



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“IDENTIFICACIÓN DE RESISTENCIA A LA INSULINA Y
OBESIDAD EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO
MOLECULAR DE DISTROFIA MUSCULAR DE
DUCHENNE/BECKER”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

JUAN DAVID GÓMEZ DURÁN

MÉXICO, D.F.

2009





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Profesor: Homero Hernández y Montes

VOCAL: Profesor: Marisol López López

SECRETARIO: Profesor: Maricela Rodríguez Cruz

1er. SUPLENTE: Profesor: León Patricio Martínez Castilla

2do. SUPLENTE: Profesor: Perla Deyanira Maldonado Jiménez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Maricela Rodríguez Cruz

SUSTENTANTE:

Juan David Gómez Durán

- **Agradecimientos.**

Primeramente a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme pertenecer a este grupo selecto de estudiantes de esta máxima casa de estudios.

A la Facultad de Química, por darme este título como profesionista y es considerada como mi segundo hogar.

Al laboratorio de Biología Molecular, especialmente a la Dra. Maricela Rodríguez por dejarme entrar en esta visión del estudio molecular de la vida.

A los Q.F.B.s Apolos Sánchez y Raúl Sánchez, por la enseñanza y consejos que utilicé en mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Rosa Elena Escobar, a la M en C Ana Claudia Velázquez y al Dr. Ramón Coral, por su colaboración en la selección de los pacientes.

A la Q.F.B. Guadalupe Matute, a la M en C Mariela Bernabé y a la Dra. Mardya López por su valiosa colaboración en la realización y revisión de esta tesis.

A mis queridos compañeros de laboratorio Alfredo, Víctor y Elizabeth con los que compartí momentos muy agradables durante la realización de este proyecto.

- **Dedicatoria.**

A mis padres María Antonieta y Juan David por darme la oportunidad de vivir y ser mis pilares para salir adelante. Les agradezco el amor, cariño, tolerancia, comprensión, libertad y educación que me han brindado y espero no defraudarlos en el camino de la vida y cumplir las expectativas que tienen sobre mí. Los amo con todo mi corazón.

A mi hermana Verónica, por tu cariño y presencia en mi vida, y mostrarme de cómo la vida se puede disfrutar siempre al cien. Te amo hermanita.

A mi tía Irma, a mis primos Carlos, Fernando y Javier, que son un gran ejemplo a seguir, les tengo mucho cariño, respeto y admiración.

A mis hermanos de “Caquita de Chango” (Julio, Edwin, Avraham, Fabián, Eder, Juan, Jonathan, Erick, Ángel y Julio César) por ser parte de mi educación integral recibida y por compartir tantas aventuras conmigo, también gracias a ustedes nunca fui un buen estudiante ni un deportista de alto rendimiento.

En general, a todas las personas con las cuales compartí momentos gloriosos y muy agradables, fueron, son y serán parte de mi vida.

Esta tesis forma parte de un proyecto de investigación que obtuvo financiamiento del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal y del Fondo de Investigación en Salud (clave: FIS/IMSS/PROT/076).

- **Índice General.**

	Páginas
1. Resumen.....	8
2. Introducción.....	9
2.1. Características clínicas y hereditarias de la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y Becker (DMB).....	9
2.2. Fisiología del músculo esquelético.....	12
2.3. El gen DMD.....	16
2.3.1 Mutaciones en el gen DMD.....	17
2.4. La proteína distrofina.....	19
2.5. El complejo de glicoproteínas asociadas a la distrofina (DGC).....	20
2.6. Insulina.....	23
2.6.1. Resistencia a la insulina.....	24
2.6.2. Obesidad.....	26
3. Antecedentes.....	27
3.1. Efectos de la alteración del complejo DGC.....	27
3.1.1 Alteración de la distrofina.....	27
3.1.2 Daño en la permeabilidad de la membrana plasmática.....	28
3.2. Composición corporal en los pacientes con DMD.....	28
4. Planteamiento del problema.....	30
5. Justificación.....	31
6. Objetivo general.....	32

7.	Objetivos particulares.....	32
8.	Diseño y Métodos.....	33
8.1.	Diagrama de flujo.....	33
8.2.	Carta de consentimiento.....	34
8.3.	Tipo de diseño.....	35
8.4.	Sujetos.....	35
8.4.1.	Criterios de selección.....	35
8.5.	Definición de variables.....	36
8.6.	Procedimientos.....	37
8.6.1.	Técnicas de medición.....	38
8.6.1.1.	Características clínicas.....	38
8.6.1.2.	Diagnóstico molecular de la DMD.....	38
8.6.1.3.	Antropometría.....	41
8.6.1.4.	Composición corporal.....	41
8.6.1.5.	Cuantificación de insulina y glucosa.....	42
8.7.	Análisis estadístico.....	42
9.	Resultados.....	43
10.	Discusión.....	53
11.	Conclusiones.....	59
12.	Perspectivas.....	60
13.	Referencias.....	61

1. Resumen.

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X. Los síntomas aparecen desde la infancia temprana, presentando debilidad muscular, dificultad para correr y subir escaleras. La forma menos severa de la enfermedad es la distrofia muscular de Becker (DMB). Las DMD/DMB son causadas por mutaciones en el gen *DMD* que codifica para la distrofina, una proteína citoesquelética sarcolemal. La distrofina se encuentra asociada a otras proteínas en el músculo esquelético, formando en conjunto el complejo de glicoproteínas asociadas a la distrofina (DGC), el cual proporciona una conexión física entre la matriz extracelular y el citoesqueleto, permitiendo que la membrana plasmática tenga la capacidad de resistir el proceso mecánico durante la contracción muscular. Cuando se presentan mutaciones en el gen *DMD*, se ocasiona la pérdida completa de la distrofina o de sus dominios funcionales. La alteración de la distrofina genera un DGC inestable resultando una membrana más débil que puede ser dañada durante la contracción muscular. Se ha observado en ratas con diabetes tipo 2 una expresión de distrofina disminuida y de algunos componentes del DGC, lo que genera debilitamiento del sarcolema lo cual podría alterar la señalización de diferentes moléculas como la insulina. Por otro lado, se ha observado que los pacientes DMD desarrollan sobrepeso u obesidad desde los 7 años. Aunado a la alteración del sarcolema de las fibras musculares, la presencia de sobrepeso u obesidad en los pacientes con DMD/DMB es otro factor de riesgo para el desarrollo de resistencia a la insulina. Sin embargo, no existen a nuestro conocimiento estudios que demuestren en pacientes con diagnóstico molecular de la DMD/DMB el grado de adiposidad y la presencia de resistencia a la insulina. **Objetivo.** Determinar si los pacientes con DMD/DMB con diagnóstico molecular de la distrofia presentan resistencia a la insulina y un mayor grado de adiposidad.

2. Introducción.

2.1. Características clínicas y hereditarias de la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y Becker (DMB).

Las distrofias musculares son enfermedades hereditarias de lenta o rápida progresión, que afectan principalmente al músculo estriado, están caracterizadas por una severa debilidad muscular distribuida de forma variable y que tienen en común un patrón distrófico de necrosis-regeneración particular. Dentro de estas distrofias se conocen la distrofia muscular de Duchenne, la distrofia muscular de Becker, la distrofia de Emery-Dreifuss, las distrofias de cinturas, la distrofia facioescapulohumeral, la distrofia distal y la distrofia oculofaríngea (fig. 1.) (13, 14).

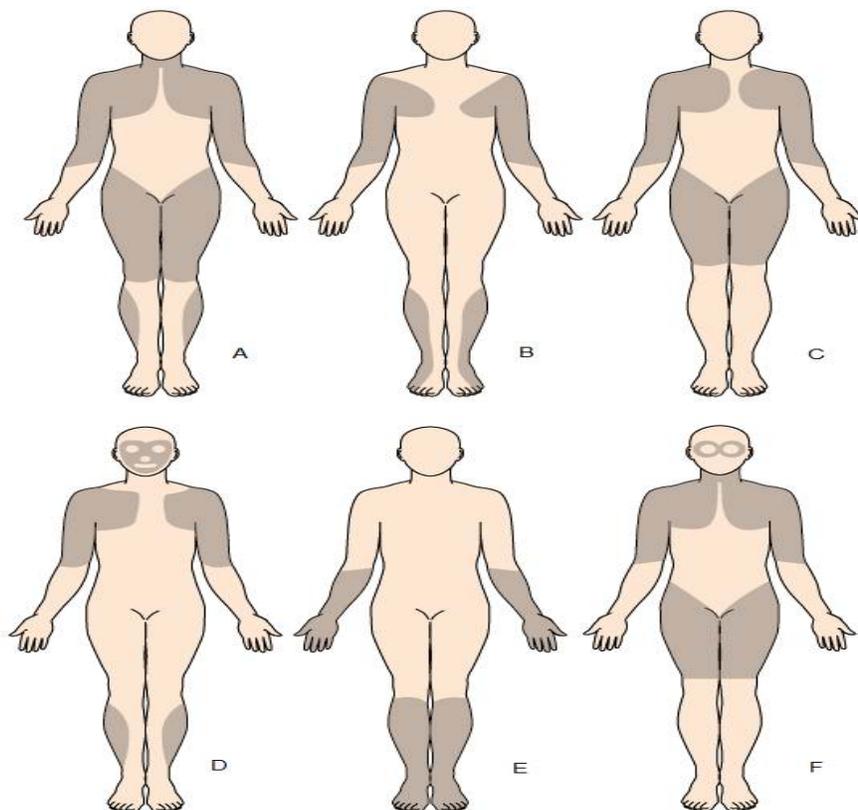


Fig. 1. Músculos afectados en los diferentes tipos de distrofia. A. tipo Duchenne y Becker; B. Emery-Dreifuss; C. de cintura; D. facioescapulohumeral; E. distal; F. oculofaríngea.

Áreas oscuras = músculos afectados (13).

La forma más común de este grupo de enfermedades es la distrofia muscular de Duchenne (DMD) que fue originalmente descrita por Edward Meryon. La DMD tiene una frecuencia elevada de alrededor de 1:3500 varones nacidos vivos en todo el mundo (14). La aparición clínica de la DMD comienza desde la infancia temprana, presentándose con retraso motor entre los 2 y 4 años de edad, dificultad para correr, posteriormente para subir escaleras y finalmente con movilidad limitada a silla de ruedas entre los 9 y 12 años (14).

Los signos clínicos característicos de esta distrofia indican el daño en diferentes músculos que conllevan a debilidad de cintura, hipertrofia o pseudohipertrofia gemelar, y debilidad de los flexores del cuello (fig. 1A). Además, estos pacientes también presentan coeficiente intelectual en el límite mostrándose en algunos casos retraso mental. Otra característica clínica es la presencia del signo de Gowers, en donde los pacientes se incorporan trepando sobre sí mismos. Los individuos que padecen DMD mueren generalmente debido a fallo respiratorio o cardíaco y su expectativa de vida no sobrepasa la mitad de la tercera década de vida (13).

