortality: a systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders. *Cancer Prev Res (Phila)* 7, 867-885.
- Gao, M.Q., Choi, Y.P., Kang, S., Youn, J.H., and Cho, N.H. (2010). CD24+ cells from hierarchically organized ovarian cancer are enriched in cancer stem cells. *Oncogene* 29, 2672-2680.
- García-Cao, I., García-Cao, M., Tomas-Loba, A., Martín-Caballero, J., Flores, J.M., Klatt, P., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2006). Increased p53 activity does not accelerate telomere-driven ageing. *EMBO Rep* 7, 546-552.
- García-López, A., Llamusi, B., Orzaez, M., Pérez-Paya, E., and Artero, R.D. (2011). In vivo discovery of a peptide that prevents CUG-RNA hairpin formation and reverses RNA toxicity in myotonic dystrophy models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 11866-11871.
- García-López, A., Monferrer, L., García-Alcover, I., Vicente-Crespo, M., Alvarez-Abril, M.C., and Artero, R.D. (2008). Genetic and chemical modifiers of a CUG toxicity model in *Drosophila*. *PLoS One* 3, e1595.
- Ghorbani, M., Taylor, S.J., Pook, M.A., and Payne, A. (2013). Comparative (computational) analysis of the DNA methylation status of trinucleotide repeat expansion diseases. *J Nucleic Acids* 2013, 689798.
- Ghosh, S., and Zhou, Z. (2014). Genetics of aging, progeria and lamin disorders. *Curr Opin Genet Dev* 26, 41-46.
- Giorgio, A., Dotti, M.T., Battaglini, M., Marino, S., Mortilla, M., Stromillo, M.L., Bramanti, P., Orrico, A., Federico, A., and De Stefano, N. (2006). Cortical damage in brains of patients with adult-form of myotonic dystrophy type 1 and no or minimal MRI abnormalities. *J Neurol* 253, 1471-1477.
- Giovannucci, E., Harlan, D.M., Archer, M.C., Bergenstal, R.M., Gapstur, S.M., Habel, L.A., Pollak, M., Regensteiner, J.G., and Yee, D. (2010). Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care* 33, 1674-1685.
- Goldman, A., Krause, A., Ramsay, M., and Jenkins, T. (1996a). Founder effect and prevalence of myotonic dystrophy in South Africans: molecular studies. *Am J Hum Genet* 59, 445-452.
- Goldman, A., Ramsay, M., and Jenkins, T. (1994). Absence of myotonic dystrophy in southern African Negroids is associated with a significantly lower number of CTG trinucleotide repeats. *J Med Genet* 31, 37-40.
- Goldman, A., Ramsay, M., and Jenkins, T. (1996b). Ethnicity and myotonic dystrophy: a possible explanation for its absence in sub-Saharan Africa. *Ann Hum Genet* 60, 57-65.
- Gomes-Pereira, M., Cooper, T.A., and Gourdon, G. (2011). Myotonic dystrophy mouse models: towards rational therapy development. *Trends Mol Med* 17, 506-517.
- Gomes-Pereira, M., Foiry, L., Nicole, A., Huguet, A., Junien, C., Munnich, A., and Gourdon, G. (2007). CTG trinucleotide repeat "big jumps": large expansions, small mice. *PLoS Genet* 3, e52.
- González-Suárez, E., Samper, E., Ramirez, A., Flores, J.M., Martín-Caballero, J., Jorcano, J.L., and Blasco, M.A. (2001). Increased epidermal tumors and increased skin wound

healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes. *EMBO J* 20, 2619-2630.

- Gonzalo, S., Kreienkamp, R., and Askjaer, P. (2017). Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A premature aging disease caused by LMNA gene mutations. *Ageing Res Rev* 33, 18-29.
- Goonasekera, S.A., Lam, C.K., Millay, D.P., Sargent, M.A., Hajjar, R.J., Kranias, E.G., and Molkentin, J.D. (2011). Mitigation of muscular dystrophy in mice by SERCA overexpression in skeletal muscle. *J Clin Invest* 121, 1044-1052.
- Goossens, S., Vandamme, N., Van Vlierberghe, P., and Berx, G. (2017). EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: Beyond EMT and MET. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1868, 584-591.
- Gordon, L.B., Rothman, F.G., López-Otin, C., and Misteli, T. (2014). Progeria: a paradigm for translational medicine. *Cell* 156, 400-407.
- Gorgoulis, V., Adams, P.D., Alimonti, A., Bennett, D.C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., et al. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell* 179, 813-827.
- Gourdon, G., and Meola, G. (2017). Myotonic Dystrophies: State of the Art of New Therapeutic Developments for the CNS. *Front Cell Neurosci* 11, 101.
- Gramegna, L.L., Giannoccaro, M.P., Manners, D.N., Testa, C., Zanigni, S., Evangelisti, S., Bianchini, C., Oppi, F., Poda, R., Avoni, P., et al. (2018). Mitochondrial dysfunction in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord* 28, 144-149.
- Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43, 405-413.
- Groenen, P.J., Wansink, D.G., Coerwinkel, M., van den Broek, W., Jansen, G., and Wieringa, B. (2000). Constitutive and regulated modes of splicing produce six major myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) isoforms with distinct properties. *Hum Mol Genet* 9, 605-616.
- Groh, W.J., Groh, M.R., Saha, C., Kincaid, J.C., Simmons, Z., Ciafaloni, E., Pourmand, R., Otten, R.F., Bhakta, D., Nair, G.V., et al. (2008). Electrocardiographic abnormalities and sudden death in myotonic dystrophy type 1. *N Engl J Med* 358, 2688-2697.
- Gurrero-Hernández, A., Avila, G., and Rueda, A. (2014). Ryanodine receptors as leak channels. *Eur J Pharmacol* 739, 26-38.
- Gutiérrez Gutiérrez, G., Diaz-Manera, J., Almendrote, M., Azriel, S., Eulalio Barcena, J., Cabezudo García, P., Camacho Salas, A., Casanova Rodriguez, C., Cobo, A.M., Diaz Guardiola, P., et al. (2019). Clinical guide for the diagnosis and follow-up of myotonic dystrophy type 1, MD1 or Steinert's disease. *Med Clin (Barc)* 153, 82 e81-82 e17.
- Hambleton, M., Hahn, H., Pleger, S.T., Kuhn, M.C., Klevitsky, R., Carr, A.N., Kimball, T.F., Hewett, T.E., Dorn, G.W., 2nd, Koch, W.J., et al. (2006). Pharmacological- and gene therapy-based inhibition of protein kinase Calpha/beta enhances cardiac contractility and attenuates heart failure. *Circulation* 114, 574-582.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hao, M., Akrami, K., Wei, K., De Diego, C., Che, N., Ku, J.H., Tidball, J., Graves, M.C., Shieh, P.B., and Chen, F. (2008). Muscleblind-like 2 (Mbnl2) -deficient mice as a model for myotonic dystrophy. *Dev Dyn* 237, 403-410.
- Harper, P.S. (1971). Calcifying epithelioma of Malherbe and myotonic dystrophy in sisters. *Birth Defects Orig Artic Ser* 7, 343-345.
- Harper, P.S. (2002). *Myotonic dystrophy--the facts : a book for patients and families* (Oxford ; New York: Oxford University Press).
- Harrison, D.E., Strong, R., Sharp, Z.D., Nelson, J.F., Astle, C.M., Flurkey, K., Nadon, N.L., Wilkinson, J.E., Frenkel, K., Carter, C.S., et al. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460, 392-395.

- Hartwig, G.B., Miller, S.E., Frost, A.P., and Roses, A.D. (1982). Myotonic muscular dystrophy: morphology, histochemistry, and growth characteristics of cultured skin fibroblasts. *Muscle Nerve* 5, 125-130.
- Hawkins, A.M., Hawkins, C.L., Abdul Razak, K., Khoo, T.K., Tran, K., and Jackson, R.V. (2019). Respiratory dysfunction in myotonic dystrophy type 1: A systematic review. *Neuromuscul Disord* 29, 198-212.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.
- Heatwole, C., Bode, R., Johnson, N., Quinn, C., Martens, W., McDermott, M.P., Rothrock, N., Thornton, C., Vickrey, B., Victorson, D., et al. (2012). Patient-reported impact of symptoms in myotonic dystrophy type 1 (PRISM-1). *Neurology* 79, 348-357.
- Heatwole, C.R., Miller, J., Martens, B., and Moxley, R.T., 3rd (2006). Laboratory abnormalities in ambulatory patients with myotonic dystrophy type 1. *Arch Neurol* 63, 1149-1153.
- Hecker, L., Logsdon, N.J., Kurundkar, D., Kurundkar, A., Bernard, K., Hock, T., Meldrum, E., Sanders, Y.Y., and Thannickal, V.J. (2014). Reversal of persistent fibrosis in aging by targeting Nox4-Nrf2 redox imbalance. *Sci Transl Med* 6, 231ra247.
- Henle, E.S., Han, Z., Tang, N., Rai, P., Luo, Y., and Linn, S. (1999). Sequence-specific DNA cleavage by Fe<sup>2+</sup>-mediated fenton reactions has possible biological implications. *J Biol Chem* 274, 962-971.
- Herranz, N., and Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest* 128, 1238-1246.
- Hickson, L.J., Langhi Prata, L.G.P., Bobart, S.A., Evans, T.K., Giorgadze, N., Hashmi, S.K., Herrmann, S.M., Jensen, M.D., Jia, Q., Jordan, K.L., et al. (2019). Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. *EBioMedicine* 47, 446-456.
- Higgs, C., Hilbert, J.E., Wood, L., Martens, W.B., Marini-Bettolo, C., Nikolenko, N., Alsaggaf, R., Lochmuller, H., Moxley, R.T., Greene, M.H., et al. (2019). Reproductive Cancer Risk Factors in Women With Myotonic Dystrophy (DM): Survey Data From the US and UK DM Registries. *Front Neurol* 10, 1071.
- Hill, L., Browne, G., and Tulchinsky, E. (2013). ZEB/miR-200 feedback loop: at the crossroads of signal transduction in cancer. *Int J Cancer* 132, 745-754.
- Hino, S., Kondo, S., Sekiya, H., Saito, A., Kanemoto, S., Murakami, T., Chihara, K., Aoki, Y., Nakamori, M., Takahashi, M.P., et al. (2007). Molecular mechanisms responsible for aberrant splicing of SERCA1 in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 16, 2834-2843.
- Ho, G., Carey, K.A., Cardamone, M., and Farrar, M.A. (2019). Myotonic dystrophy type 1: clinical manifestations in children and adolescents. *Arch Dis Child* 104, 48-52.
- Hostalek, U., Gwilt, M., and Hildemann, S. (2015). Therapeutic Use of Metformin in Prediabetes and Diabetes Prevention. *Drugs* 75, 1071-1094.
- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S.G., Croteau, D.L., and Bohr, V.A. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 15, 565-581.
- Howell, J.J., Hellberg, K., Turner, M., Talbott, G., Kolar, M.J., Ross, D.S., Hoxhaj, G., Saghatelian, A., Shaw, R.J., and Manning, B.D. (2017). Metformin Inhibits Hepatic mTORC1 Signaling via Dose-Dependent Mechanisms Involving AMPK and the TSC Complex. *Cell Metab* 25, 463-471.
- Huang, G.L., Sun, J., Lu, Y., Liu, Y., Cao, H., Zhang, H., and Calin, G.A. (2019). MiR-200 family and cancer: From a meta-analysis view. *Mol Aspects Med* 70, 57-71.
- Huguet, A., Medja, F., Nicole, A., Vignaud, A., Guiraud-Dogan, C., Ferry, A., Decostre, V., Hogrel, J.Y., Metzger, F., Hoefflich, A., et al. (2012). Molecular, physiological, and motor performance defects in DMSXL mice carrying >1,000 CTG repeats from the human DM1 locus. *PLoS Genet* 8, e1003043.

- Hunter, A., Tsilfidis, C., Mettler, G., Jacob, P., Mahadevan, M., Surh, L., and Korneluk, R. (1992). The correlation of age of onset with CTG trinucleotide repeat amplification in myotonic dystrophy. *J Med Genet* 29, 774-779.
- IDMC-2 (2000). New nomenclature and DNA testing guidelines for myotonic dystrophy type 1 (DM1). *Neurology* 54, 1218-1221.
- Ihara, Y., Mori, A., Hayabara, T., Namba, R., Nobukuni, K., Sato, K., Miyata, S., Edamatsu, R., Liu, J., and Kawai, M. (1995). Free radicals, lipid peroxides and antioxidants in blood of patients with myotonic dystrophy. *J Neurol* 242, 119-122.
- Illuzzi, J., Yerkes, S., Parekh-Olmedo, H., and Kmiec, E.B. (2009). DNA breakage and induction of DNA damage response proteins precede the appearance of visible mutant huntingtin aggregates. *J Neurosci Res* 87, 733-747.
- Ionis. Ionis Reports Setback on DMPKRx Program for Myotonic Dystrophy [online]. Available: <https://strongly.mda.org/ionis-reports-setback-dmpkrx-program-myotonic-dystrophy/>. Accessed 17/02/2020.
- Itoh, K., Ebata, T., Hirata, H., Torii, T., Sugimoto, W., Onodera, K., Nakajima, W., Uehara, I., Okuzaki, D., Yamauchi, S., et al. (2019). DMPK is a New Candidate Mediator of Tumor Suppressor p53-Dependent Cell Death. *Molecules* 24.
- Izzo, A., Nitti, M., Mollo, N., Paladino, S., Procaccini, C., Faicchia, D., Cali, G., Genesio, R., Bonfiglio, F., Cicatiello, R., et al. (2017). Metformin restores the mitochondrial network and reverses mitochondrial dysfunction in Down syndrome cells. *Hum Mol Genet* 26, 1056-1069.
- Jacobs, A.E., Benders, A.A., Oosterhof, A., Veerkamp, J.H., van Mier, P., Wevers, R.A., and Joosten, E.M. (1990). The calcium homeostasis and the membrane potential of cultured muscle cells from patients with myotonic dystrophy. *Biochim Biophys Acta* 1096, 14-19.
- Jacobs, J.J., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R.A., and van Lohuizen, M. (1999). The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature* 397, 164-168.
- Jadhav, K.S., Dungan, C.M., and Williamson, D.L. (2013). Metformin limits ceramide-induced senescence in C2C12 myoblasts. *Mech Ageing Dev* 134, 548-559.
- Jahromi, A.H., Nguyen, L., Fu, Y., Miller, K.A., Baranger, A.M., and Zimmerman, S.C. (2013). A novel CUG(exp).MBNL1 inhibitor with therapeutic potential for myotonic dystrophy type 1. *ACS Chem Biol* 8, 1037-1043.
- Jameson, J.L. (2018). *Harrison's principles of internal medicine, Twentieth edition / edn* (New York: McGraw-Hill Education).
- Jansen, G., Bachner, D., Coerwinkel, M., Wormskamp, N., Hameister, H., and Wieringa, B. (1995). Structural organization and developmental expression pattern of the mouse WD-repeat gene DMR-N9 immediately upstream of the myotonic dystrophy locus. *Hum Mol Genet* 4, 843-852.
- Jansen, G., Groenen, P.J., Bachner, D., Jap, P.H., Coerwinkel, M., Oerlemans, F., van den Broek, W., Gohlsch, B., Pette, D., Plomp, J.J., et al. (1996). Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat Genet* 13, 316-324.
- Johansson, A., Carlstrom, K., Ahren, B., Cederquist, K., Krylberg, E., Forsberg, H., and Olsson, T. (2000). Abnormal cytokine and adrenocortical hormone regulation in myotonic dystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 3169-3176.
- Johnson, N.E., Hung, M., Nasser, E., Hagerman, K.A., Chen, W., Ciafaloni, E., and Heatwole, C.R. (2015). The Impact of Pregnancy on Myotonic Dystrophy: A Registry-Based Study. *J Neuromuscul Dis* 2, 447-452.
- Jones, K., Wei, C., Iakova, P., Bugiardini, E., Schneider-Gold, C., Meola, G., Woodgett, J., Killian, J., Timchenko, N.A., and Timchenko, L.T. (2012). GSK3beta mediates muscle pathology in myotonic dystrophy. *J Clin Invest* 122, 4461-4472.
- Jones, L., Houlden, H., and Tabrizi, S.J. (2017). DNA repair in the trinucleotide repeat disorders. *Lancet Neurol* 16, 88-96.

- Justice, J.N., Nambiar, A.M., Tchkonja, T., LeBrasseur, N.K., Pascual, R., Hashmi, S.K., Prata, L., Masternak, M.M., Kritchevsky, S.B., Musi, N., et al. (2019). Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first-in-human, open-label, pilot study. *EBioMedicine* 40, 554-563.
- Kaariainen, H., Muilu, J., Perola, M., and Kristiansson, K. (2017). Genetics in an isolated population like Finland: a different basis for genomic medicine? *J Community Genet* 8, 319-326.
- Kaibuchi, K., Kuroda, S., and Amano, M. (1999). Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 68, 459-486.
- Kakourou, G., Dhanjal, S., Mamas, T., Serhal, P., Delhanty, J.D., and SenGupta, S.B. (2010). Modification of the triplet repeat primed polymerase chain reaction method for detection of the CTG repeat expansion in myotonic dystrophy type 1: application in preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril* 94, 1674-1679.
- Kalkman, J.S., Schillings, M.L., van der Werf, S.P., Padberg, G.W., Zwarts, M.J., van Engelen, B.G., and Bleijenberg, G. (2005). Experienced fatigue in facioscapulohumeral dystrophy, myotonic dystrophy, and HMSN-I. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76, 1406-1409.
- Kanadia, R.N., Johnstone, K.A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C.A., Esson, D., Timmers, A.M., Hauswirth, W.W., and Swanson, M.S. (2003). A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* 302, 1978-1980.
- Kanemaru, R., Takahashi, F., Kato, M., Mitsuishi, Y., Tajima, K., Ihara, H., Hidayat, M., Wirawan, A., Koinuma, Y., Hayakawa, D., et al. (2018). Dasatinib Suppresses TGFbeta-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells and Inhibits Pulmonary Fibrosis. *Lung* 196, 531-541.
- Kearse, M.G., and Todd, P.K. (2014). Repeat-associated non-AUG translation and its impact in neurodegenerative disease. *Neurotherapeutics* 11, 721-731.
- Kim, J., Lee, J., Kim, C., Choi, J., and Kim, A. (2016). Anti-cancer effect of metformin by suppressing signaling pathway of HER2 and HER3 in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Tumour Biol* 37, 5811-5819.
- Kimura, T., Nakamori, M., Lueck, J.D., Pouliquin, P., Aoike, F., Fujimura, H., Dirksen, R.T., Takahashi, M.P., Dulhunty, A.F., and Sakoda, S. (2005). Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 14, 2189-2200.
- Klesert, T.R., Otten, A.D., Bird, T.D., and Tapscott, S.J. (1997). Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP. *Nat Genet* 16, 402-406.
- Konieczny, P., Selma-Soriano, E., Rapisarda, A.S., Fernández-Costa, J.M., Perez-Alonso, M., and Artero, R. (2017). Myotonic dystrophy: candidate small molecule therapeutics. *Drug Discov Today* 22, 1740-1748.
- Konieczny, P., Stepniak-Konieczna, E., and Sobczak, K. (2014). MBNL proteins and their target RNAs, interaction and splicing regulation. *Nucleic Acids Res* 42, 10873-10887.
- Kooy, A., de Jager, J., Lehert, P., Bets, D., Wulffele, M.G., Donker, A.J., and Stehouwer, C.D. (2009). Long-term effects of metformin on metabolism and microvascular and macrovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 169, 616-625.
- Korade-Mirnic, Z., Tarleton, J., Servidei, S., Casey, R.R., Gennarelli, M., Pegoraro, E., Angelini, C., and Hoffman, E.P. (1999). Myotonic dystrophy: tissue-specific effect of somatic CTG expansions on allele-specific DMAHP/SIX5 expression. *Hum Mol Genet* 8, 1017-1023.
- Koshelev, M., Sarma, S., Price, R.E., Wehrens, X.H., and Cooper, T.A. (2010). Heart-specific overexpression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 19, 1066-1075.
- Kosmider, B., and Wells, R.D. (2006). Double-strand breaks in the myotonic dystrophy type 1 and the fragile X syndrome triplet repeat sequences induce different types of

- mutations in DNA flanking sequences in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 34, 5369-5382.
- Kristiansen, G., Winzer, K.J., Mayordomo, E., Bellach, J., Schluns, K., Denkert, C., Dahl, E., Pilarsky, C., Altevoigt, P., Guski, H., et al. (2003). CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res* 9, 4906-4913.
- Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R.A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., and Lowe, S.W. (2008). Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 134, 657-667.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev* 24, 2463-2479.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J.D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 113 ( Pt 20), 3613-3622.
- Kuyumcu-Martínez, N.M., Wang, G.S., and Cooper, T.A. (2007). Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol Cell* 28, 68-78.
- Labayru, G., Aliri, J., Zulaica, M., López de Munain, A., and Sistiaga, A. (2019). Age-related cognitive decline in myotonic dystrophy type 1: An 11-year longitudinal follow-up study. *J Neuropsychol*.
- Labayru, G., Arenzana, I., Aliri, J., Zulaica, M., López de Munain, A., and Sistiaga, A.A. (2018). Social cognition in myotonic dystrophy type 1: Specific or secondary impairment? *PLoS One* 13, e0204227.
- Laberge, L., Begin, P., Montplaisir, J., and Mathieu, J. (2004). Sleep complaints in patients with myotonic dystrophy. *J Sleep Res* 13, 95-100.
- Laberge, L., Dauvilliers, Y., Begin, P., Richer, L., Jean, S., and Mathieu, J. (2009). Fatigue and daytime sleepiness in patients with myotonic dystrophy type 1: to lump or split? *Neuromuscul Disord* 19, 397-402.
- Laguer, E., Dogan, C., De Antonio, M., Audic, F., Bach, N., Barnerias, C., Bellance, R., Cances, C., Chabrol, B., Cuisset, J.M., et al. (2019). A large multicenter study of pediatric myotonic dystrophy type 1 for evidence-based management. *Neurology* 92, e852-e865.
- Landfeldt, E., Nikolenko, N., Jimenez-Moreno, C., Cumming, S., Monckton, D.G., Gorman, G., Turner, C., and Lochmuller, H. (2019). Disease burden of myotonic dystrophy type 1. *J Neurol* 266, 998-1006.
- Lanni, S., and Pearson, C.E. (2019). Molecular genetics of congenital myotonic dystrophy. *Neurobiol Dis* 132, 104533.
- Laustriat, D., Gide, J., Barrault, L., Chautard, E., Benoit, C., Auboeuf, D., Boland, A., Battail, C., Artiguenave, F., Deleuze, J.F., et al. (2015). In Vitro and In Vivo Modulation of Alternative Splicing by the Biguanide Metformin. *Mol Ther Nucleic Acids* 4, e262.
- Lavedan, C., Hofmann-Radvanyi, H., Shelbourne, P., Rabes, J.P., Duros, C., Savoy, D., Dehaupas, I., Luce, S., Johnson, K., and Junien, C. (1993). Myotonic dystrophy: size- and sex-dependent dynamics of CTG meiotic instability, and somatic mosaicism. *Am J Hum Genet* 52, 875-883.
- Leclerc, D., Pham, D.N., Levesque, N., Truongcao, M., Foulkes, W.D., Sapienza, C., and Rozen, R. (2017). Oncogenic role of PDK4 in human colon cancer cells. *Br J Cancer* 116, 930-936.
- Lee, H.W., Blasco, M.A., Gottlieb, G.J., Horner, J.W., 2nd, Greider, C.W., and DePinho, R.A. (1998). Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* 392, 569-574.
- Lehtinen, L., Vainio, P., Wikman, H., Huhtala, H., Mueller, V., Kallioniemi, A., Pantel, K., Kronqvist, P., Kallioniemi, O., Carpen, O., et al. (2017). PLA2G7 associates with hormone receptor negativity in clinical breast cancer samples and regulates epithelial-mesenchymal transition in cultured breast cancer cells. *J Pathol Clin Res* 3, 123-138.