Las características clínicas de la distrofia muscular de Becker (DMB) son similares a las de la DMD. Sin embargo, el inicio de los signos clínicos es alrededor de los 12 años, aunque algunos pacientes presentan los síntomas a edades mayores. Su frecuencia es de 1:18450 varones nacidos vivos en el mundo. La pérdida de la ambulación se produce después de los 16 años y la expectativa de vida por lo general es en la cuarta o quinta década de vida (13).

La DMD/DMB son enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X, y sus características de herencia pueden resumirse de la siguiente manera: a) en general, sólo están afectados los varones, b) la transmisión se realiza a través de heterocigotas, si el producto es varón tendrá 50% de posibilidades de estar afectado o ser sano; si es mujer la posibilidad de ser portadora o sana será del 50%, c) todos los hijos de un varón afectado serán sanos y todas sus hijas serán

portadoras. Además, es importante mencionar que aunque el paciente con DMD no es estéril, no se reproduce por la historia natural propia de la distrofia (fig. 2.), (20).

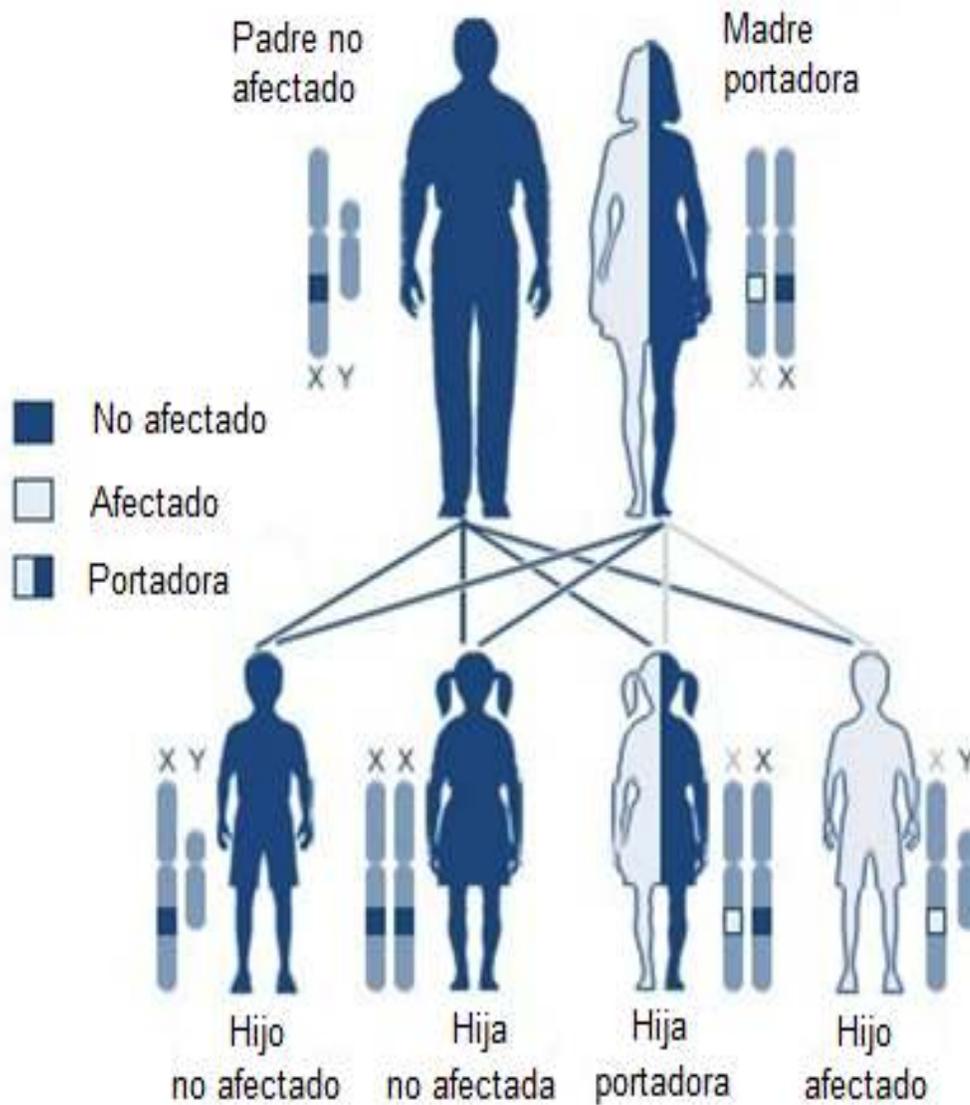


Fig. 2. Herencia recesiva ligada al cromosoma X de la DMD/DMB.

2.2. Fisiología del músculo esquelético.

La organización del músculo esquelético está formada por numerosas fibras que son estructuras largas y cilíndricas, cuyo diámetro varía entre 10 y 80 μm y se extienden a lo largo de la longitud del músculo. Existen varios tipos de fibras, de las cuales se distinguen 3 tipos fundamentalmente: fibras I, IIA y IIB. Las fibras tipo I que generalmente son de coloración pálida o blanca, son ricas en enzimas oxidativas, necesitan del oxígeno para su metabolismo, son de contracción lenta, no se fatigan, y están rodeadas de abundantes capilares. Las fibras tipo IIB de coloración roja son anaeróbicas, glicolíticas, de contracción rápida y fuerte, se fatigan rápidamente y tienen menos capilares adyacentes; y las fibras tipo IIA principalmente son de contracción rápida, medianamente fatigables, poseen tanto capacidad glicolítica como oxidativa (37).

La fibra muscular esta formada por diferentes organelos tal y como se muestra en la figura 3, entre ellos se encuentra la membrana celular llamada sarcolema, la cual es una barrera física contra el ambiente externo y también regula señales entre el exterior y la célula muscular (21). Además, la fibra muscular también contiene un citoplasma denominado sarcoplasma en el cual esta embebido el aparato de Golgi, las miofibrillas, el retículo sarcoplasmático y las mitocondrias. Las mitocondrias proporcionan a las miofibrillas grandes cantidades de energía en forma de ATP. Además, las fibras están conectadas entre sí mediante los túbulos transversales T, los cuales atraviesan el sarcolema, permitiendo la penetración a la célula de los potenciales de acción y la activación del retículo sarcoplasmático. El retículo sarcoplasmático forma una red alrededor de las miofibrillas, almacenando y proporcionando Ca^{2+} que se requiere para la contracción muscular (10).

Lo que más caracteriza a las fibras musculares es la abundancia de miofilamentos organizados en forma de miofibrillas, cada miofibrilla tiene de 1 a 2 μm de diámetro que se extienden desde un extremo de la fibra hasta el otro. Las

miofibrillas están compuestas por unidades contráctiles llamadas sarcómeros, que unidos en sus extremos (cabeza-cola) recorren la longitud completa de la fibra muscular (fig. 3.). El tamaño de cada sarcómero es de 2.5 μm de largo. Los sarcómeros están formados por aproximadamente 1500 filamentos gruesos de miosina y 3000 filamentos delgados de actina adyacentes entre sí, las cuales son moléculas proteicas polimerizadas responsables de la contracción muscular (6).

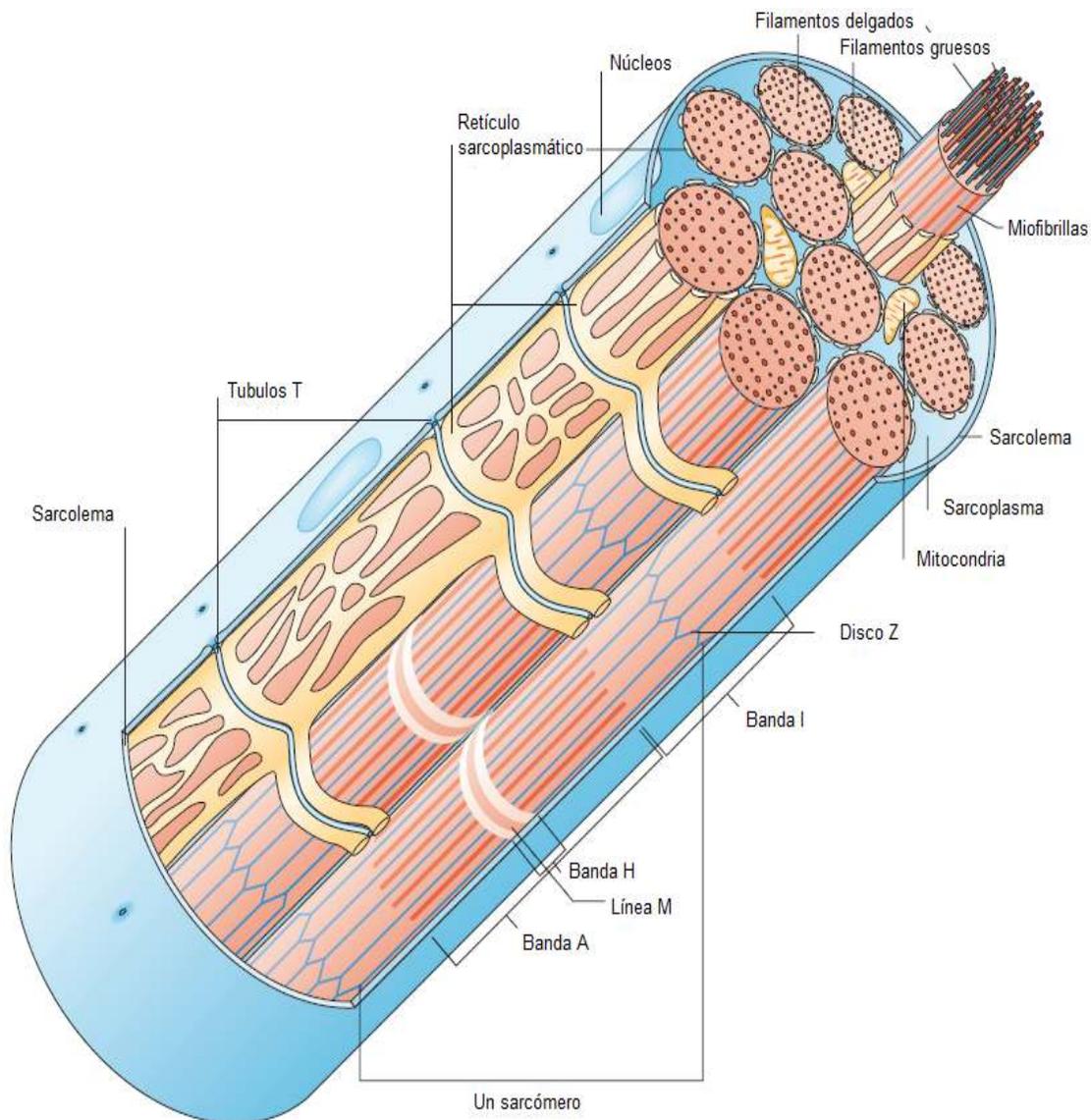


Fig. 3. Estructura de la fibra del músculo esquelético (10).