- Leung, T., Chen, X.Q., Tan, I., Manser, E., and Lim, L. (1998). Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol Cell Biol* 18, 130-140.
- Li, W., Ma, H., Zhang, J., Zhu, L., Wang, C., and Yang, Y. (2017). Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Sci Rep* 7, 13856.
- Li, Z., Ge, X., Lu, J., Bian, M., Li, N., Wu, X., Li, Y., Yan, M., and Yu, J. (2019). MiR-141-3p regulates proliferation and senescence of stem cells from apical papilla by targeting YAP. *Exp Cell Res* 383, 111562.
- Lin, X., Miller, J.W., Mankodi, A., Kanadia, R.N., Yuan, Y., Moxley, R.T., Swanson, M.S., and Thornton, C.A. (2006). Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 15, 2087-2097.
- Lindberg, C., and Bjerkne, F. (2017). Prevalence of myotonic dystrophy type 1 in adults in western Sweden. *Neuromuscul Disord* 27, 159-162.
- Liu, C., Hu, W., Li, L.L., Wang, Y.X., Zhou, Q., Zhang, F., Song-Yang, Y.Y., Zhu, W., Sun, C.C., and Li, D.J. (2018). Roles of miR-200 family members in lung cancer: more than tumor suppressors. *Future Oncol* 14, 2875-2886.
- Liu, Q., Gao, J., Zhao, C., Guo, Y., Wang, S., Shen, F., Xing, X., and Luo, Y. (2020). To control or to be controlled? Dual roles of CDK2 in DNA damage and DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* 85, 102702.
- Liu, X., Betzenhauser, M.J., Reiken, S., Meli, A.C., Xie, W., Chen, B.X., Arancio, O., and Marks, A.R. (2012). Role of leaky neuronal ryanodine receptors in stress-induced cognitive dysfunction. *Cell* 150, 1055-1067.
- Liu, Z., Chen, X., Wang, Y., Peng, H., Wang, Y., Jing, Y., and Zhang, H. (2014). PDK4 protein promotes tumorigenesis through activation of cAMP-response element-binding protein (CREB)-Ras homolog enriched in brain (RHEB)-mTORC1 signaling cascade. *J Biol Chem* 289, 29739-29749.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 25, 402-408.
- Llagostera, E., Catalucci, D., Marti, L., Liesa, M., Camps, M., Ciaraldi, T.P., Kondo, R., Reddy, S., Dillmann, W.H., Palacin, M., et al. (2007). Role of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) in glucose homeostasis and muscle insulin action. *PLoS One* 2, e1134.
- Longo, V.D., Antebi, A., Bartke, A., Barzilai, N., Brown-Borg, H.M., Caruso, C., Curiel, T.J., de Cabo, R., Franceschi, C., Gems, D., et al. (2015). Interventions to Slow Aging in Humans: Are We Ready? *Aging Cell* 14, 497-510.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194-1217.
- López Castel, A., Nakamori, M., Tome, S., Chitayat, D., Gourdon, G., Thornton, C.A., and Pearson, C.E. (2011). Expanded CTG repeat demarcates a boundary for abnormal CpG methylation in myotonic dystrophy patient tissues. *Hum Mol Genet* 20, 1-15.
- López de Munain, A., Blanco, A., Emparanza, J.I., Poza, J.J., Marti Masso, J.F., Cobo, A., Martorell, L., Baiget, M., and Martínez Lage, J.M. (1993). Prevalence of myotonic dystrophy in Guipuzcoa (Basque Country, Spain). *Neurology* 43, 1573-1576.
- Lowery, E.M., Brubaker, A.L., Kuhlmann, E., and Kovacs, E.J. (2013). The aging lung. *Clin Interv Aging* 8, 1489-1496.
- Ma, T.C., Buescher, J.L., Oatis, B., Funk, J.A., Nash, A.J., Carrier, R.L., and Hoyt, K.R. (2007). Metformin therapy in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurosci Lett* 411, 98-103.
- Mackrill, J.J. (2010). Ryanodine receptor calcium channels and their partners as drug targets. *Biochem Pharmacol* 79, 1535-1543.
- MacNee, W., Rabinovich, R.A., and Choudhury, G. (2014). Ageing and the border between health and disease. *Eur Respir J* 44, 1332-1352.



- Magee, A., and Nevin, N.C. (1999). The epidemiology of myotonic dystrophy in Northern Ireland. *Community Genet* 2, 179-183.
- Malatesta, M. (2012). Skeletal muscle features in myotonic dystrophy and sarcopenia: do similar nuclear mechanisms lead to skeletal muscle wasting? *Eur J Histochem* 56, e36.
- Mammarella, A., Ferroni, P., Paradiso, M., Martini, F., Paoletti, V., Morino, S., Antonini, G., Gazzaniga, P.P., Musca, A., and Basili, S. (2002). Tumor necrosis factor-alpha and myocardial function in patients with myotonic dystrophy type 1. *J Neurol Sci* 201, 59-64.
- Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M., and Thornton, C.A. (2000). Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 289, 1769-1773.
- Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci* 27, 514-520.
- Marcoval, J., Olive, M., Bonfill-Orti, M., Martínez-Molina, L., and Talavera-Belmonte, A. (2016). Cutaneous Neoplasms in Myotonic Dystrophy Type 1. *Dermatology* 232, 700-703.
- Martorell, L., Martínez, J.M., Carey, N., Johnson, K., and Baiget, M. (1995). Comparison of CTG repeat length expansion and clinical progression of myotonic dystrophy over a five year period. *J Med Genet* 32, 593-596.
- Martorell, L., Monckton, D.G., Gamez, J., Johnson, K.J., Gich, I., López de Munain, A., and Baiget, M. (1998). Progression of somatic CTG repeat length heterogeneity in the blood cells of myotonic dystrophy patients. *Hum Mol Genet* 7, 307-312.
- Martorell, L., Monckton, D.G., Sanchez, A., López De Munain, A., and Baiget, M. (2001). Frequency and stability of the myotonic dystrophy type 1 premutation. *Neurology* 56, 328-335.
- Mason, P.J., and Bessler, M. (2004). Heterozygous telomerase deficiency in mouse and man: when less is definitely not more. *Cell Cycle* 3, 1127-1129.
- Mateos-Aierdi, A.J., Goicoechea, M., Aiausti, A., Fernández-Torrón, R., García-Puga, M., Matheu, A., and López de Munain, A. (2015). Muscle wasting in myotonic dystrophies: a model of premature aging. *Front Aging Neurosci* 7, 125.
- Matheu, A., Maraver, A., and Serrano, M. (2008). The Arf/p53 pathway in cancer and aging. *Cancer Res* 68, 6031-6034.
- Mathieu, J., Allard, P., Potvin, L., Prevost, C., and Begin, P. (1999). A 10-year study of mortality in a cohort of patients with myotonic dystrophy. *Neurology* 52, 1658-1662.
- Mathieu, J., Boivin, H., Meunier, D., Gaudreault, M., and Begin, P. (2001). Assessment of a disease-specific muscular impairment rating scale in myotonic dystrophy. *Neurology* 56, 336-340.
- Mathieu, J., De Braekeleer, M., and Prevost, C. (1990). Genealogical reconstruction of myotonic dystrophy in the Saguenay-Lac-Saint-Jean area (Quebec, Canada). *Neurology* 40, 839-842.
- Matsumura, T., Iwahashi, H., Funahashi, T., Takahashi, M.P., Saito, T., Yasui, K., Saito, T., Iyama, A., Toyooka, K., Fujimura, H., et al. (2009). A cross-sectional study for glucose intolerance of myotonic dystrophy. *J Neurol Sci* 276, 60-65.
- Matynia, A., Ng, C.H., Dansithong, W., Chiang, A., Silva, A.J., and Reddy, S. (2010). Muscleblind1, but not Dmpk or Six5, contributes to a complex phenotype of muscular and motivational deficits in mouse models of myotonic dystrophy. *PLoS One* 5, e9857.
- McMurray, C.T. (2010). Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. *Nat Rev Genet* 11, 786-799.
- Meinke, P., Hintze, S., Limmer, S., and Schoser, B. (2018). Myotonic Dystrophy-A Progeroid Disease? *Front Neurol* 9, 601.
- Meola, G., and Cardani, R. (2015). Myotonic dystrophies: An update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1852, 594-606.

- Meola, G., and Cardani, R. (2017). Myotonic dystrophy type 2 and modifier genes: an update on clinical and pathomolecular aspects. *Neurol Sci* 38, 535-546.
- Meola, G., Jones, K., Wei, C., and Timchenko, L.T. (2013). Dysfunction of protein homeostasis in myotonic dystrophies. *Histol Histopathol* 28, 1089-1098.
- Mercken, E.M., Crosby, S.D., Lamming, D.W., JeBailey, L., Krzysik-Walker, S., Villareal, D.T., Capri, M., Franceschi, C., Zhang, Y., Becker, K., et al. (2013). Calorie restriction in humans inhibits the PI3K/AKT pathway and induces a younger transcription profile. *Aging Cell* 12, 645-651.
- Michalowski, S., Miller, J.W., Urbinati, C.R., Paliouras, M., Swanson, M.S., and Griffith, J. (1999). Visualization of double-stranded RNAs from the myotonic dystrophy protein kinase gene and interactions with CUG-binding protein. *Nucleic Acids Res* 27, 3534-3542.
- Miller, J.W., Urbinati, C.R., Teng-Umuay, P., Stenberg, M.G., Byrne, B.J., Thornton, C.A., and Swanson, M.S. (2000). Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J* 19, 4439-4448.
- Mishra, S.K., Singh, S., Lee, B., Khosa, S., Moheb, N., and Tandon, V.A. (2018). "Dystrophia Myotonica" and the Legacy of Hans Gustav Wilhelm Steinert. *Ann Indian Acad Neurol* 21, 116-118.
- Mohamed, S., Pruna, L., and Kaminsky, P. (2013). [Increasing risk of tumors in myotonic dystrophy type 1]. *Presse Med* 42, e281-284.
- Moimas, S., Salton, F., Kosmider, B., Ring, N., Volpe, M.C., Bahmed, K., Braga, L., Rehman, M., Vodret, S., Graziani, M.L., et al. (2019). miR-200 family members reduce senescence and restore idiopathic pulmonary fibrosis type II alveolar epithelial cell transdifferentiation. *ERJ Open Res* 5.
- Moiseeva, O., Deschenes-Simard, X., St-Germain, E., Igelmann, S., Huot, G., Cadar, A.E., Bourdeau, V., Pollak, M.N., and Ferbeyre, G. (2013). Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF-kappaB activation. *Aging Cell* 12, 489-498.
- Momenimovahed, Z., Tiznobaik, A., Taheri, S., and Salehiniya, H. (2019). Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *Int J Womens Health* 11, 287-299.
- Monckton, D.G., and Caskey, C.T. (1995). Unstable triplet repeat diseases. *Circulation* 91, 513-520.
- Morine, K.J., Sleeper, M.M., Barton, E.R., and Sweeney, H.L. (2010). Overexpression of SERCA1a in the mdx diaphragm reduces susceptibility to contraction-induced damage. *Hum Gene Ther* 21, 1735-1739.
- Most, J., Tosti, V., Redman, L.M., and Fontana, L. (2017). Calorie restriction in humans: An update. *Ageing Res Rev* 39, 36-45.
- Mosteiro, L., Pantoja, C., Alcazar, N., Marion, R.M., Chondronasiou, D., Rovira, M., Fernández-Marcos, P.J., Muñoz-Martín, M., Blanco-Aparicio, C., Pastor, J., et al. (2016). Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science* 354.
- Mounsey, J.P., John, J.E., 3rd, Helmke, S.M., Bush, E.W., Gilbert, J., Roses, A.D., Perryman, M.B., Jones, L.R., and Moorman, J.R. (2000). Phospholemman is a substrate for myotonic dystrophy protein kinase. *J Biol Chem* 275, 23362-23367.
- Mounsey, J.P., Xu, P., John, J.E., 3rd, Horne, L.T., Gilbert, J., Roses, A.D., and Moorman, J.R. (1995). Modulation of skeletal muscle sodium channels by human myotonin protein kinase. *J Clin Invest* 95, 2379-2384.
- Mu, W., Wang, Z., Ma, C., Jiang, Y., Zhang, N., Hu, K., Li, L., and Wang, Z. (2018). Metformin promotes the proliferation and differentiation of murine preosteoblast by regulating the expression of sirt6 and oct4. *Pharmacol Res* 129, 462-474.
- Mueller, C.M., Hilbert, J.E., Martens, W., Thornton, C.A., Moxley, R.T., 3rd, and Greene, M.H. (2009). Hypothesis: neoplasms in myotonic dystrophy. *Cancer Causes Control* 20, 2009-2020.

- Muñoz-Cánoves, P., Scheele, C., Pedersen, B.K., and Serrano, A.L. (2013). Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *FEBS J* 280, 4131-4148.
- Muñoz-Espín, D., Canamero, M., Maraver, A., Gomez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., et al. (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* 155, 1104-1118.
- Muñoz-Espín, D., and Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 482-496.
- Muranyi, A., Zhang, R., Liu, F., Hirano, K., Ito, M., Epstein, H.F., and Hartshorne, D.J. (2001). Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity. *FEBS Lett* 493, 80-84.
- Musova, Z., Mazanec, R., Krepelova, A., Ehler, E., Vales, J., Jaklova, R., Prochazka, T., Koukal, P., Marikova, T., Kraus, J., et al. (2009). Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene. *Am J Med Genet A* 149A, 1365-1374.
- Nakamori, M., Hamanaka, K., Thomas, J.D., Wang, E.T., Hayashi, Y.K., Takahashi, M.P., Swanson, M.S., Nishino, I., and Mochizuki, H. (2017). Aberrant Myokine Signaling in Congenital Myotonic Dystrophy. *Cell Rep* 21, 1240-1252.
- Nguyen, L., Luu, L.M., Peng, S., Serrano, J.F., Chan, H.Y., and Zimmerman, S.C. (2015). Rationally designed small molecules that target both the DNA and RNA causing myotonic dystrophy type 1. *J Am Chem Soc* 137, 14180-14189.
- Niccoli, T., and Partridge, L. (2012). Ageing as a risk factor for disease. *Curr Biol* 22, R741-752.
- Nishino, J., Kim, I., Chada, K., and Morrison, S.J. (2008). Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell* 135, 227-239.
- Ogami, M., Ikura, Y., Ohsawa, M., Matsuo, T., Kayo, S., Yoshimi, N., Hai, E., Shirai, N., Ehara, S., Komatsu, R., et al. (2004). Telomere shortening in human coronary artery diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 546-550.
- Ogrodnik, M., Miwa, S., Tchkonina, T., Tiniakos, D., Wilson, C.L., Lahat, A., Day, C.P., Burt, A., Palmer, A., Anstee, Q.M., et al. (2017). Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat Commun* 8, 15691.
- Okkersen, K., Buskes, M., Groenewoud, J., Kessels, R.P.C., Knoop, H., van Engelen, B., and Raaphorst, J. (2017). The cognitive profile of myotonic dystrophy type 1: A systematic review and meta-analysis. *Cortex* 95, 143-155.
- Olbrych-Karpinska, B., and Tutaj, A. (1981). [Case of Curschmann-Batten-Steinert syndrome]. *Wiad Lek* 34, 1467-1469.
- Onken, B., and Driscoll, M. (2010). Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLoS One* 5, e8758.
- Ooki, A., VandenBussche, C.J., Kates, M., Hahn, N.M., Matoso, A., McConkey, D.J., Bivalacqua, T.J., and Hoque, M.O. (2018). CD24 regulates cancer stem cell (CSC)-like traits and a panel of CSC-related molecules serves as a non-invasive urinary biomarker for the detection of bladder cancer. *Br J Cancer* 119, 961-970.
- Orengo, J.P., Chambon, P., Metzger, D., Mosier, D.R., Snipes, G.J., and Cooper, T.A. (2008). Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2646-2651.
- Orngreen, M.C., Arlien-Soborg, P., Duno, M., Hertz, J.M., and Vissing, J. (2012). Endocrine function in 97 patients with myotonic dystrophy type 1. *J Neurol* 259, 912-920.
- Osborne, R.J., Lin, X., Welle, S., Sobczak, K., O'Rourke, J.R., Swanson, M.S., and Thornton, C.A. (2009). Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 18, 1471-1481.
- Otten, A.D., and Tapscott, S.J. (1995). Triplet repeat expansion in myotonic dystrophy alters the adjacent chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5465-5469.

- Overby, S.J., Cerro-Herreros, E., Llamusi, B., and Artero, R. (2018). RNA-mediated therapies in myotonic dystrophy. *Drug Discov Today* 23, 2013-2022.
- Palomo, V., Pérez, D.I., Roca, C., Anderson, C., Rodriguez-Muela, N., Pérez, C., Morales-García, J.A., Reyes, J.A., Campillo, N.E., Pérez-Castillo, A.M., et al. (2017). Subtly Modulating Glycogen Synthase Kinase 3 beta: Allosteric Inhibitor Development and Their Potential for the Treatment of Chronic Diseases. *J Med Chem* 60, 4983-5001.
- Pan, H., Lin, H.M., Ku, W.Y., Li, T.C., Li, S.Y., Lin, C.C., and Hsiao, K.M. (2001). Haplotype analysis of the myotonic dystrophy type 1 (DM1) locus in Taiwan: implications for low prevalence and founder mutations of Taiwanese myotonic dystrophy type 1. *Eur J Hum Genet* 9, 638-641.
- Panaite, P.A., Gantelet, E., Kraftsik, R., Gourdon, G., Kuntzer, T., and Barakat-Walter, I. (2008). Myotonic dystrophy transgenic mice exhibit pathologic abnormalities in diaphragm neuromuscular junctions and phrenic nerves. *J Neuropathol Exp Neurol* 67, 763-772.
- Panaite, P.A., Kuntzer, T., Gourdon, G., Lobrinus, J.A., and Barakat-Walter, I. (2013). Functional and histopathological identification of the respiratory failure in a DMSXL transgenic mouse model of myotonic dystrophy. *Dis Model Mech* 6, 622-631.
- Pandey, S.K., Wheeler, T.M., Justice, S.L., Kim, A., Younis, H.S., Gattis, D., Jauvin, D., Puymirat, J., Swayze, E.E., Freier, S.M., et al. (2015). Identification and characterization of modified antisense oligonucleotides targeting DMPK in mice and nonhuman primates for the treatment of myotonic dystrophy type 1. *J Pharmacol Exp Ther* 355, 329-340.
- Panosian, L.A., Porter, V.R., Valenzuela, H.F., Zhu, X., Reback, E., Masterman, D., Cummings, J.L., and Effros, R.B. (2003). Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status. *Neurobiol Aging* 24, 77-84.
- Papaoannou, A., Kennedy, C.C., Cranney, A., Hawker, G., Brown, J.P., Kaiser, S.M., Leslie, W.D., O'Brien, C.J., Sawka, A.M., Khan, A., et al. (2009). Risk factors for low BMD in healthy men age 50 years or older: a systematic review. *Osteoporos Int* 20, 507-518.
- Park, D., Lee, S.H., Shin, J.H., and Park, J.S. (2018). Lower limb muscle magnetic resonance imaging in myotonic dystrophy type 1 correlates with the six-minute walk test and CTG repeats. *Neuromuscul Disord* 28, 29-37.
- Pelargonio, G., Dello Russo, A., Sanna, T., De Martino, G., and Bellocchi, F. (2002). Myotonic dystrophy and the heart. *Heart* 88, 665-670.
- Pešović, J., Peric, S., Brkusanin, M., Brajkusovic, G., Rakocevic-Stojanovic, V., and Savic-Pavicevic, D. (2017). Molecular genetic and clinical characterization of myotonic dystrophy type 1 patients carrying variant repeats within DMPK expansions. *Neurogenetics* 18, 207-218.
- Peter, M.E. (2009). Let-7 and miR-200 microRNAs: guardians against pluripotency and cancer progression. *Cell Cycle* 8, 843-852.
- Petri, H., Vissing, J., Witting, N., Bundgaard, H., and Kober, L. (2012). Cardiac manifestations of myotonic dystrophy type 1. *Int J Cardiol* 160, 82-88.
- Pettersson, O.J., Aagaard, L., Jensen, T.G., and Damgaard, C.K. (2015). Molecular mechanisms in DM1 - a focus on foci. *Nucleic Acids Res* 43, 2433-2441.
- Pincherle, A., Patruno, V., Raimondi, P., Moretti, S., Dominese, A., Martínelli-Boneschi, F., Pisanisi, M.B., Canioni, E., Salerno, F., Deleo, F., et al. (2012). Sleep breathing disorders in 40 Italian patients with Myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord* 22, 219-224.
- Poulos, M.G., Batra, R., Li, M., Yuan, Y., Zhang, C., Darnell, R.B., and Swanson, M.S. (2013). Progressive impairment of muscle regeneration in muscleblind-like 3 isoform knockout mice. *Hum Mol Genet* 22, 3547-3558.
- Poussel, M., Thil, C., Kaminsky, P., Mercy, M., Gomez, E., Chaouat, A., Chabot, F., and Chenuel, B. (2015). Lack of correlation between the ventilatory response to CO<sub>2</sub> and lung function impairment in myotonic dystrophy patients: evidence for a dysregulation at central level. *Neuromuscul Disord* 25, 403-408.

- Pratte, A., Prevost, C., Puymirat, J., and Mathieu, J. (2015). Anticipation in myotonic dystrophy type 1 parents with small CTG expansions. *Am J Med Genet A* 167A, 708-714.
- Prior, T.W. (2009). Technical standards and guidelines for myotonic dystrophy type 1 testing. *Genet Med* 11, 552-555.
- Radvansky, J., Ficek, A., and Kadasi, L. (2011). Upgrading molecular diagnostics of myotonic dystrophies: multiplexing for simultaneous characterization of the DMPK and ZNF9 repeat motifs. *Mol Cell Probes* 25, 182-185.
- Rajdev, A., and Groh, W.J. (2015). Arrhythmias in the muscular dystrophies. *Card Electrophysiol Clin* 7, 303-308.
- Ramos, F.J., Chen, S.C., Garelick, M.G., Dai, D.F., Liao, C.Y., Schreiber, K.H., MacKay, V.L., An, E.H., Strong, R., Ladiges, W.C., et al. (2012). Rapamycin reverses elevated mTORC1 signaling in lamin A/C-deficient mice, rescues cardiac and skeletal muscle function, and extends survival. *Sci Transl Med* 4, 144ra103.
- Ravel-Chapuis, A., Al-Rewashdy, A., Belanger, G., and Jasmin, B.J. (2018). Pharmacological and physiological activation of AMPK improves the spliceopathy in DM1 mouse muscles. *Hum Mol Genet* 27, 3361-3376.
- Ravel-Chapuis, A., Belanger, G., Yadava, R.S., Mahadevan, M.S., DesGroseillers, L., Cote, J., and Jasmin, B.J. (2012). The RNA-binding protein Stauf1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing. *J Cell Biol* 196, 699-712.
- Reddy, S., Smith, D.B., Rich, M.M., Leferovich, J.M., Reilly, P., Davis, B.M., Tran, K., Rayburn, H., Bronson, R., Cros, D., et al. (1996). Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat Genet* 13, 325-335.
- Reiken, S., Lacampagne, A., Zhou, H., Kherani, A., Lehnart, S.E., Ward, C., Huang, F., Gaburjakova, M., Gaburjakova, J., Rosembly, N., et al. (2003). PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure. *J Cell Biol* 160, 919-928.
- Renna, L.V., Bose, F., Brignonzi, E., Fossati, B., Meola, G., and Cardani, R. (2019). Aberrant insulin receptor expression is associated with insulin resistance and skeletal muscle atrophy in myotonic dystrophies. *PLoS One* 14, e0214254.
- Renna, L.V., Cardani, R., Botta, A., Rossi, G., Fossati, B., Costa, E., and Meola, G. (2014). Premature senescence in primary muscle cultures of myotonic dystrophy type 2 is not associated with p16 induction. *Eur J Histochem* 58, 2444.
- Roberts, R., Timchenko, N.A., Miller, J.W., Reddy, S., Caskey, C.T., Swanson, M.S., and Timchenko, L.T. (1997). Altered phosphorylation and intracellular distribution of a (CUG)<sub>n</sub> triplet repeat RNA-binding protein in patients with myotonic dystrophy and in myotonin protein kinase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13221-13226.
- Rohilla, K.J., and Gagnon, K.T. (2017). RNA biology of disease-associated microsatellite repeat expansions. *Acta Neuropathol Commun* 5, 63.
- Rosamond, W., Flegal, K., Furie, K., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Hailpern, S.M., Ho, M., Howard, V., Kissela, B., et al. (2008). Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 117, e25-146.
- Rousselot, P., Coude, M.M., Gokbuget, N., Gambacorti Passerini, C., Hayette, S., Cayuela, J.M., Huguet, F., Leguay, T., Chevallier, P., Salanoubat, C., et al. (2016). Dasatinib and low-intensity chemotherapy in elderly patients with Philadelphia chromosome-positive ALL. *Blood* 128, 774-782.
- Rübber, A., Wahl, R.U., Eggermann, T., Dahl, E., Ortiz-Brüchle, N., and Cacchi, C. (2020). Mutation analysis of multiple pilomatricomas in a patient with myotonic dystrophy type 1 suggests a DM1-associated hypermutation phenotype. *PLoS One* 15, e0230003.
- Rudnik-Schoneborn, S., and Zerres, K. (2004). Outcome in pregnancies complicated by myotonic dystrophy: a study of 31 patients and review of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 114, 44-53.