Estos filamentos se pueden observar por microfotografía electrónica sobre secciones longitudinales, donde las bandas claras contienen solo filamentos de actina y se les denomina bandas I, estas corresponden con los 2 extremos de los sarcómeros adyacentes, mientras que a las bandas oscuras que contienen filamentos de miosina se les denomina bandas A que corresponden con la zona central de cada sarcómero. En el centro de la banda I se encuentra el disco Z, que es la unión de los sarcómeros contiguos. La banda A posee en su centro la zona H y la línea M o disco medio. La línea M y el disco Z definen el límite lateral de cada unidad sarcomérica. Los extremos de los filamentos de actina están unidos al disco Z, los cuales se extienden en ambas direcciones para interdigitarse con los filamentos de miosina. En general, la contracción del sarcómero ocurre cuando las bandas Z se juntan, la fuerza de contracción se genera por un proceso que produce el deslizamiento de un tipo de filamento sobre el otro (10).

La miofibrilla está formada por alrededor de 70 proteínas con diferentes funciones (10, 39), algunas de ellas mostradas en la figura 4, en donde se observa por simplicidad solo una miofibrilla y un túbulo T que es indicado dentro del sarcoplasma. En el sarcolema existe un complejo proteico que participa en diferentes funciones como transducción de señales y resistencia mecánica a la fibra durante el proceso de contracción muscular. Este complejo esta formado principalmente por glicoproteínas asociadas a otras proteínas como la *distrofina*. La *distrofina* une el complejo de glicoproteínas con el sarcolema y con el sarcoplasma. Dentro del sarcoplasma se muestran algunos componentes de la miofibrilla como el retículo sarcoplasmático, el aparato de Golgi y los núcleos con sus respectivas proteínas.

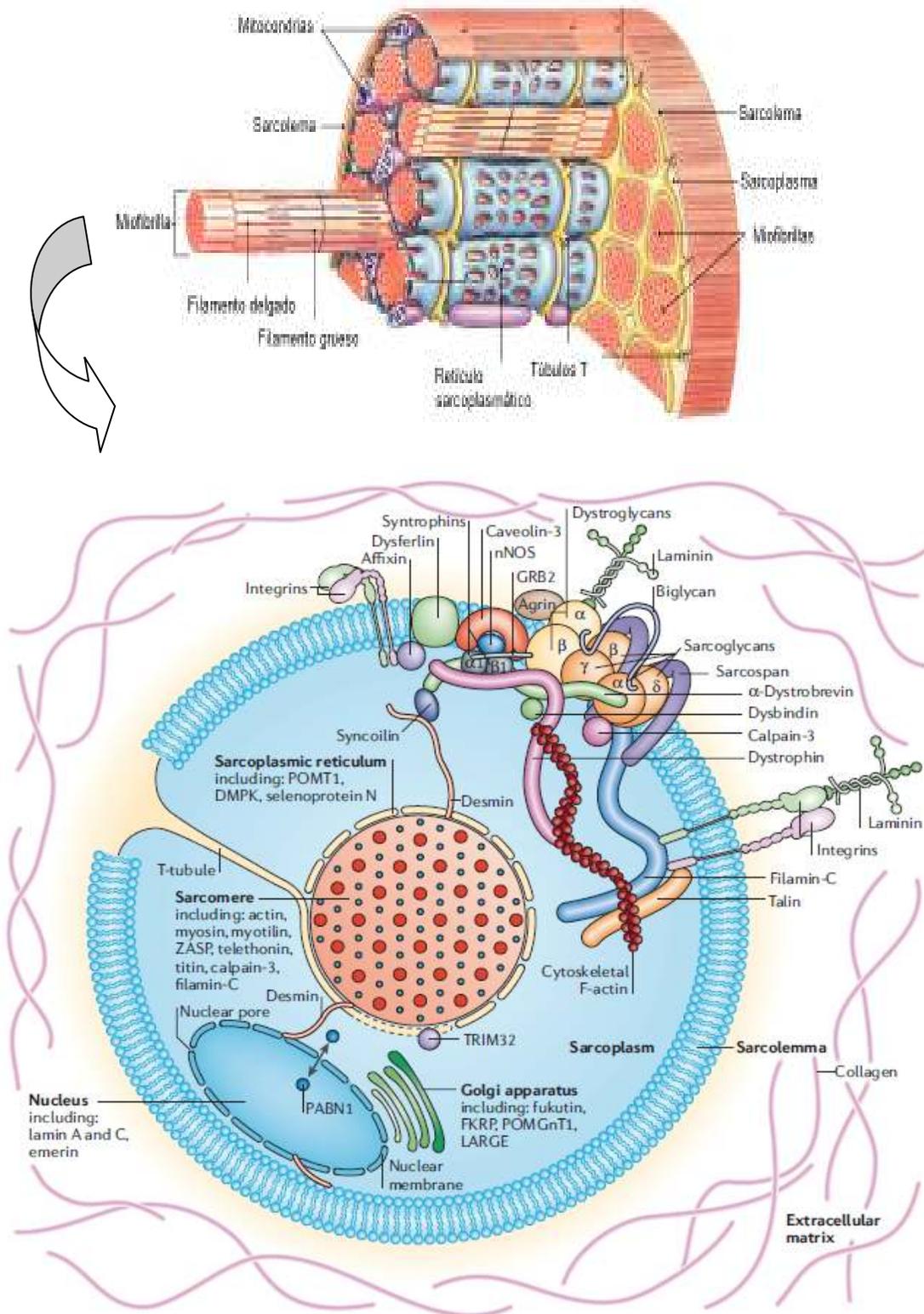
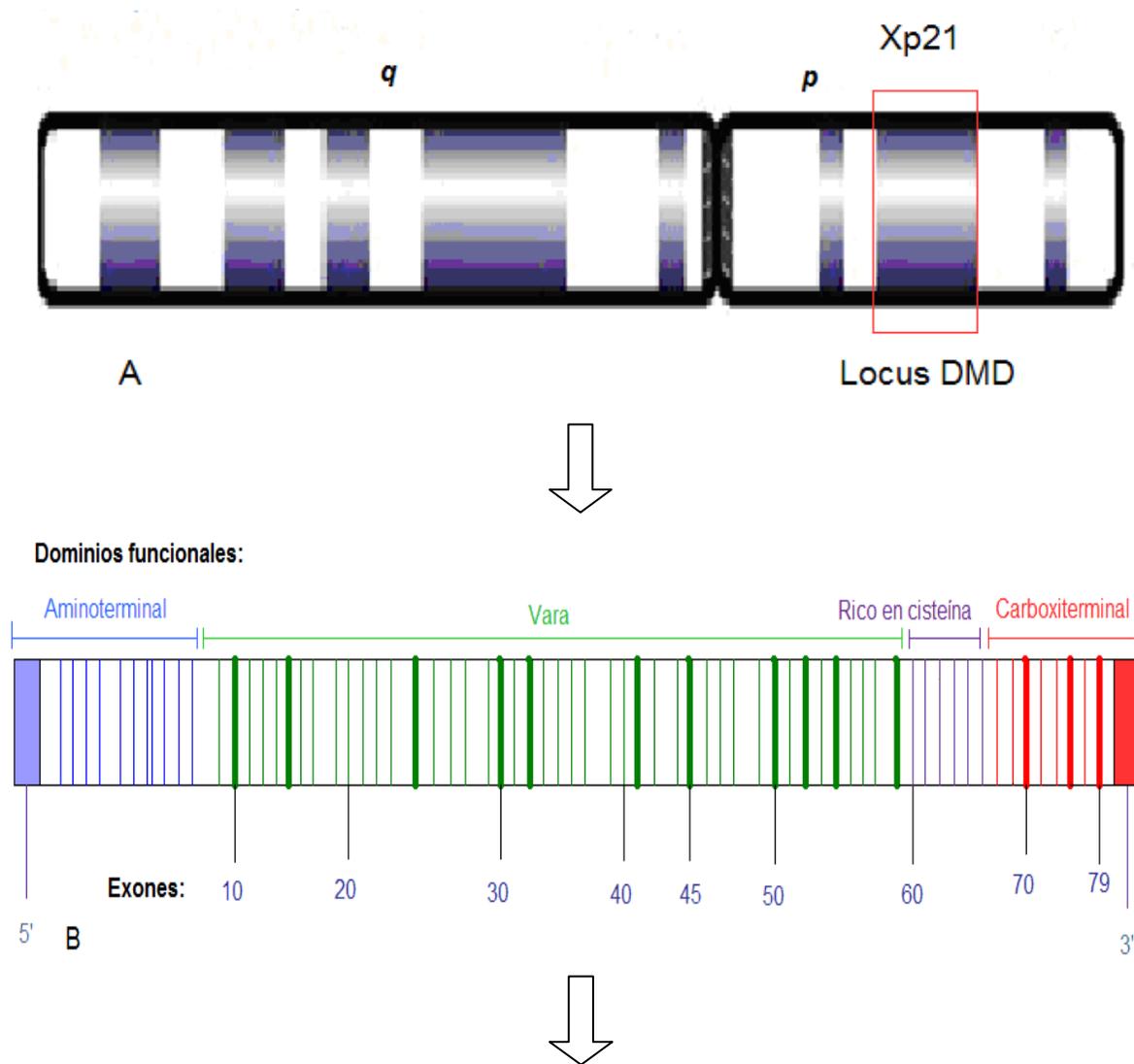


Fig. 4. Corte transversal de una miofibrilla que muestra la localización aproximada de algunos de sus componentes proteicos (10).

2.3. El gen DMD.

El gen de la distrofina se localiza en el cromosoma X en la región Xp21 (26) y está formado por 2.5 Mb en los cuales se encuentran 79 exones que codifican un mRNA de 14 kb. (25). Debido al tamaño de este gen, representa casi el 0.1% del genoma humano (25) y es el más grande que se conoce (26). Esta característica hace que el gen *DMD* presente una alta tasa de mutación, en donde aproximadamente la tercera parte de los casos resultan de mutaciones espontáneas (fig. 5), (2).



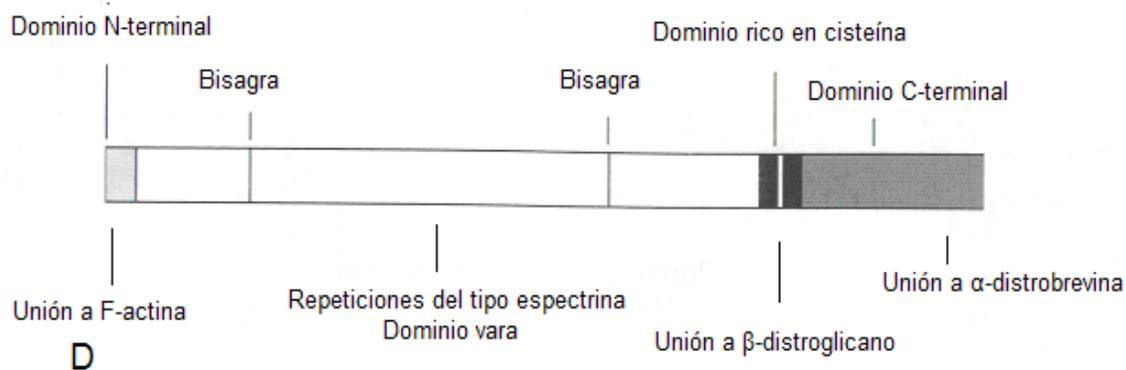
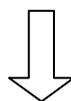


Fig. 5. A, Locus del gen *DMD* en el brazo corto del cromosoma X en la región Xp21. B, Gen *DMD* que codifica a la distrofina. C, RNA mensajero del gen *DMD*. D, la proteína distrofina en donde se muestran sus dominios y los sitios de unión con otras glicoproteínas.