- Rzuczek, S.G., Southern, M.R., and Disney, M.D. (2015). Studying a Drug-like, RNA-Focused Small Molecule Library Identifies Compounds That Inhibit RNA Toxicity in Myotonic Dystrophy. *ACS Chem Biol* 10, 2706-2715.
- Sahashi, K., Tanaka, M., Tashiro, M., Ohno, K., Ibi, T., Takahashi, A., and Ozawa, T. (1992). Increased mitochondrial DNA deletions in the skeletal muscle of myotonic dystrophy. *Gerontology* 38, 18-29.
- Saisho, Y. (2015). Metformin and Inflammation: Its Potential Beyond Glucose-lowering Effect. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 15, 196-205.
- Salehi, L.B., Bonifazi, E., Stasio, E.D., Gennarelli, M., Botta, A., Vallo, L., Iraci, R., Massa, R., Antonini, G., Angelini, C., et al. (2007). Risk prediction for clinical phenotype in myotonic dystrophy type 1: data from 2,650 patients. *Genet Test* 11, 84-90.
- Sansone, V.A., Gagnon, C., and participants of the 207th, E.W. (2015). 207th ENMC Workshop on chronic respiratory insufficiency in myotonic dystrophies: management and implications for research, 27-29 June 2014, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 25, 432-442.
- Santoro, M., Masciullo, M., Bonvissuto, D., Bianchi, M.L., Michetti, F., and Silvestri, G. (2013). Alternative splicing of human insulin receptor gene (INSR) in type I and type II skeletal muscle fibers of patients with myotonic dystrophy type 1 and type 2. *Mol Cell Biochem* 380, 259-265.
- Santoro, M., Masciullo, M., Silvestri, G., Novelli, G., and Botta, A. (2017). Myotonic dystrophy type 1: role of CCG, CTC and CGG interruptions within DMPK alleles in the pathogenesis and molecular diagnosis. *Clin Genet* 92, 355-364.
- Santoro, M., Piacentini, R., Masciullo, M., Bianchi, M.L., Modoni, A., Podda, M.V., Ricci, E., Silvestri, G., and Grassi, C. (2014). Alternative splicing alterations of Ca<sup>2+</sup> handling genes are associated with Ca<sup>2+</sup> signal dysregulation in myotonic dystrophy type 1 (DM1) and type 2 (DM2) myotubes. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40, 464-476.
- Sardone, V., Zhou, H., Muntoni, F., Ferlini, A., and Falzarano, M.S. (2017). Antisense Oligonucleotide-Based Therapy for Neuromuscular Disease. *Molecules* 22.
- Sarkar, P.S., Appukuttan, B., Han, J., Ito, Y., Ai, C., Tsai, W., Chai, Y., Stout, J.T., and Reddy, S. (2000). Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nat Genet* 25, 110-114.
- Sarkar, P.S., Paul, S., Han, J., and Reddy, S. (2004). Six5 is required for spermatogenic cell survival and spermiogenesis. *Hum Mol Genet* 13, 1421-1431.
- Sarkisian, C.J., Keister, B.A., Stairs, D.B., Boxer, R.B., Moody, S.E., and Chodosh, L.A. (2007). Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 9, 493-505.
- Sato, S., Nakamura, M., Cho, D.H., Tapscott, S.J., Ozaki, H., and Kawakami, K. (2002). Identification of transcriptional targets for Six5: implication for the pathogenesis of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 11, 1045-1058.
- Savkur, R.S., Philips, A.V., and Cooper, T.A. (2001). Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 29, 40-47.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3, 1101-1108.
- Schwarzenbach, H., da Silva, A.M., Calin, G., and Pantel, K. (2015). Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clin Chem* 61, 1333-1342.
- Segel, R., Silverstein, S., Lerer, I., Kahana, E., Meir, R., Sagi, M., Zilber, N., Korczyński, A.D., Shapira, Y., Argov, Z., et al. (2003). Prevalence of myotonic dystrophy in Israeli Jewish communities: inter-community variation and founder premutations. *Am J Med Genet A* 119A, 273-278.
- Seijas-Gomez, R., Basterra-Jimenez, I., Luna-Lario, P., Tirapu-Ustarroz, J., Cabada-Giadas, T., Iridoy-Zulet, M., Jerico-Pascual, I., Gargallo-Vaamonde, A., and López-Goni, J.J. (2015). [A descriptive study of the neuropsychological and psychopathological profile in patients with type 1 myotonic dystrophy]. *Rev Neurol* 61, 529-535.

- Seriola, A., Spits, C., Simard, J.P., Hilven, P., Haentjens, P., Pearson, C.E., and Sermon, K. (2011). Huntington's and myotonic dystrophy hESCs: down-regulated trinucleotide repeat instability and mismatch repair machinery expression upon differentiation. *Hum Mol Genet* 20, 176-185.
- Serrano, M., and Blasco, M.A. (2007). Cancer and ageing: convergent and divergent mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 715-722.
- Seznec, H., Agbulut, O., Sergeant, N., Savouret, C., Ghestem, A., Tabti, N., Willer, J.C., Ourth, L., Duros, C., Brisson, E., et al. (2001). Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. *Hum Mol Genet* 10, 2717-2726.
- Sharma, A., Smith, H.J., Yao, P., and Mair, W.B. (2019). Causal roles of mitochondrial dynamics in longevity and healthy aging. *EMBO Rep* 20, e48395.
- Sherr, C.J., and DePinho, R.A. (2000). Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 102, 407-410.
- Siciliano, G., Manca, M., Gennarelli, M., Angelini, C., Rocchi, A., Iudice, A., Miorin, M., and Mostacciolo, M. (2001a). Epidemiology of myotonic dystrophy in Italy: re-appraisal after genetic diagnosis. *Clin Genet* 59, 344-349.
- Siciliano, G., Mancuso, M., Tedeschi, D., Manca, M.L., Renna, M.R., Lombardi, V., Rocchi, A., Martelli, F., and Murri, L. (2001b). Coenzyme Q10, exercise lactate and CTG trinucleotide expansion in myotonic dystrophy. *Brain Res Bull* 56, 405-410.
- Sicot, G., Gourdon, G., and Gomes-Pereira, M. (2011). Myotonic dystrophy, when simple repeats reveal complex pathogenic entities: new findings and future challenges. *Hum Mol Genet* 20, R116-123.
- Sistiaga, A., Urreta, I., Jodar, M., Cobo, A.M., Emparanza, J., Otaegui, D., Poza, J.J., Merino, J.J., Imaz, H., Marti-Masso, J.F., et al. (2010). Cognitive/personality pattern and triplet expansion size in adult myotonic dystrophy type 1 (DM1): CTG repeats, cognition and personality in DM1. *Psychol Med* 40, 487-495.
- Slayton, W.B., Schultz, K.R., Kairalla, J.A., Devidas, M., Mi, X., Pulsipher, M.A., Chang, B.H., Mullighan, C., Iacobucci, I., Silverman, L.B., et al. (2018). Dasatinib Plus Intensive Chemotherapy in Children, Adolescents, and Young Adults With Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of Children's Oncology Group Trial AALL0622. *J Clin Oncol* 36, 2306-2314.
- Smith, C.A., and Gutmann, L. (2016). Myotonic Dystrophy Type 1 Management and Therapeutics. *Curr Treat Options Neurol* 18, 52.
- Sone, H., and Kagawa, Y. (2005). Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia* 48, 58-67.
- Song, K.Y., Guo, X.M., Wang, H.Q., Zhang, L., Huang, S.Y., Huo, Y.C., Zhang, G., Feng, J.Z., Zhang, R.R., Ma, Y., et al. (2020). MBNL1 reverses the proliferation defect of skeletal muscle satellite cells in myotonic dystrophy type 1 by inhibiting autophagy via the mTOR pathway. *Cell Death Dis* 11, 545.
- Song, Y.M., Lee, Y.H., Kim, J.W., Ham, D.S., Kang, E.S., Cha, B.S., Lee, H.C., and Lee, B.W. (2015). Metformin alleviates hepatosteatosis by restoring SIRT1-mediated autophagy induction via an AMP-activated protein kinase-independent pathway. *Autophagy* 11, 46-59.
- Souidi, A., Zmojdian, M., and Jagla, K. (2018). Dissecting Pathogenetic Mechanisms and Therapeutic Strategies in Drosophila Models of Myotonic Dystrophy Type 1. *Int J Mol Sci* 19.
- Sousa-Victor, P., Gutarra, S., García-Prat, L., Rodríguez-Ubreva, J., Ortet, L., Ruiz-Bonilla, V., Jordi, M., Ballestar, E., González, S., Serrano, A.L., et al. (2014). Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature* 506, 316-321.
- Stewart, S.A., and Weinberg, R.A. (2006). Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 531-557.

- Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M.C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J., et al. (2013). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* 155, 1119-1130.
- Suominen, T., Bachinski, L.L., Auvinen, S., Hackman, P., Baggerly, K.A., Angelini, C., Peltonen, L., Krahe, R., and Udd, B. (2011). Population frequency of myotonic dystrophy: higher than expected frequency of myotonic dystrophy type 2 (DM2) mutation in Finland. *Eur J Hum Genet* 19, 776-782.
- Suzuki, A., Sugiyama, Y., Hayashi, Y., Nyu-i, N., Yoshida, M., Nonaka, I., Ishiura, S., Arahata, K., and Ohno, S. (1998). MKBP, a novel member of the small heat shock protein family, binds and activates the myotonic dystrophy protein kinase. *J Cell Biol* 140, 1113-1124.
- Sznajder, L.J., and Swanson, M.S. (2019). Short Tandem Repeat Expansions and RNA-Mediated Pathogenesis in Myotonic Dystrophy. *Int J Mol Sci* 20.
- Takarada, T., Nishida, A., Takeuchi, A., Lee, T., Takeshima, Y., and Matsuo, M. (2015). Resveratrol enhances splicing of insulin receptor exon 11 in myotonic dystrophy type 1 fibroblasts. *Brain Dev* 37, 661-668.
- Tang, Z.Z., Yarotsky, V., Wei, L., Sobczak, K., Nakamori, M., Eichinger, K., Moxley, R.T., Dirksen, R.T., and Thornton, C.A. (2012). Muscle weakness in myotonic dystrophy associated with misregulated splicing and altered gating of Ca(V)1.1 calcium channel. *Hum Mol Genet* 21, 1312-1324.
- Thomas, J.D., Sznajder, L.J., Bardhi, O., Aslam, F.N., Anastasiadis, Z.P., Scotti, M.M., Nishino, I., Nakamori, M., Wang, E.T., and Swanson, M.S. (2017). Disrupted prenatal RNA processing and myogenesis in congenital myotonic dystrophy. *Genes Dev* 31, 1122-1133.
- Thornell, L.E., Lindstom, M., Renault, V., Klein, A., Mouly, V., Ansved, T., Butler-Browne, G., and Furling, D. (2009). Satellite cell dysfunction contributes to the progressive muscle atrophy in myotonic dystrophy type 1. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35, 603-613.
- Thornton, C.A. (2014). Myotonic dystrophy. *Neurol Clin* 32, 705-719, viii.
- Thornton, C.A., Wang, E., and Carrell, E.M. (2017). Myotonic dystrophy: approach to therapy. *Curr Opin Genet Dev* 44, 135-140.
- Thornton, C.A., Wymer, J.P., Simmons, Z., McClain, C., and Moxley, R.T., 3rd (1997). Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene. *Nat Genet* 16, 407-409.
- Tian, J., Raffa, F.A., Dai, M., Moamer, A., Khadang, B., Hachim, I.Y., Bakdounes, K., Ali, S., Jean-Claude, B., and Lebrun, J.J. (2018). Dasatinib sensitises triple negative breast cancer cells to chemotherapy by targeting breast cancer stem cells. *Br J Cancer* 119, 1495-1507.
- Tigges, J., Krutmann, J., Fritsche, E., Haendeler, J., Schaal, H., Fischer, J.W., Kalfalah, F., Reinke, H., Reifenberger, G., Stuhler, K., et al. (2014). The hallmarks of fibroblast ageing. *Mech Ageing Dev* 138, 26-44.
- Tome, S., Dandelot, E., Dogan, C., Bertrand, A., Genevieve, D., Pereon, Y., group, D.M.c.s., Simon, M., Bonnefont, J.P., Bassez, G., et al. (2018). Unusual association of a unique CAG interruption in 5' of DM1 CTG repeats with intergenerational contractions and low somatic mosaicism. *Hum Mutat* 39, 970-982.
- Tomé, S., and Gourdon, G. (2020). DM1 Phenotype Variability and Triplet Repeat Instability: Challenges in the Development of New Therapies. *Int J Mol Sci* 21.
- Tomé, S., Holt, I., Edelmann, W., Morris, G.E., Munnich, A., Pearson, C.E., and Gourdon, G. (2009). MSH2 ATPase domain mutation affects CTG\*CAG repeat instability in transgenic mice. *PLoS Genet* 5, e1000482.
- Toscano, A., Messina, S., Campo, G.M., Di Leo, R., Musumeci, O., Rodolico, C., Aguenouz, M., Annesi, G., Messina, C., and Vita, G. (2005). Oxidative stress in myotonic dystrophy type 1. *Free Radic Res* 39, 771-776.