2.3.1. Mutaciones en el gen *DMD*.

Aproximadamente en el 50-60% de los casos con DMD y el 85% con DMB, las principales mutaciones son eliminaciones parciales (38) de uno o más de los exones agrupados en dos regiones más frecuentemente afectadas llamadas *hot spots* o puntos calientes. El *Hot spot mayor* se ubica en la parte central del gen

abarcando los exones 43 al 60, y el *Hot spot menor* se ubica en la parte terminal 5' abarcando los exones 3 al 19 (fig. 6.), (8, 9, 18, 25, 38). Sin embargo, es importante considerar que no solo se presentan eliminaciones en el gen *DMD*, ya que existen reportes de otro tipo de alteraciones como duplicaciones (6%), mutaciones puntuales o inserciones (38). Estas mutaciones se han identificado en diversas poblaciones incluyendo la nuestra, en donde se analizaron 59 pacientes usando un análisis por PCR en los 2 *Hot spots*, se encontró que 31 pacientes (53%) tenían eliminaciones en uno o varios de los exones. La mayor parte de estas alteraciones (87%) se identificaron en el *Hot spot mayor*, dándose el porcentaje más alto reportado hasta ahora comparado con otras poblaciones de Europa, Norte América y Asia. Además, los puntos de ruptura de las eliminaciones fueron localizados principalmente en los intrones 44 (30%), 45 (30%) y 50 (37%) (8).

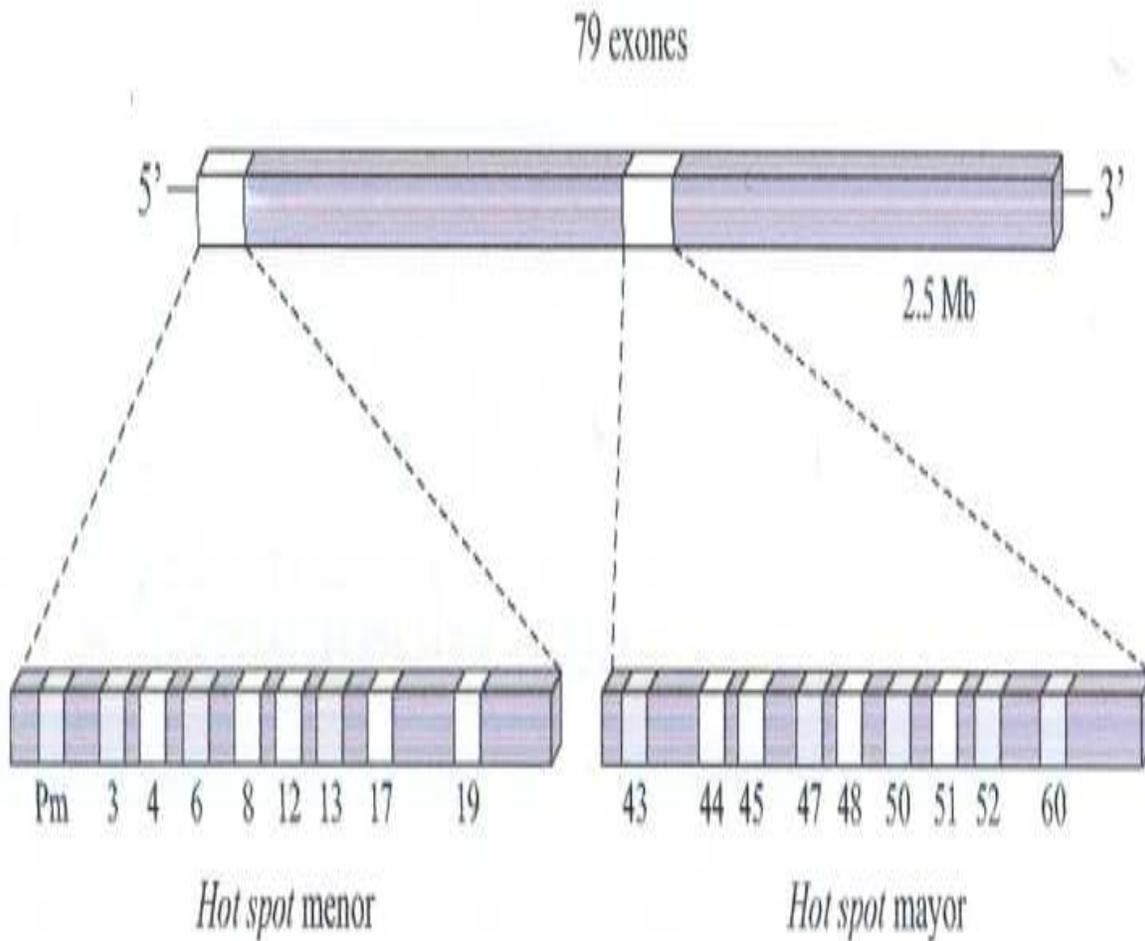


Fig. 6. El gen de la distrofina (18).

Las mutaciones en el gen DMD que generan la interrupción de la traducción de la distrofina dan lugar a la DMD, mientras que las mutaciones que conservan el marco de lectura producen cantidades reducidas de distrofina o una forma de distrofina semifuncional, resultando en el fenotipo DMB (32).

2.4. La proteína distrofina.

El gen *DMD* codifica para la proteína distrofina, y en el músculo se expresa la isoforma de 427 kDa formada por 3685 aminoácidos. Sin embargo, existen otras isoformas que se expresan en la corteza del cerebro, en el cerebelo, retina, el cerebro y riñón del feto, en células de Schwann y en células de la glia (14).

La distrofina contiene 4 dominios o segmentos principales: Un dominio amino terminal, un dominio central vara comprendido de extremos enrollados en triple hélice que comparten una alta homología con espectrinas y α -actinas, por lo tanto la distrofina pertenece a la superfamilia de las espectrinas. Un dominio rico en cisteína que se une a la proteína β -dístroglicano y un dominio carboxilo terminal unido a la proteína α -dístrobrevina (fig.7.), (10). La distrofina más pequeña se expresa en el cerebro y consta de 117 kb, y no tiene el dominio amino terminal, pero si posee un dominio carboxilo terminal (14).

Los dominios amino terminal y vara unen el sarcolema con el sarcoplasma proporcionando así una conexión lateral extendida entre distrofina y filamentos de F-actina en el sarcoplasma (12). Debido a las repeticiones triple helicoidales localizadas en su dominio vara, la distrofina es una proteína elástica y flexible lo que permite proteger a la célula muscular del estrés causado por la fuerza creada durante la contracción y extensión del músculo, así como también juega un papel estructural (10).

Los dominios carboxilo terminal y rico en cisteína de la distrofina están unidos al complejo de glicoproteínas asociadas a la distrofina (DGC) que consisten en

proteínas citoplasmáticas transmembranales y proteínas extracelulares que proporcionan un enlace mecánico fuerte y median interacciones entre el sarcoplasma y la matriz extracelular. La deficiencia de la distrofina resulta en una pérdida secundaria de algunos componentes del complejo proteico DGC y como consecuencia en una distrofia muscular (12).

2.5. Complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina (DGC).

En el músculo esquelético, la distrofina se encuentra asociada a un conjunto de glicoproteínas, formándose así el DGC. Este complejo consiste de tres subcomplejos, dependiendo de su asociación con otras proteínas o con su localización en la célula: ya sean extracelulares, transmembranales o sarcoplasmáticas (fig. 7.) (10, 12).

1. Subcomplejo distroglicano

Este subcomplejo está formado por las subunidades α y β -distroglicano, la subunidad α se encuentra conectada a la superficie extracelular por la subunidad β -distroglicano transmembranal, a su vez esta subunidad esta unida a α -distrobrevina. β -distroglicano ancla al complejo sarcoglicano en el DGC. La integridad del complejo distroglicano es vital para el funcionamiento de las fibras musculares. Esto se ha observado ya que la pérdida de este complejo en embriones de ratón resulta letal debido a la interrupción de la formación de su membrana embrionica (10, 12).

2. El subcomplejo sarcoglicano-sarcospan.

Este subcomplejo está formado por sarcospan y por las subunidades α , β , γ y δ -sarcoglicano, aunque ninguno de estos sarcoglicanos se une directamente a la distrofina, la ausencia de ésta usualmente desestabiliza al complejo sarcoglicano. Mutaciones en los genes que codifican para el α , β , γ y δ -sarcoglicano causan distrofia de cintura, también cuando hay un gen sarcoglicano mutado hay una reducción o pérdida completa de otro sarcoglicano. La función de este complejo

parece ser mecánica y de señalización. En la superficie celular, cada miembro del complejo sarcoglicano forma una unidad funcional por la asociación física con sarcospan, que tienen 4 dominios transmembranales (45).

3. Proteínas sarcoplasmáticas asociadas a distrofina: α 1, β 1-sintrofina, α -distrobrevina.

Las sintrofinas pueden funcionar como adaptadores para reclutar proteínas de señalización en el sarcolema y en el DGC, existiendo interacciones con los canales de sodio y la sintasa del ácido nítrico neural (nNOS). Se ha observado que ratones deficientes de α 1-sintrofina no muestran ningún fenotipo, sin embargo nNOS está ausente en el sarcolema, lo que indica la función adaptadora de la sintrofina (12). Otra proteína asociada a la distrofina es la α -distrobrevina, a su vez también se encuentra vinculada a las sintrofinas. Se ha observado que ratones nulos para la α -distrobrevina presentan un fenotipo ligado a la DMD. Sin embargo, debido a que conservan la estructura del DGC se mantiene la integridad del sarcolema, pero presentan una reducción de nNOS en el sarcolema causando una inestabilidad bioquímica entre la interacción de la distrofina y el complejo distroglicano (5).

Existen otras proteínas que no son consideradas dentro del complejo DGC. Sin embargo, interactúan con éste, entre ellas se encuentran la laminina, que está formada por cadenas unidas al α -distroglicano y forma parte de la matriz extracelular con el colágeno IV. Se ha observado que mutaciones en el gen de la laminina causan una severa distrofia congénita, a pesar de esto no parece causar daño al sarcolema (15). Otra proteína es la caveolína-3 que es transmembranal y se encuentra unida al β -distroglicano. Se ha reportado que las mutaciones en el gen de la caveolína-3 están relacionadas a la distrofia muscular de cintura autosómica dominante (10, 12).

El complejo DGC tiene un papel importante en el músculo esquelético, ya que proporciona una conexión física entre el sarcoplasma y la matriz extracelular

permitiendo la estabilización y la resistencia del sarcolema durante los ciclos repetidos de la contracción y relajación muscular (27). Sin embargo, también se ha sugerido que el DGC está involucrado en la señalización celular a través de interactuar con: a) la sintasa del ácido nítrico neural (nNOS), que interactúa vía sintrofinas con el DGC, y sintetiza el óxido nítrico (NO) que tiene efectos dilatadores induciendo a una relajación muscular, y es importante para el incremento del flujo sanguíneo local para igualar el incremento de la carga metabólica de los músculos contraídos durante el ejercicio (4); b) Grb2, la cual es una proteína adaptadora involucrada en la transducción de señales, esta interactúa con la subunidad β -dístroglicano y juega un papel importante como mediadora en la transducción en la matriz extracelular, en la organización del sarcoplasma y es esencial para la viabilidad celular (43) y c) el regulador de la proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} - calmodulina, el cual se ha encontrado unido al dominio C-terminal de la distrofina, a través de fosforilaciones regula a la distrofina por tanto controla la unión de la distrofina con el DGC (1).

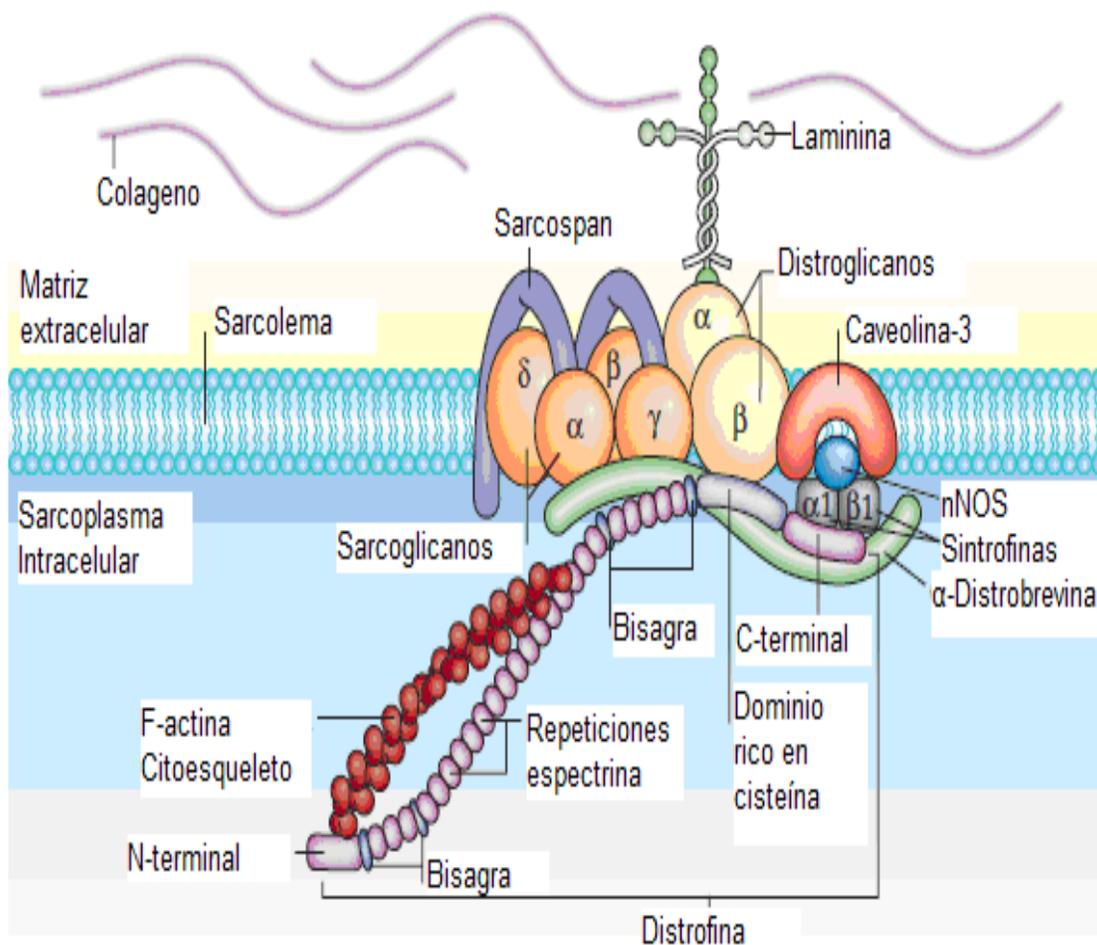


Fig. 7. Complejo de las glicoproteínas asociadas a la distrofina (10).

2.6. Insulina

La insulina es una hormona peptídica secretada por las células β de los islotes de Langerhans en el páncreas. Cuando hay un estímulo de glucosa, la secreción de la insulina es característicamente bifásica, en donde la primera fase representa la liberación de insulina ya sintetizada que se encuentra almacenada en las vesículas secretoras. En la segunda fase se secreta la insulina recién sintetizada junto con la almacenada (40).

El incremento en la concentración de glucosa induce la primera fase de la secreción de insulina. La concentración de glucosa es censada por las células β pancreáticas y entra a la célula por acción del transportador de glucosa GLUT-2.

Dentro de la célula, la enzima glucocinasa fosforila a la glucosa para formar glucosa-6-fosfato utilizando ATP. El cierre de los canales de K^+ dependientes de ATP resulta en una despolarización de la membrana y en la activación de los canales de Ca^{2+} , incrementándose las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, provocándose así las pulsaciones en la secreción de insulina la cual ejerce sus funciones en los tejidos blanco (40).

Los tejidos que dependen de la insulina para la captación de glucosa son el músculo, el tejido adiposo y el hígado. Es importante resaltar que en el músculo esquelético más del 80% de la captación de glucosa es estimulada por la insulina (3). Las células del músculo esquelético poseen en su membrana el receptor de la insulina que consiste en un heterodímero que posee dos subunidades α y dos subunidades β glicoprotéicas unidas por puentes de disulfuro. La unión de la insulina se da en la unidad α -extracelular, resultando en un cambio conformacional permitiendo que las subunidades β se autofosforilen confiriendo actividad de tirosina cinasa. Esto permite la fosforilación de sustratos proteicos intracelulares conocidos como sustratos de receptores de la insulina (IRS). Los IRS pueden estar unidos a otras moléculas de señalización que median las acciones celulares de la insulina, tales como Grb2, dominios 2 con homología Src, y también incluye enzimas como la fosfatidil-inositol-3-cinasa (PIP-3-cinasa). Esta enzima promueve la activación y translocación de la proteína transportadora de glucosa GLUT-4 (principal isoforma en el músculo) que a concentraciones basales de glucosa se encuentra en las vesículas de la membrana. Este proceso que representa el transporte de la glucosa es limitante para el metabolismo de este carbohidrato en el músculo esquelético (11, 33, 40).

2.6.1. Resistencia a la Insulina (RI).

La Resistencia a la Insulina (RI) se define como un descenso en la respuesta de los tejidos periféricos a la acción de la insulina (42). Se ha propuesto que la RI se manifiesta a nivel celular, en donde existen alteraciones río abajo de los

receptores involucrados en la señalización de la insulina. Los posibles mecanismos incluyen una baja regulación en estos receptores, mutaciones o polimorfismos genéticos en los genes que codifican para las proteínas que participan en la fosforilación del receptor de insulina, del sustrato del receptor de la insulina (IRS) o de PIP-3-kinasa, incluso se ha propuesto que pueden existir anomalías en la función del transportador GLUT-4 (35, 40).

Además, es importante considerar que algunos de los factores que también pueden conducir al desarrollo de RI incluyen: a) *La dieta*, ya que el consumo excesivo de energía o de grasas saturadas promueve el estímulo de secreción de insulina, la síntesis de triglicéridos y la acumulación de grasa lo cual altera la función de los receptores de insulina y la señalización post-receptor. b) *La leptina*, ya que participa en la regulación de la ingesta de alimentos, el peso corporal y el gasto energético. La disminución en las concentraciones plasmáticas de la leptina genera un incremento del IMC el cual está asociado al desarrollo de RI. c) *La inactividad física*, ya que se ha observado que el ejercicio incrementa la translocación del transportador GLUT-4 a la membrana del sarcolema, permitiendo así el transporte de la glucosa al interior de la célula. La alteración en la translocación (reducida) de GLUT-4 se ha observado en adipocitos de individuos con RI y con diabetes tipo 2. Esto es causado por daño en la señalización intracelular debido a una reducción en la expresión de la proteína IRS-1, alterando así la función de la PIP-3-kinasa estimulada por insulina. d) *La obesidad*, donde se encuentra aumentado el tejido adiposo visceral que es metabólicamente muy activo y por lo tanto, presenta un incremento en el flujo de los ácidos grasos libres promoviendo la RI a nivel celular. e) *La síntesis de adipocinas* en el tejido adiposo se encuentran aumentadas presentándose así una respuesta inflamatoria crónica caracterizada por la producción anormal de citocinas, generando una activación de las vías de señalización relacionadas con la respuesta inflamatoria. En tejidos donde se ha demostrado un incremento de las adipocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) se ha observado que causa la disminución gradual en la autofosforilación del receptor de insulina,

dando como consecuencia la alteración en la fosforilación del IRS-1, así como en la expresión del transportador de glucosa GLUT-4 (35, 40).

2.6.2. Obesidad

La OMS definió a la obesidad como el exceso de grasa corporal que ocasiona daños a la salud (28) que se caracteriza por un almacenamiento excesivo de grasa corporal o tejido adiposo en el organismo. El desarrollo de la obesidad se debe a defectos de algunos genes, el medio ambiente, el estilo de vida y a las interacciones de estos factores, dando como resultado un desbalance crónico entre el gasto y el consumo de energía donde la cantidad de energía ingerida excede el gasto de ésta, incluyendo la actividad física y la tasa metabólica en reposo. Como la obesidad se encuentra asociada al desarrollo de RI, se dice que la hiperinsulinemia acompaña a la obesidad como un marcador de la RI, debido a la disminución de la captación de glucosa (37, 40).

En México, en la Encuesta Nacional de Nutrición de 1999, la prevalencia de sobrepeso y obesidad juntos fue de 5.5% en niños menores de cinco años, de 18.6% para los escolares, y de 21.6% para los adolescentes. Las mismas prevalencias en la Encuesta de Salud y Nutrición del 2006, corresponden a 5.3, 26 y 29.6% respectivamente, mostrando una estabilización para niños preescolares, pero un incremento de casi nueve puntos porcentuales en los escolares y casi cinco en los adolescentes (28).

Por otro lado, en adultos, la Encuesta Nacional de Nutrición del 2006 demostró que la prevalencia de sobrepeso fue más alta en hombres (42.5%) que en mujeres (37.4%); en cambio, la prevalencia de obesidad fue mayor en mujeres (34.5%) que en hombres (24.2%). Al sumar las prevalencias de sobrepeso y de obesidad, 71.9% de las mujeres mayores de 20 años de edad y 66.7% de los hombres tienen prevalencias combinadas de sobrepeso u obesidad.