- Tsilfidis, C., MacKenzie, A.E., Mettler, G., Barcelo, J., and Korneluk, R.G. (1992). Correlation between CTG trinucleotide repeat length and frequency of severe congenital myotonic dystrophy. *Nat Genet* 1, 192-195.
- Turner, C., and Hilton-Jones, D. (2014). Myotonic dystrophy: diagnosis, management and new therapies. *Curr Opin Neurol* 27, 599-606.
- Ueda, H., Ohno, S., and Kobayashi, T. (2000). Myotonic dystrophy and myotonic dystrophy protein kinase. *Prog Histochem Cytochem* 35, 187-251.
- Ueda, H., Shimokawa, M., Yamamoto, M., Kameda, N., Mizusawa, H., Baba, T., Terada, N., Fujii, Y., Ohno, S., Ishiura, S., et al. (1999). Decreased expression of myotonic dystrophy protein kinase and disorganization of sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle of myotonic dystrophy. *J Neurol Sci* 162, 38-50.
- Ueki, J., Nakamori, M., Nakamura, M., Nishikawa, M., Yoshida, Y., Tanaka, A., Morizane, A., Kamon, M., Araki, T., Takahashi, M.P., et al. (2017). Myotonic dystrophy type 1 patient-derived iPSCs for the investigation of CTG repeat instability. *Sci Rep* 7, 42522.
- Vainio, P., Gupta, S., Ketola, K., Mirtti, T., Mpindi, J.P., Kohonen, P., Fey, V., Perala, M., Smit, F., Verhaegh, G., et al. (2011a). Arachidonic acid pathway members PLA2G7, HPGD, EPHX2, and CYP4F8 identified as putative novel therapeutic targets in prostate cancer. *Am J Pathol* 178, 525-536.
- Vainio, P., Lehtinen, L., Mirtti, T., Hilvo, M., Seppanen-Laakso, T., Virtanen, J., Sankila, A., Nordling, S., Lundin, J., Rannikko, A., et al. (2011b). Phospholipase PLA2G7, associated with aggressive prostate cancer, promotes prostate cancer cell migration and invasion and is inhibited by statins. *Oncotarget* 2, 1176-1190.
- Vallejo-Illarramendi, A., Toral-Ojeda, I., Aldanondo, G., and López de Munain, A. (2014). Dysregulation of calcium homeostasis in muscular dystrophies. *Expert Rev Mol Med* 16, e16.
- van den Broek, W.J., Nelen, M.R., Wansink, D.G., Coerwinkel, M.M., te Riele, H., Groenen, P.J., and Wieringa, B. (2002). Somatic expansion behaviour of the (CTG)<sub>n</sub> repeat in myotonic dystrophy knock-in mice is differentially affected by Msh3 and Msh6 mismatch-repair proteins. *Hum Mol Genet* 11, 191-198.
- van Herpen, R.E., Oude Ophuis, R.J., Wijers, M., Bennink, M.B., van de Loo, F.A., Fransen, J., Wieringa, B., and Wansink, D.G. (2005). Divergent mitochondrial and endoplasmic reticulum association of DMPK splice isoforms depends on unique sequence arrangements in tail anchors. *Mol Cell Biol* 25, 1402-1414.
- Vignaud, A., Ferry, A., Huguet, A., Baraibar, M., Trollet, C., Hyzewicz, J., Butler-Browne, G., Puymirat, J., Gourdon, G., and Furling, D. (2010). Progressive skeletal muscle weakness in transgenic mice expressing CTG expansions is associated with the activation of the ubiquitin-proteasome pathway. *Neuromuscul Disord* 20, 319-325.
- Vihola, A., Bachinski, L.L., Sirito, M., Olufemi, S.E., Hajibashi, S., Baggerly, K.A., Raheem, O., Haapasalo, H., Suominen, T., Holmlund-Hampf, J., et al. (2010). Differences in aberrant expression and splicing of sarcomeric proteins in the myotonic dystrophies DM1 and DM2. *Acta Neuropathol* 119, 465-479.
- Vihola, A., Bassez, G., Meola, G., Zhang, S., Haapasalo, H., Paetau, A., Mancinelli, E., Rouche, A., Hogrel, J.Y., Laforet, P., et al. (2003). Histopathological differences of myotonic dystrophy type 1 (DM1) and PROMM/DM2. *Neurology* 60, 1854-1857.
- Vihola, A., Sirito, M., Bachinski, L.L., Raheem, O., Screen, M., Suominen, T., Krahe, R., and Udd, B. (2013). Altered expression and splicing of Ca(2+) metabolism genes in myotonic dystrophies DM1 and DM2. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39, 390-405.
- Viña, J., Borras, C., and Miquel, J. (2007). Theories of ageing. *IUBMB Life* 59, 249-254.
- von Zglinicki, T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 27, 339-344.
- von Zglinicki, T., and Martín-Ruiz, C.M. (2005). Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Curr Mol Med* 5, 197-203.
- Wagner, A., and Steinberg, H. (2008). Hans Steinert (1875-1911). *J Neurol* 255, 1607-1608.

- Wakimoto, H., Maguire, C.T., Sherwood, M.C., Vargas, M.M., Sarkar, P.S., Han, J., Reddy, S., and Berul, C.I. (2002). Characterization of cardiac conduction system abnormalities in mice with targeted disruption of Six5 gene. *J Interv Card Electrophysiol* 7, 127-135.
- Walker, L., McAleese, K.E., Erskine, D., and Attems, J. (2019). Neurodegenerative Diseases and Ageing. *Subcell Biochem* 91, 75-106.
- Wang, C., Jurk, D., Maddick, M., Nelson, G., Martín-Ruiz, C., and von Zglinicki, T. (2009). DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell* 8, 311-323.
- Wang, G.S., Kearney, D.L., De Biasi, M., Taffet, G., and Cooper, T.A. (2007). Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *J Clin Invest* 117, 2802-2811.
- Wang, J., Qian, Y., and Gao, M. (2019a). Overexpression of PDK4 is associated with cell proliferation, drug resistance and poor prognosis in ovarian cancer. *Cancer Manag Res* 11, 251-262.
- Wang, M., Weng, W.C., Stock, L., Lindquist, D., Martínez, A., Gourdon, G., Timchenko, N., Snape, M., and Timchenko, L. (2019b). Correction of Glycogen Synthase Kinase 3beta in Myotonic Dystrophy 1 Reduces the Mutant RNA and Improves Postnatal Survival of DMSXL Mice. *Mol Cell Biol* 39.
- Wang, Y., An, H., Liu, T., Qin, C., Sesaki, H., Guo, S., Radovick, S., Hussain, M., Maheshwari, A., Wondisford, F.E., et al. (2019c). Metformin Improves Mitochondrial Respiratory Activity through Activation of AMPK. *Cell Rep* 29, 1511-1523 e1515.
- Wang, Y., Hao, L., Wang, H., Santostefano, K., Thapa, A., Cleary, J., Li, H., Guo, X., Terada, N., Ashizawa, T., et al. (2018). Therapeutic Genome Editing for Myotonic Dystrophy Type 1 Using CRISPR/Cas9. *Mol Ther* 26, 2617-2630.
- Wang, Z., Wang, Q., Wang, Q., Wang, Y., and Chen, J. (2017). Prognostic significance of CD24 and CD44 in breast cancer: a meta-analysis. *Int J Biol Markers* 32, e75-e82.
- Wansink, D.G., van Herpen, R.E., Coerwinkel-Driessen, M.M., Groenen, P.J., Hemmings, B.A., and Wieringa, B. (2003). Alternative splicing controls myotonic dystrophy protein kinase structure, enzymatic activity, and subcellular localization. *Mol Cell Biol* 23, 5489
- Ward, A.J., Rimer, M., Killian, J.M., Dowling, J.J., and Cooper, T.A. (2010). CUGBP1 overexpression in mouse skeletal muscle reproduces features of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 19, 3614-3622.
- Warf, M.B., Nakamori, M., Matthys, C.M., Thornton, C.A., and Berglund, J.A. (2009). Pentamidine reverses the splicing defects associated with myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18551-18556.
- Warner, J.P., Barron, L.H., Goudie, D., Kelly, K., Dow, D., Fitzpatrick, D.R., and Brock, D.J. (1996). A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *J Med Genet* 33, 1022-1026.
- Weisleder, N., and Ma, J. (2008). Altered Ca<sup>2+</sup> sparks in aging skeletal and cardiac muscle. *Ageing Res Rev* 7, 177-188.
- Wertz, R.L., Hartwig, G.B., Frost, A.P., Brophy, J.J., Atwater, S.K., and Roses, A.D. (1981). Patients with myotonic dystrophy, a possible segmental progeroid syndrome, and Duchenne muscular dystrophy have fibroblasts with normal limits for in vitro lifespan and growth characteristics. *J Cell Physiol* 107, 255-260.
- Westerlaken, J.H., Van der Zee, C.E., Peters, W., and Wieringa, B. (2003). The DMWD protein from the myotonic dystrophy (DM1) gene region is developmentally regulated and is present most prominently in synapse-dense brain areas. *Brain Res* 971, 116-127.
- Wheeler, T.M., Krym, M.C., and Thornton, C.A. (2007). Ribonuclear foci at the neuromuscular junction in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord* 17, 242-247.
- Wheeler, T.M., Leger, A.J., Pandey, S.K., MacLeod, A.R., Nakamori, M., Cheng, S.H., Wentworth, B.M., Bennett, C.F., and Thornton, C.A. (2012). Targeting nuclear RNA for in vivo correction of myotonic dystrophy. *Nature* 488, 111-115.
- Win, A.K., Perattur, P.G., Pulido, J.S., Pulido, C.M., and Lindor, N.M. (2012). Increased cancer risks in myotonic dystrophy. *Mayo Clin Proc* 87, 130-135.

- Winblad, S., Hellstrom, P., Lindberg, C., and Hansen, S. (2006). Facial emotion recognition in myotonic dystrophy type 1 correlates with CTG repeat expansion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77, 219-223.
- Wong, L.J., Ashizawa, T., Monckton, D.G., Caskey, C.T., and Richards, C.S. (1995). Somatic heterogeneity of the CTG repeat in myotonic dystrophy is age and size dependent. *Am J Hum Genet* 56, 114-122.
- Woolbright, B.L., Choudhary, D., Mikhalyuk, A., Trammel, C., Shanmugam, S., Abbott, E., Pilbeam, C.C., and Taylor, J.A., 3rd (2018). The Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinase-4 (PDK4) in Bladder Cancer and Chemoresistance. *Mol Cancer Ther* 17, 2004-2012.
- Wozniak, J.R., Mueller, B.A., Bell, C.J., Muetzel, R.L., Lim, K.O., and Day, J.W. (2013). Diffusion tensor imaging reveals widespread white matter abnormalities in children and adolescents with myotonic dystrophy type 1. *J Neurol* 260, 1122-1131.
- Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J.N., Weigand, B.M., Palmer, A.K., Weivoda, M.M., Inman, C.L., Ogradnik, M.B., Hachfeld, C.M., Fraser, D.G., et al. (2018). Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med* 24, 1246-1256.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445, 656-660.
- Yanovsky-Dagan, S., Avitzour, M., Altarescu, G., Renbaum, P., Eldar-Geva, T., Schonberger, O., Mitrani-Rosenbaum, S., Levy-Lahad, E., Birnbaum, R.Y., Gepstein, L., et al. (2015). Uncovering the Role of Hypermethylation by CTG Expansion in Myotonic Dystrophy Type 1 Using Mutant Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports* 5, 221-231.
- Yetkin-Arik, B., Vogels, I.M.C., Nowak-Sliwinska, P., Weiss, A., Houtkooper, R.H., Van Noorden, C.J.F., Klaassen, I., and Schlingemann, R.O. (2019). The role of glycolysis and mitochondrial respiration in the formation and functioning of endothelial tip cells during angiogenesis. *Sci Rep* 9, 12608.
- Yi, M., Weaver, D., and Hajnoczky, G. (2004). Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit. *J Cell Biol* 167, 661-672.
- Yin, Q., Wang, H., Li, N., Ding, Y., Xie, Z., Jin, L., Li, Y., Wang, Q., Liu, X., Xu, L., et al. (2020). Dosage effect of multiple genes accounts for multisystem disorder of myotonic dystrophy type 1. *Cell Res* 30, 133-145.
- Young, A.R., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J.F., Tavares, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F.M., et al. (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* 23, 798-803.
- Zampetti, A., Silvestri, G., Manco, S., Khamis, K., Masciullo, M., Bianchi, M.L., Damiani, A., Santoro, M., Linder, D., Bewley, A., et al. (2015). Dysplastic nevi, cutaneous melanoma, and other skin neoplasms in patients with myotonic dystrophy type 1: a cross-sectional study. *J Am Acad Dermatol* 72, 85-91.
- Zhu, Y., Tchkonja, T., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Dai, H.M., Ling, Y.Y., Stout, M.B., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Johnson, K.O., Giles, C.B., et al. (2016). Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell* 15, 428-435.
- Zhu, Y., Tchkonja, T., Pirtskhalava, T., Gower, A.C., Ding, H., Giorgadze, N., Palmer, A.K., Ikeno, Y., Hubbard, G.B., Lenburg, M., et al. (2015). The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 14, 644-658.
- Zu, T., Gibbens, B., Doty, N.S., Gomes-Pereira, M., Huguet, A., Stone, M.D., Margolis, J., Peterson, M., Markowski, T.W., Ingram, M.A., et al. (2011). Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 260-265.
- Zu, T., Guo, S., Bardhi, O., Ryskamp, D.A., Li, J., Khoramian Tusi, S., Engelbrecht, A., Klippel, K., Chakrabarty, P., Nguyen, L., et al. (2020). Metformin inhibits RAN translation through PKR pathway and mitigates disease in C9orf72 ALS/FTD mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*.