3. Antecedentes.

3.1 Efectos de la alteración del complejo DGC.

Las mutaciones en el gen *DMD* llevan a la pérdida completa de la distrofina o a la pérdida de sus dominios funcionales, generando un DGC inestable resultando en una membrana mecánicamente más débil que es fácilmente dañada durante la contracción muscular (36). Esto se debe a que la distrofina se encuentra unida a proteínas extracelulares que proporcionan un enlace mecánico fuerte y controlan interacciones entre el sarcoplasma y la matriz extracelular. (12). La alteración en el sarcolema podría modificar algunos mecanismos de señalización celular, tal y como se ha propuesto en algunos estudios.

3.1.1. Alteración de la distrofina

En un estudio realizado por Muvley, et al, (2005), en ratas Goto-Kakizaki con diabetes tipo 2, muestran que la expresión de la distrofina y de los distroglicanos α y β se encuentra disminuida en las fibras musculares de estas ratas, sugiriendo que podría existir una desestabilización del complejo DGC. Además, observaron que la disminución en la expresión a nivel proteína de estos distroglicanos genera un debilitamiento del sarcolema y una acumulación anormal de las vesículas del GLUT-4 en el sarcolema. En base a estos resultados proponen que la alteración del complejo DGC podría alterar la señalización de la insulina, lo que nos lleva a suponer que las alteraciones en el DGC, podrían generar RI en el músculo esquelético de los pacientes con DMD/DMB.

Sin embargo, esto es solo una propuesta ya que no existe a nuestro conocimiento, estudios que demuestre claramente si los pacientes con DMD/ DMB presentan RI. El único estudio en relación a esto fue realizado por Freidenberg G., y Olefsky J., en 1985. En este trabajo se hizo una prueba de tolerancia a la glucosa a 17 pacientes con DMD, y los resultados indican que las concentraciones

de insulina y glucosa en suero, expresadas como el incremento del área bajo sus respectivas curvas se incrementa en pacientes con DMD confinados a silla de ruedas en comparación con pacientes ambulatorios y sujetos sanos (16). También es importante mencionar, que en otro tipo de distrofias musculares como la distrofia miotónica se ha observado la presencia de hiperinsulinemia y RI (34).

Estos estudios apoyan nuestra propuesta de que los pacientes con DMD/DMB podrían presentar RI.

3.1.2. Daño en la permeabilidad de la membrana plasmática.

La alteración del complejo DGC, provoca un desequilibrio en la permeabilidad de la membrana plasmática, causando cambios en el fluido intracelular, provocando que las miofibras cursen por ciclos de deterioro y regeneración hasta que la capacidad de regeneración es agotada, por lo tanto las fibras musculares presentan una regeneración irreversible. Es probable que la afluencia de fluido extracelular rico en calcio dentro de las fibras musculares active proteasas intracelulares teniendo como consecuencia el daño a la homeostasis celular, induciendo a las fibras musculares a ser reemplazadas por tejido adiposo y tejido conectivo, y ser susceptibles a desarrollar necrosis (29, 36). Esto se ha observado en biopsias musculares de pacientes con DMD, donde los rasgos característicos de esta enfermedad incluyen la presencia de núcleos centrales, variación del tamaño de la fibra con presencia de miofibras más pequeñas, así como el desarrollo de tejido conectivo y tejido adiposo entre las fibras musculares (10).

3.2. Composición corporal en los pacientes con DMD.

Se ha planteado que el reemplazo del músculo esquelético por tejido adiposo incrementa la masa grasa en los pacientes con DMD o DMB. Diversos estudios donde se evaluó la composición corporal muestran que estos pacientes presentan mayor masa grasa y menor masa magra que sujetos sanos de la misma edad (29,

46). También muestran que el mayor contenido de masa grasa frecuentemente se encuentra distribuida como grasa subcutánea y grasa intramuscular en el músculo fibrótico (29).

Un estudio realizado por Willig T, y colaboradores, de 1993, reportan que los pacientes con DMD desarrollan sobrepeso u obesidad desde los 7 años, alcanzando una prevalencia de más del 50% alrededor de los 13 años (41). También, se ha observado que estos pacientes presentan obesidad central además de una mayor cantidad de masa grasa en regiones periféricas (30). Es importante resaltar que la distribución del tejido adiposo esta asociada a la RI, ya que se ha observado que individuos con distribución de grasa central muestran RI, y sujetos con una distribución de grasa periférica únicamente tienen valores más altos de glucosa e insulina comparados con sujetos no obesos. (37).

Por otro lado, se ha propuesto que la mayor prevalencia de la obesidad en los pacientes con DMD se puede deber a una disminución del gasto de energía en reposo, en conjunto con una disminución de la actividad física y a una sobrealimentación (46).

4. Planteamiento del problema.

La alteración del sarcolema de las fibras musculares y el daño en la señalización celular, aunado al sobrepeso u obesidad en los pacientes con distrofia muscular de Duchenne/Becker son factores de riesgo para el desarrollo de resistencia a la insulina.

Por lo tanto, nos surge la pregunta: ¿Los pacientes con distrofia muscular de Duchenne/Becker con diagnóstico molecular de la distrofia presentan resistencia a la insulina y un mayor grado de adiposidad de acuerdo a su edad?

5. Justificación.

La alteración del sarcolema de las fibras musculares de los pacientes con distrofia muscular de Duchenne/Becker, el sobrepeso y la obesidad son factores de riesgo para el desarrollo de resistencia a la insulina, la cual puede conducir a patologías más severas como la diabetes tipo 2. Sin embargo, a nuestro conocimiento no existe información que demuestre si los pacientes con distrofia muscular de Duchenne/Becker presentan resistencia a la insulina.

6. Objetivo General.

Determinar si los pacientes con distrofia muscular de Duchenne/Becker con diagnóstico molecular de la distrofia presentan resistencia a la insulina y evaluar su grado de adiposidad.

7. Objetivos particulares.

Identificar a los pacientes con distrofia muscular de Duchenne/Becker mediante el diagnóstico genético-molecular.

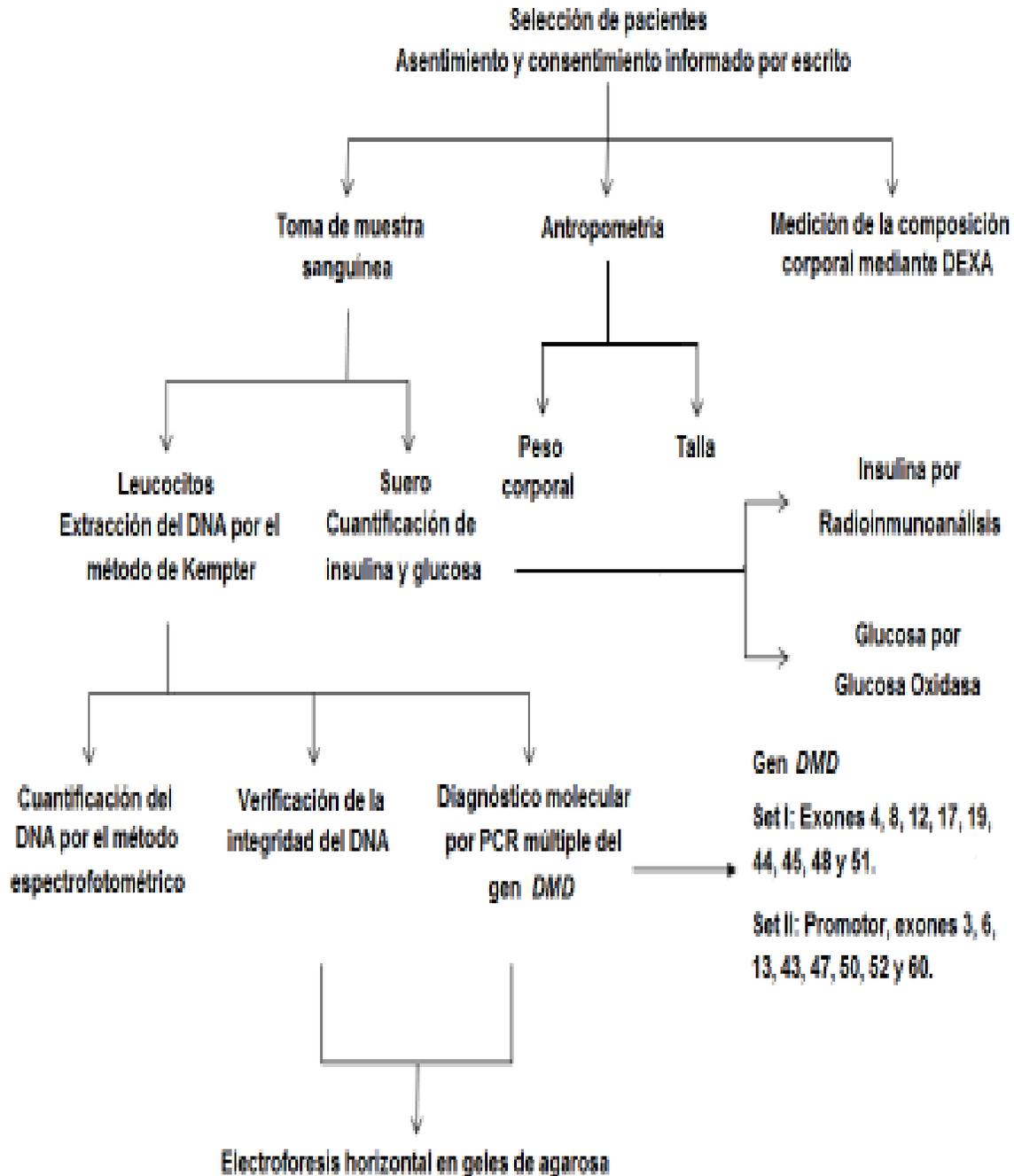
Determinar si los pacientes con distrofia muscular de Duchenne/Becker presentan resistencia a la insulina.

Evaluar el grado de adiposidad presente en los pacientes con distrofia muscular de Duchenne/Becker.

8. Diseño y métodos.

El estudio se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición del Hospital de Pediatría-CMN SXXI-IMSS.

8.1. Diagrama de flujo



8.2. Carta de consentimiento.



México, D.F. a ____ de _____ del 2009.

Por medio de la presente le invitamos a participar en el proyecto de investigación intitulado: **Identificación de obesidad y resistencia a la insulina en pacientes con distrofia muscular de Duchenne o Becker.**

El propósito de esta investigación es evaluar si su hijo que padece distrofia muscular de Duchenne o Becker, pueda además presentar otras alteraciones como sobrepeso, obesidad y/o resistencia a la insulina. Se me ha explicado que la participación consiste en permitir que a mi hijo se le mida el peso, la talla, la composición corporal y se le tome una muestra de sangre (10mL). Me han informado que esta muestra se utilizará además para determinar el diagnóstico molecular de la distrofia. En la medición de la composición corporal, el paciente se irradia con rayos X, la cantidad de radiación es extremadamente baja, menor aún que una décima parte de la radiación emitida durante una radiografía de tórax. Además, el procedimiento es indoloro y no invasivo, es decir el paciente no sufre durante el análisis. La toma de la muestra sanguínea implica un riesgo mínimo, y la participación en el estudio no le causará ningún costo. En caso de que acepte participar pero luego desee abandonar el estudio, dispone de plena libertad para retirar el consentimiento, sin que por esto se vea afectada la atención médica de su hijo. Los resultados serán confidenciales y se le entregarán al final del estudio. Los posibles beneficios que usted recibirá serán apoyo nutricional en el caso de detectar obesidad, que incluye recomendaciones en su régimen dietoterapéutico para corregirla, además de apoyo clínico y detección oportuna de alguna alteración en los parámetros estudiados.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, arriba mencionados.

Estoy de acuerdo en participar en el estudio: _____ **Si** _____ **No.**

Nombre y firma del paciente _____

Nombre y firma de la madre (tutora) _____

Nombre y firma del padre (tutor) _____

Testigo 1. _____

Testigo 2 _____

Nombre, matricula y firma del investigador responsable: Dra. Maricela Rodríguez Cruz 10949038 _____

Responsables: Dra. Maricela Rodríguez Cruz, Dr. Ramón Coral Vázquez, Teléfono: 56276900, Extensiones: 22483, 21941 y 22409.

8.3. *Tipo de diseño:*

1. Observacional, ya que no existe ninguna intervención sobre los pacientes a estudiar.
2. Prolectivo, se inicia con la observación y seguimiento, en dónde los datos se obtienen después del diseño del estudio.
3. Transversal, ya que implica la recolección de los datos en un solo corte en el tiempo.
4. Comparativo, se utilizan pruebas que comparen entre diferentes grupos.

8.4. *Sujetos.*

Pacientes con diagnóstico clínico de DMD/DMB, que acuden a la consulta del Hospital de Pediatría del CMN-SXXI y al Instituto Nacional de Rehabilitación.

8.4.1. *Criterios de selección.*

a) Inclusión:

- Pacientes diagnosticados clínicamente con DMD/DMB.
- Consentimiento del paciente y padres o tutores, firmando la carta de autorización para participar en el estudio.
- Pacientes con diagnóstico molecular positivo para la DMD/DMB.

b) Exclusión:

- Que padezcan diabetes tipo 1.
- Consumo de corticosteroides.

c) Eliminación:

- Que decidan abandonar el estudio.

8.5. Definición de Variables

a) Obesidad.

El índice de masa corporal (IMC) se determinó como el peso corporal en kg entre la estatura en m². Los pacientes se clasificaron en normal (IMC < de la percentila 85), sobrepeso (\geq a la percentila 85 pero < de la percentila 95) y obesidad (> a la percentila 95).

b) Masa grasa

Las unidades se reportan en % de masa grasa corporal total, la cual se considerará elevada de acuerdo a la edad si es mayor a los valores mostrados en la siguiente tabla:

Edad (varones)	% grasa corporal total
4 años	16
6 años	14
8 años	13
10 años	14
12 años	19
14 años	18
16 años	14
18 años	13
20 años	13
22 años	14

Committee on Nutrition, 1998.

c) Resistencia a la insulina.

Se determinó con las concentraciones de insulina y glucosa en ayuno mediante el método HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment-Insuline Resistance), utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{HOMA-IR} = ([\text{insulina en ayuno } \mu\text{U/mL}] * [\text{glucosa en ayuno mmol/L}]) / 22.5,$$
 donde se consideraron con RI aquellos niños que tienen un valor de HOMA mayor a 3.16 (23).

d) Hiperinsulinemia.

Se determinó con las concentraciones de insulina en ayuno, considerándose como hiperinsulinemia valores $> 12 \mu\text{U/mL}$ (31).

8.6. *Procedimientos.*

Los pacientes con diagnóstico clínico de DMD/DMB fueron enviados del Instituto Nacional de la Rehabilitación y del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI. A los padres o tutores y a los pacientes (cuando era el caso) se les invitó a participar en el estudio explicándoles las ventajas así como el riesgo mínimo que conlleva la toma de muestra de sangre. De esta manera, el día del estudio primeramente los padres o tutores de los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito y los pacientes su asentimiento para participar en el estudio.

El paciente acudió con un ayuno de 12 horas, después de que se firmó el consentimiento para participar en el estudio, a los pacientes se les tomaron 2 tubos de 5 ml de sangre periférica por punción venosa. Posteriormente, se les realizó un cuestionario para conocer algunas de sus características clínicas del paciente. Después se les midieron sus parámetros antropométricos como talla y

peso para determinar su IMC y evaluar la composición corporal mediante la absorciometría dual de rayos X (DEXA).

8.6.1. Técnicas de medición.

8.6.1.1. Características clínicas

A los pacientes se les aplicó un cuestionario en el cual se les preguntó la siguiente información: Edad al estudio, al inicio de los síntomas, al diagnóstico y a la que presentaron movilidad limitada a silla de ruedas si es que era el caso. Además, se les cuestionó acerca de los antecedentes familiares de la distrofia muscular de Duchenne, obesidad y diabetes tipo 2.

8.6.1.2. Diagnóstico molecular de la DMD.

a) Toma de muestra sanguínea.

Consistió en la toma de 2 tubos de sangre periférica, uno con anticoagulante (heparina) para realizar el diagnóstico molecular de la distrofia en el DNA genómico y otro tubo sin anticoagulante para la cuantificación de insulina y glucosa en suero.

b) Extracción del DNA.

Se realizó por el método de alta sal. La muestra de sangre se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos, de donde se obtuvieron dos fases. Se separó la interfase (leucocitos) y se le agregó un amortiguador de lisis de eritrocitos RBCL (TRIS 10 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 5 mM), con esta solución se realizaron dos lavados, dejando al final solo el botón de leucocitos. Este botón se resuspendió en ~100-200 µl de agua inyectable y se transfirió a un microtubo. Se centrifugó a 3500/5min, se decantó y el botón se resuspendió en 118 µL de NaCl 5 mM, se

agregó 61.3 μL de SDS 10% para lisar las células. Después de dejarlas reposar durante 5 minutos se adicionaron 410 μL de NaCl 6 M para precipitar proteínas y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se agitó con Vortex y se centrifugó a 13000 rpm/15 min. Se recuperó el sobrenadante al cual se le adicionó 1 mL de etanol absoluto para precipitar el DNA y se dejó reposar al menos por una hora a -70°C . Se retiró el etanol absoluto dejando el precipitado y se realizaron dos lavados posteriores con etanol al 75%. Finalmente se decantó el etanol al 75% dejando el botón, al cual se le agregaron $\sim 100\text{-}300$ μl de agua bidestilada para disolver el DNA (22).

c) Verificación de la integridad del DNA.

La integridad del DNA se evaluó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bajo las siguientes condiciones; 90 Volts durante 1 hora. La integridad de DNA nos indica que puede ser utilizado para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) necesaria para el diagnóstico molecular de la distrofia.

d) Cuantificación del DNA.

El DNA se cuantificó utilizando el método espectrofotométrico. Esto consiste en realizar diluciones con agua desionizada 1:25 de la muestra de DNA. La absorbancia de las diluciones se realizó en un espectrofotómetro *ependorf BioPhotometer*[®] (Hamburg, Alemania) a 260 y 280 nm.

Para calcular la concentración de DNA se utilizó la siguiente fórmula:

$$[\text{DNA}], (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = (A_{260}) (\text{dilución}^{-1}) (0.05 \mu\text{g}/\mu\text{L})$$

En donde una unidad de absorbancia a 260 nm es de aproximadamente de 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de DNA de doble cadena. La relación A_{260}/A_{280} indica la pureza, se

considera que las relaciones comprendidas entre 1.8 y 2.0 unidades de D. O. son las óptimas. (24).

e) PCR múltiple del gen *DMD*.

El DNA genómico extraído se amplificó utilizando una reacción de PCR múltiple con la utilización del kit para humano de la DMD/DMB de Maxim Biotech, Inc® (San Francisco CA, USA), específico para las regiones *Hot spots mayor y menor* del gen de la distrofina.

La reacción de PCR se realizó en un tubo eppendorf de 200 μ L de la siguiente manera: Se agregaron 25 μ L de amortiguador (contiene diferentes sales, potenciador, estabilizador y dNTPs), 5 μ L de oligonucleótidos del Set I (exones 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 48 y 51) o Set II (Promotor, exones 3, 6, 13, 43, 47, 50, 52 y 60), 0.5 μ L de Taq DNA polimerasa (5U/ μ L), 500 ng de DNA de las muestras y 5 μ L de DNA control incluido en el kit y agua estéril libre de DNAsas para ajustar un volumen total de 50 μ L.

Posteriormente, la reacción de PCR se realizó en un termociclador Biometra® con las siguientes condiciones: Primero se realizó una desnaturalización del DNA a 94°C por 3 minutos y posteriormente la amplificación se llevó a cabo durante 43 ciclos. En cada uno de ellos el DNA se desnaturalizó a 94°C por 30 segundos, y los primers se alinearon a 56°C por 30 segundos y la Taq polimerasa amplificó a 65°C por 3 minutos. Al finalizar estos ciclos, la temperatura llega a 70°C por 10 minutos para así finalizar la reacción de PCR y asegurarse de que cualquier DNA restante sea totalmente amplificado. Posteriormente los productos de PCR se congelaron a -20°C para su posterior análisis.

Los productos de las reacciones múltiples se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio utilizando un marcador de 100 pares de bases. La electroforesis se realizó a 90 volts durante 2

horas 30 minutos en buffer TBE. El gel se visualizó en un Multimage™ Light Cabinet de Alpha Innotech Corporation (California, USA). En el gel se puede observar la presencia o ausencia de las bandas amplificadas dependiendo del número de nucleótidos que posee cada exón.

8.6.1.3. Antropometría

El peso y la talla se midieron utilizando una báscula y un estadímetro clínico estándar (SECA®, Alemania). También se midió la circunferencia de cintura y cadera, y de ahí se obtuvo el índice cintura/cadera (ICC) dividiendo el valor de la cintura (cm) entre la cadera (cm), esto fue para determinar la forma de distribución de la grasa corporal. Estas mediciones fueron realizadas por personal estandarizado. Con el peso y la talla se calculó el IMC, y con el software Epi Info® (Versión 3.5.1) se determinó el percentile y el Z-score.

8.6.1.4. Composición corporal.

La adiposidad se determinó mediante DEXA que es considerada como una técnica comparable al método estándar de oro basado en el desplazamiento de aire para determinar la composición corporal. Este método proporciona grandes ventajas, entre las que destacan que es un procedimiento rápido, no invasivo, indoloro y confiable. Durante el procedimiento, el paciente se coloca acostado en la cama del equipo, el cual emite un haz fino e invisible de rayos X de baja radiación a través del cuerpo del paciente con dos corrientes de energía, uno de 40 y otro de 70-100 KeV, donde la absorción relativa de estas dos energías estiman principalmente los tejidos blandos y el hueso. La absorción relativa de estos dos rayos de energía en el cuerpo del paciente es medida y se obtiene como resultado la estimación de la masa grasa corporal (17). Las unidades se reportan en % o en kilogramos de masa grasa corporal total, así como de masa magra.