***ANEXOS***

---



## **Anexo 1: Resolución del Comité de Ética de Investigación Clínica**



**Donostia Ospitalea**  
Hospital Donostia

### **INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

**D. José Ignacio Emparanza Knörr**, Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica del Área Sanitaria de Gipuzkoa,

#### **CERTIFICA:**

Que este Comité, de acuerdo a la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica, Principios éticos de la declaración de Helsinki y resto de principios éticos aplicables, ha evaluado el Estudio Observacional titulado: *“Bases moleculares del riesgo oncológico en la distrofia miotónica”*

Y que este Comité reunido el día 22 de Septiembre ha decidido emitir **Informe Favorable** a que dicho estudio sea realizado por el siguiente investigador:

- Adolfo López de Munain – Neurología - OSI Donostialdea

Lo que firmo en San Sebastián, a 22 de Septiembre de 2015

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Emparanza', with a long horizontal stroke extending to the right.

Fdo.: Jose Ignacio Emparanza





## Anexo 2: Consentimiento Informado



Código Proyecto: ALM-DM1-2015

VERSIÓN 1.0 de 7 de Julio 2015

### **CONSENTIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Investigador/Responsable clínico:** Dr. Adolfo López de Munain, (Servicio de Neurología, Hospital Universitario Donostia)

**TÍTULO DEL PROYECTO: Bases moleculares del riesgo oncológico en la distrofia miotónica**

Yo.....con DNI..... declaro que he leído la Hoja de Información al paciente, de la que se me ha entregado una copia. Se me han explicado las características del estudio, así como los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar, los derechos que puedo ejercitar, y las previsiones sobre el tratamiento de datos y muestras. He recibido suficiente información sobre el estudio.

Sé que se mantendrá en secreto mi identidad y que se identificarán mis muestras SANGRE/PIEL/TUMOR con un sistema de codificación. Soy libre de revocar mi consentimiento en cualquier momento y por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y sin que repercuta negativamente sobre cualquier tratamiento médico presente o futuro.

Yo doy mi consentimiento para que se utilicen mis muestras y los datos asociados como parte de **este proyecto de investigación**. Consiento en participar voluntariamente.

Por la presente afirmo haber sido advertido sobre la posibilidad de recibir información relativa a mi salud derivada de los análisis genéticos (cuando se realicen) que se realicen sobre mi muestra biológica.

Yo solicito información

Yo no quiero recibir información

una vez finalizada la investigación sobre los resultados del estudio.

Si hubiera excedente de la muestra, afirmo haber sido advertido sobre las opciones de destino al finalizar el proyecto de investigación.

En este sentido:

Solicito la destrucción de la muestra excedente

Solicito la incorporación del excedente en el Biobanco Vasco

Fecha .....

Firma del paciente .....

Fecha:.....

Firma representante legal (si procede).....

Nombre representante legal: .....

Relación con el paciente: .....

Constato que he explicado las características del proyecto de investigación y las condiciones de conservación que se aplicarán a la muestra y a los datos conservados.

Nombre del Investigador o la persona designada para proporcionar la información:

Fecha .....

Firma .....

**CONSENTIMIENTO PARA LA DONACIÓN DE MUESTRAS AL BIOBANCO VASCO PARA LA INVESTIGACIÓN**

**Responsable clínico:** Dr. Adolfo López de Munain

**Yo:** \_\_\_\_\_

He sido informado sobre la posibilidad de transferir y almacenar la muestra junto con la información clínica relacionada al Biobanco Vasco para la Investigación.

He sido informado sobre la finalidad de la **conservación**, el lugar de conservación, así como sobre las garantías de cumplimiento de la legalidad vigente y de la posibilidad de ceder las muestras para futuros proyectos de investigación. Se me ha informado que el presente consentimiento será custodiado en las instalaciones del Biobanco en el Hospital Donostia.

Yo **DOY** mi consentimiento para que el centro sanitario \_\_\_\_\_ transfiera mis muestras y los datos de salud relevantes (excepto los que me identifiquen) de la patología o proceso (distrofia miotónica), al Biobanco Vasco para la Investigación.

Se me ha advertido sobre la posibilidad de consentir en donar la muestra y los datos asociados de forma anonimizada:

DESEO QUE LAS MUESTRAS Y DATOS ESTÉN ANONIMIZADOS\*\*

DESEO QUE LAS MUESTRAS Y DATOS ESTÉN CODIFICADOS\*

Se me ha advertido sobre la posibilidad de recibir información relativa a mi salud derivada de futuros análisis genéticos que pudieran realizarse sobre mi muestra biológica (si la muestra se ha donado codificada y se han obtenido datos genéticos).

Yo solicito información

Yo no quiero recibir información

Fecha .....

Firma del paciente .....

Fecha :.....

Firma representante legal (si procede).....

Nombre representante legal:.....

Relación con el paciente: .....

Constato que he explicado las características de las condiciones de conservación y seguridad que se aplicarán a la muestra y a los datos clínicos conservados.

Nombre del clínico responsable:

Fecha .....

Firma .....

\*muestra codificada: la muestra se identifica con un número que sólo su médico o el coordinador del Biobanco Vasco en su hospital podrá relacionarla con usted.

\*\*muestra anonimizada es aquella no asociada con los datos identificativos.

## ANEXO ACLARATORIO

Se garantiza que la realización de este proyecto, el tratamiento, almacenamiento y utilización de las muestras almacenadas en el biobanco cumplirán con la

### **normativa aplicable:**

Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. En observancia a esta ley los datos de carácter personal recogidos en este estudio pasarán a formar parte de un fichero automatizado que reúne las medidas de seguridad de nivel alto.

Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica

Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.

## ¿QUÉ ES UN BIOBANCO?

Un **biobanco** es un centro de conservación, en condiciones adecuadas, de muestras, tejidos, ADN y otros derivados, que representan un valioso instrumento con destino a la investigación de enfermedades y que puede permitir la obtención de conocimientos que sirvan para el desarrollo de nuevas estrategias y terapias aplicables a pacientes.

El Biobanco de BIOEF está constituido en nodos, uno de los cuales está ubicado en el Hospital ....., en donde se almacenará y conservará su muestra.

Los proyectos de investigación realizados con las muestras almacenadas en el Biobanco serán aprobados por un Comité de Ética de la Investigación, y, si procede, autorizado por la autoridad sanitaria pertinente, previo informe favorable de los comités ético y científico externos del Biobanco.

Tanto el Biobanco Vasco para la Investigación, como el investigador al que en un futuro se puedan ceder las muestras, son responsables del manejo de los Datos, conforme a la Ley orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, sobre Protección de Datos de Carácter Personal. El Hospital \_\_\_\_\_ garantiza que en ningún caso saldrá del centro dato alguno que le identifique personalmente.



## **Anexo 3: Hoja de Información al Paciente**



Código Proyecto: ALM-DM1-2015

VERSIÓN 1.0 de 7 de Julio 2015

### **HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE** **(EXTRACCIÓN DE MUESTRA DE SANGRE, PIEL Y/O TUMOR)**

**Investigador/Responsable clínico:** Dr. Adolfo López de Munain, (Servicio de Neurología, Hospital Universitario Donostia)

**TÍTULO DEL PROYECTO:** Bases moleculares del riesgo oncológico en la distrofia miotónica

#### **FINALIDAD DEL ESTUDIO**

Como parte de las intervenciones y pruebas que le están realizando, se le va a extraer una muestra biológica de sangre/piel/tumor, parte de la cual será conservada para su análisis en el Instituto Biodonostia (área de Neurociencias/área de Oncología) y Biobanco Vasco de ADN y Tejidos para la Investigación.

Esta muestra es un valioso instrumento con destino a la investigación de la enfermedad que puede permitir la obtención de conocimientos que sirvan para la obtención y desarrollo de nuevas estrategias y terapias aplicables a pacientes.

Solicitamos su consentimiento para que el tejido que le ha sido retirado sea destinado a esta línea de investigación.

#### **BENEFICIO Y ATENCIÓN MÉDICA**

La cesión de muestra para la investigación es voluntaria y altruista. Su único beneficio es el que corresponde al avance de la medicina en beneficio de la sociedad, y el saber que ha colaborado en este proceso.

La muestra así recogida no podrá ser objeto directo de actividades con ánimo de lucro. No obstante, la información generada a partir de los estudios realizados sobre su muestra podrá ser fuente de beneficios comerciales. En tal caso, están previstos mecanismos para que estos beneficios reviertan en la salud de la población, aunque no de forma individual en el donante.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria y no tendrá ningún coste para usted.

#### **RIESGOS Y MOLESTIAS**

La única molestia y riesgo relacionado con la toma de muestras de sangre de su brazo que se realizará siguiendo el procedimiento habitual que le puede ocasionar es un pequeño hematoma o una leve infección, que desaparecen en pocos días o con tratamiento adecuado si lo precisase.

El riesgo físico y molestia más frecuente de una biopsia muscular es el dolor. La infección de la herida es muy poco frecuente al realizarse en condiciones estériles. Otra complicación muy

poco frecuente es el hematoma en el sitio de la biopsia, apareciendo con mayor frecuencia en pacientes con enfermedades hematológicas o tratados con fármacos anticoagulantes, o el desvanecimiento.

No existen riesgos significativos en la biopsia de piel. Los riesgos poco frecuentes son leves: inflamación o infección de la zona de la muestra, que remiten con el tratamiento adecuado. Por el riesgo de sangrado local deberá comunicarse si existe alteración en la coagulación de la sangre, de forma directa o por la administración de fármacos anticoagulantes.

#### DESTINO DE LA MUESTRA Y CESIÓN A OTRAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Se solicita su consentimiento para la utilización de las muestras biológicas sobrantes del proceso diagnóstico, con destino a futuras investigaciones de utilidad clínica.

El centro, Hospital Donostia, registrará los datos que puedan identificarle con las muestras a conservar, empleando procedimiento de encriptación y codificación de los datos personales. El centro, Hospital Donostia, garantiza que en ningún caso saldrá del centro dato alguno que le identifique personalmente.

Firmando el consentimiento, Vd. autoriza a que las muestras así conservadas se puedan ceder a terceros con destino a proyectos de investigación relacionados con la adquisición de conocimiento en el área de la Distrofia Miotónica que sean debidamente aprobados por la autoridad sanitaria y dictaminados favorablemente por un Comité de Ética de Investigación. Las muestras se conservarán en tanto sean necesarias para los fines que justificaron su recogida.

La utilización de la muestra biológica para una finalidad distinta a la expresada habrá de ser expresamente autorizada por Vd. en un nuevo documento de consentimiento, previa la información que fuere necesaria. Se le garantiza que, en su caso, el proyecto de investigación será dictaminado favorablemente por un Comité de Ética de Investigación y autorizado por la autoridad sanitaria.

#### REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

En cualquier momento podrá Vd. revocar el consentimiento para utilizar las muestras obtenidas, pudiendo solicitar la destrucción o la anonimización de las mismas. No obstante, los efectos de la revocación no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que se hayan llevado a cabo previamente a la misma.

En estos casos, se romperá irreversiblemente todo vínculo que permita relacionar las muestras y los datos almacenados con su persona.

#### DERECHOS Y GARANTÍAS

Los datos que se obtengan del estudio sólo le serán comunicados, en el caso de que dichos hallazgos tengan una implicación significativa para su salud y de que exista una posibilidad real de mejorar esa condición de salud. Sin embargo, en caso de estar interesado, usted tiene derecho a solicitarlos.

La información que se obtenga puede implicar a sus familiares, siendo únicamente Vd. el responsable de facilitar, en su caso, información a los mismos, o proporcionar a las personas responsables del estudio los datos precisos para su localización y contacto.

Los resultados del estudio podrán ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones científicas. Se le garantiza la absoluta confidencialidad en la información obtenida en este estudio máxime en lo concerniente al envío y manejo de los datos a terceros según la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, la Ley 41/2002 básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, y la Ley 14/2007 de Investigación biomédica, que garantiza el respeto a la calidad de los proyectos de investigación biomédica y el respeto a la dignidad de las personas durante su consecución.

Si usted precisa mayor información sobre el estudio (acceso, rectificación, cancelación y oposición) puede contactar con el investigador responsable del grupo clínico: Dr. LÓPEZ DE MUNAIN del HOSPITAL UNIVERSITARIO DONOSTIA.



#### **Anexo 4: Muscular Impairment Rating Scale**

ESCALA MIRS según Mathieu *et al.*, 2001.

- 0 Sin afectación muscular
- 1 Signos mínimos: miotonía, debilidad mandibular y temporal, debilidad facial, debilidad de flexores del cuello, ptosis, habla nasal, debilidad aislada de flexores de dedos sin otra debilidad distal
- 2 Debilidad distal: no debilidad proximal, salvo extensores del codo
- 3 Debilidad proximal leve a moderada
- 4 Debilidad proximal grave: igual o menor a 3/5



## **Anexo 5: Listado de muestras de PBMCs**

**Anexo 5. Tabla 1.** Listado de muestras de PBMCs de controles sanos usados para estudios de expresión de ARNm.

<b>Código</b>	<b>Género</b>	<b>Edad (años)</b>
Mujer-01	Mujer	40
Mujer-02	Mujer	42
Mujer-03	Mujer	38
Mujer-04	Mujer	44
Mujer-05	Mujer	59
Mujer-06	Mujer	43
Mujer-07	Mujer	51
Mujer-08	Mujer	57
Mujer-09	Mujer	55
Mujer-10	Mujer	44
Hombre-01	Hombre	40
Hombre-02	Hombre	53
Hombre-03	Hombre	42
Hombre-04	Hombre	45
Hombre-05	Hombre	43
Hombre-06	Hombre	42
Hombre-07	Hombre	53
Hombre-08	Hombre	41
Hombre-09	Hombre	46
Hombre-10	Hombre	31
Hombre-11	Hombre	34
Hombre-12	Hombre	54

**Anexo 5. Tabla 2.** Listado de muestras de PBMCs de pacientes con DM1 usados para estudios de expresión de ARNm.

Código	Género	Edad (años)	CTG (n)	MIRS	Edad cáncer
DM1-Mujer-01	Mujer	46	667	3	No
DM1-Mujer-02	Mujer	47	1167	3	No
DM1-Mujer-03	Mujer	35	1167	4	No
DM1-Mujer-04	Mujer	53	1667	-	No
DM1-Mujer-05	Mujer	41	667	3	No
DM1-Mujer-06	Mujer	31	500	2	No
DM1-Mujer-07	Mujer	37	1333	3	No
DM1-Mujer-08	Mujer	18	667	1	No
DM1-Mujer-09	Mujer	36	1000	3	No
DM1-Mujer-10	Mujer	44	1000	4	No
DM1-Mujer-11	Mujer	56	667	4	No
DM1-Mujer-12	Mujer	29	467	2	No
DM1-Mujer-13	Mujer	50	600	3	No
DM1-Mujer-14	Mujer	37	1400	3	No
DM1-Mujer-15	Mujer	45	667	3	No
DM1-Mujer-16	Mujer	32	500	-	No
DM1-Mujer-17	Mujer	44	667	3	No
DM1-Hombre-01	Hombre	27	500	-	No
DM1-Hombre-02	Hombre	31	333	2	No
DM1-Hombre-03	Hombre	26	1000	-	No
DM1-Hombre-04	Hombre	24	467	3	No
DM1-Hombre-05	Hombre	51	1333	4	No
DM1-Hombre-06	Hombre	35	1000	3	No
DM1-Hombre-07	Hombre	50	667	3	No
DM1-Hombre-08	Hombre	39	1333	4	No
DM1-Hombre-09	Hombre	37	1000	2	No
DM1-Hombre-10	Hombre	37	1000	-	No
DM1-Hombre-11	Hombre	36	400	3	No
DM1-Hombre-12	Hombre	35	667	3	No
DM1-Hombre-13	Hombre	37	1000	2	No
DM1-Hombre-14	Hombre	58	833	3	No
DM1-Hombre-15	Hombre	56	1000	3	No
DM1-Hombre-16	Hombre	49	667	-	No
DM1-Hombre-17	Hombre	53	800	4	No
DM1-Hombre-18	Hombre	42	667	4	No
DM1-Hombre-19	Hombre	41	500	3	No
DM1-Hombre-20	Hombre	37	1000	3	No
DM1-Hombre-21	Hombre	34	667	3	No

**Anexo 5. Tabla 3.** Continúa. Listado de muestras de PBMCs pacientes con DM1 usados para estudios de expresión de ARNm.

Código	Género	Edad (años)	CTG (n)	MIRS	Edad cáncer
DM1-Mujer-Cáncer-01	Mujer	65	1500	4	52
DM1-Mujer-Cáncer-02	Mujer	42	833	3	43
DM1-Mujer-Cáncer-03	Mujer	39	833	-	Desconocido
DM1-Mujer-Cáncer-04	Mujer	61	1167	4	39
DM1-Mujer-Cáncer-05	Mujer	41	1000	4	35
DM1-Mujer-Cáncer-06	Mujer	38	1000	4	37
DM1-Mujer-Cáncer-07	Mujer	41	500	4	38
DM1-Mujer-Cáncer-08	Mujer	65	333	4	65
DM1-Mujer-Cáncer-09	Mujer	51	1500	4	41 y 51
DM1-Mujer-Cáncer-10	Mujer	34	1650	4	17
DM1-Mujer-Cáncer-11	Mujer	48	1333	3	45
DM1-Mujer-Cáncer-12	Mujer	48	1333	2	43 y 47
DM1-Hombre-Cáncer-01	Hombre	48	333	3	31
DM1-Hombre-Cáncer-02	Hombre	52	1000	3	49
DM1-Hombre-Cáncer-03	Hombre	56	333	3	52
DM1-Hombre-Cáncer-04	Hombre	57	1333	3	50
DM1-Hombre-Cáncer-05	Hombre	55	267	-	Desconocido
DM1-Hombre-Cáncer-06	Hombre	54	333	4	51

**Anexo 5. Tabla 3.** Listado de muestras de PBMCs tanto de controles como de pacientes con DM1 usadas en el array de expresión genética.

Código	Género	Edad (años)	CTG (n)	MIRS
Control-Mujer	Mujer	40	-	-
Control-Mujer	Mujer	42	-	-
Control-Mujer	Mujer	38	-	-
Control-Mujer	Mujer	44	-	-
Control-Mujer	Mujer	44	-	-
Control-Hombre	Hombre	42	-	-
Control-Hombre	Hombre	43	-	-
Control-Hombre	Hombre	42	-	-
Control-Hombre	Hombre	41	-	-
Control-Hombre	Hombre	34	-	-
DM1-Mujer	Mujer	50	600	3
DM1-Mujer	Mujer	44	667	3
DM1-Mujer	Mujer	42	833	3
DM1-Mujer	Mujer	44	1000	4
DM1-Mujer	Mujer	37	1333	3
DM1-Hombre	Hombre	50	233	2
DM1-Hombre	Hombre	41	500	3
DM1-Hombre	Hombre	49	667	-
DM1-Hombre	Hombre	42	667	4
DM1-Hombre	Hombre	35	1000	3

**Anexo 5. Tabla 4.** Listado de muestras de proteínas tanto de controles como de pacientes con DM1 usadas en el presente estudio.

Código	Género	Edad (años)	CTG (n)	MIRS
PROT Control-1	Hombre	26	-	-
PROT Control-2	Hombre	45	-	-
PROT Control-3	Mujer	25	-	-
PROT Control-4	Mujer	43	-	-
PROT Control-5	Mujer	48	-	-
PROT Control-6	Mujer	51	-	-
PROT Control-7	Mujer	53	-	-
PROT DM1-1	Mujer	47	667	3
PROT DM1-2	Mujer	35	333	1
PROT DM1-3	Hombre	75	167	3
PROT DM1-4	Hombre	41	1000	2
PROT DM1-5	Hombre	22	833	3

## **PUBLICACIONES REALIZADAS DURANTE LA TESIS DOCTORAL**

**García-Puga M**, Saenz-Antoñanzas A, Gereñu G, Arrieta-Legorburu A, Fernández-Torrón R, Zulaica M, Saenz A, Araúzo-Bravo MJ, López de Munain A, Matheu A. Whole transcriptome analysis and functional studies reveal that senescence plays a pivotal role in Myotonic Dystrophy type 1. Accepted for publication in **Nature Communications**.

Saenz-Antoñanzas A, Alberro A, Álvarez-Satta M, Iparraguirre L, Mateo-Abad M, Berna-Erro A, **García-Puga M**, Carrasco-García E, Güell C, López de Munain A, Ara I, Vergara I, Otaegui D, Matheu A. Transcriptome analyses reveal senescence pathways associated with frailty. Submitted to **JCI**.

**García-Puga M**, Saenz-Antoñanzas A, Fernández-Torrón R, López de Munain A, Matheu A. Myotonic Dystrophy type 1 cells display impaired metabolism and mitochondrial dysfunction that are reversed by metformin. **Aging (Albany NY)**. 2020 Apr 8;12(7):6260-6275.

Wang Y, Best A, Fernández-Torrón R, Alsaggaf R, **García-Puga M**, Dagnall CL, Hicks B, Thompson M, Matheu Fernández A, Zulaica Ijurco M, Greene MH, López de Munain A, Gadalla SM. Leukocyte telomere length in patients with myotonic dystrophy type I: a pilot study. **Annals of Clinical and Translational Neurology**. 2020 Jan;7(1):126-131.

Fernández-Torrón R\*, **García-Puga M\***, Emparanza JI, Maneiro M, Cobo AM, Poza JJ, Espinal JB, Zulaica M, Ruiz I, Martorell L, Otaegui D, Matheu A, López de Munain A. Cancer risk in DM1 is sex-related and linked to miRNA-200/141 downregulation. **Neurology**. 2016 Sep 20;87(12):1250-7. \*co-first authors

Mateos-Aierdi AJ, Goicoechea M, Aiastui A, Fernández-Torrón R, **García-Puga M**, Matheu A, López de Munain A. Muscle wasting in myotonic dystrophies: a model of premature aging. **Frontiers in Aging and Neuroscience** 2015 Jul 9;7:125.

Aldaz P, Otaegi-Ugartemendia M, Saenz-Antoñanzas A, **García-Puga M**, Moreno- Valladares M, Flores JM, Gerovska D, Araúzo-Bravo MJ, Samprón N, Matheu A, Carrasco-García E. SOX9 promotes tumor progression through the axis BMI1-p21CIP. **Scientific Reports**. 2020 Jan 15;10(1):357.

Carrasco-García E, Álvarez-Satta M, **García-Puga M**, Ribeiro ML, Arévalo S, Araúzo-Bravo M, Matheu A. Therapeutic relevance of SOX9 stem cell factor in gastric cancer. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**. 2019 Feb;23(2):143-152.

Carrasco-García E, **García-Puga M**, Arévalo S, Matheu A. Towards precision medicine: linking genetic and cellular heterogeneity in gastric cancer. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**. 2018 Aug 29;10:1758835918794628.

Santos JC\*, Carrasco-García E\*, **García-Puga M\***, Aldaz P, Montes M, Fernández- Reyes M, de Oliveira CC, Lawrie CH, Araúzo-Bravo MJ, Ribeiro ML, Matheu A. SOX9 Elevation Acts with Canonical WNT Signaling to Drive Gastric Cancer Progression. **Cancer Research**. 2016 Nov 15;76(22):6735-6746. \*co-first authors

Carrasco-García E, Santos JC, García I, Brianti M, **García-Puga M**, Pedrazzoli J Jr, Matheu A, Ribeiro ML. Paradoxical role of SOX2 in gastric cancer. *American Journal of Cancer Research*. 2016 Mar 15;6(4):701-13.