8.6.1.5. *Cuantificación de insulina y glucosa*

La insulina se cuantificó utilizando un estuche comercial de Millipore Corporation (Massachusetts, USA). Este método se basa en el radioinmunoanálisis, que consiste en que trazas del antígeno marcado (^{125}I -Insulina humana) se encuentran fijadas en el fondo de un tubo. Este antígeno se incubó con una dilución constante de anticuerpo anti-insulina humana en presencia de otro antígeno no marcado (insulina presente en la muestra). De manera que la concentración de los sitios de unión al anticuerpo son limitados, existiendo una competición entre la ^{125}I -Insulina marcada y la que se encuentra en la muestra. De esta forma se puede determinar la concentración de insulina en el suero.

La glucosa se cuantificó por el método de glucosa oxidasa (Spinreact, México), donde la enzima Glucosa Oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD). La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra del suero.

8.7. *Análisis estadístico.*

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Minitab (Minitab 14 State Collage, PA). Los resultados se presentan como medianas y rangos, estratificados en dos grupos (con y sin RI, con y sin hiperinsulinemia) y en tres grupos (desnutridos, normales y sobrepeso/obesos), para las comparaciones entre los grupos se utilizó U de Mann Whitney indicando diferencias significativas entre grupos con $P < 0.05$. Finalmente, se realizó un modelo de regresión lineal y de regresión logística para identificar a los predictores de desarrollar resistencia a la insulina y la probabilidad de presentar concentraciones de insulina en ayuno $> 12 \mu\text{U/mL}$.

9. Resultados.

Se aplicó el cuestionario a 82 pacientes con diagnóstico clínico de la DMD/DMB para conocer sus características clínicas. Después de realizar el diagnóstico genético molecular en estos pacientes, solo 54 de ellos presentaron al menos una eliminación en el gen *DMD*. En la tabla 1 se muestran las características clínicas de los pacientes a los cuales se les confirmó la DMD/DMB a nivel genético molecular.

Tabla 1. Características clínicas y antecedentes heredo familiares de los pacientes con diagnóstico de la DMD/DMB. (n = 54)

Edad al estudio	10.3 años \pm 4.6
Edad de inicio de síntomas	5.1 años \pm 2.1 (n = 50) Desde el nacimiento (n = 4)
Edad al diagnóstico	5.9 años \pm 3.0
Edad de inicio en silla de ruedas	9 años \pm 2.3 (n = 12)
Talla	1.3 m \pm 0.2
Peso	32.3 kg \pm 15.7
IMC	18.7 \pm 6.1
% Grasa Corporal	32.6 \pm 15.7

Antecedentes Heredo Familiares	DMD/DMB (casos)	Diabetes tipo 2 (casos)
Hermanos	3	-
Padres	-	1
Tíos maternos	6	10
Abuelos	-	23

Los valores son promedios \pm DS.

En la mayoría de los casos, los síntomas se presentaron desde la infancia temprana, inclusive algunos pacientes manifestaron los primeros síntomas de la enfermedad desde el nacimiento. De los pacientes estudiados, doce de ellos se encuentran limitados a silla de ruedas desde los 9 años. Comparando el porcentaje de grasa corporal contra la edad de los pacientes, se observa que hay un incremento notable en este porcentaje. También cabe destacar que en el caso de los antecedentes heredo familiares, 9 de los pacientes tienen al menos un familiar afectado por este tipo de distrofia y 34 tienen antecedentes familiares de diabetes tipo 2.

El análisis del gen *DMD* en los pacientes con diagnóstico clínico de la distrofia, mostró que las mutaciones identificadas corresponden a eliminaciones en diferentes regiones de este gen.

Se observó que de los 82 pacientes que participaron en esta investigación, 54 (65.85 %) de ellos presentaron al menos una eliminación en el gen *DMD* y 28 (34.15 %) no mostraron ningún tipo de alteración en las regiones analizadas.

Con la finalidad de determinar qué exones fueron los más frecuentemente alterados en el gen *DMD*, se procedió a determinar la frecuencia de cada región eliminada. En la figura 8 se muestra el porcentaje de los exones eliminados en los 54 pacientes con DMD/DMB. El total de eliminaciones fue de 127; donde la frecuencia de las eliminaciones fue la siguiente: el promotor y los exones 3, 4, 6, tuvieron un frecuencia de 0.79%, exón 8 = 2.36%, exón 12 = 3.15%, exón 13 = 3.15%, exón 17 = 3.94%, exón 19 = 5.51%, exón 43 = 4.72%, exón 44 = 5.51%, exón 45 = 22.05%, exón 47 = 7.87%, exón 48 = 18.90%, exón 50 = 7.09%, exón 51 = 11.02%, exón 52 = 0.79% y el exón 60 = 0.69%.

Es importante resaltar que las mutaciones identificadas en el gen *DMD* corresponden a las regiones *Hot spot mayor y menor*, tal y como se observa en la figura 8. En esta figura se muestra el gen de la distrofina con la ubicación de los

exones eliminados. Cuarenta y cuatro pacientes (81.48%) presentan eliminación solo en el *Hot spot mayor*, 4 pacientes (7.41%) la presentan solo en el *Hot spot menor* y 6 (11.11%) presentan eliminación en ambas regiones. Es importante observar que los exones 45, 48, 51, 47 y 50 ordenados de mayor a menor frecuencia, son los principalmente eliminados en el gen DMD de estos pacientes y se localizan en el *Hot spot mayor*.

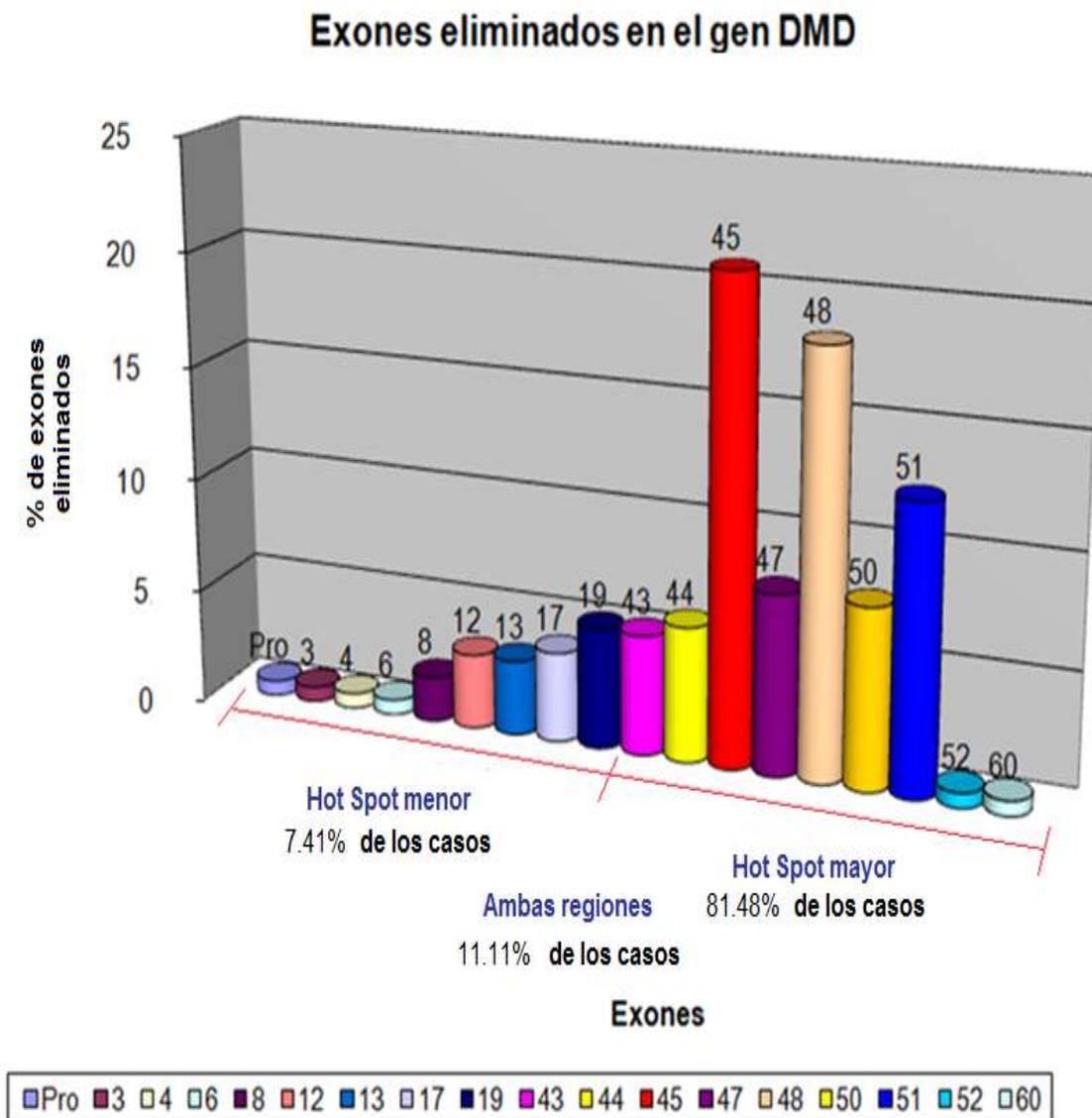


Fig. 8. Ubicación de las eliminaciones (hot spots) en el gen de la distrofina.

Una vez identificados a los pacientes que presentaron alguna eliminación en el gen *DMD*, se procedió a hacer una clasificación de los mismos de acuerdo a su estado nutricional, tal y como se muestra en la tabla 2. En los resultados se observa que hay diferencia en la concentración de los siguientes parámetros; insulina en ayuno, valores de Homeostasis Model Assessment-Insuline Resistance (HOMA), porcentaje de grasa corporal, índice de masa corporal (IMC), circunferencia de cintura y cadera, índice cintura/cadera (ICC), percentila y Z-score entre los grupos con diferente estado nutricional. Para identificar los grupos que eran diferentes se realizó la comparación entre ellos con la prueba de U-Mann-Whitney para la concentración de insulina, HOMA, porcentaje de grasa corporal, IMC, circunferencia de cintura y cadera, ICC, percentila y Z-score. Los resultados indican que el grupo con sobrepeso/obeso (so/ob) tiene valores mayores de insulina en ayuno en comparación con el grupo normal y el desnutrido ($P = 0.004$ y 0.031 respectivamente). Sin embargo, a pesar de que los valores de HOMA del grupo so/ob fueron mayores que los del grupo normal ($P = 0.012$), solo se observó una tendencia a tener valores mayores ($P = 0.086$) que el grupo desnutrido. Con respecto al % de grasa corporal, el grupo so/ob tiene valores mayores ($P < 0.005$) comparándolo con ambos grupos normal y desnutrido; como era de esperarse el grupo normal tiene mayor % grasa corporal ($P = 0.048$) que el desnutrido. El IMC, el percentil y el Z-score fueron diferentes entre los tres grupos. El valor de estos tres parámetros fue mayor en el grupo so/ob ($P < 0.005$) que en los dos grupos restantes. A su vez, el grupo normal fue mayor que el grupo desnutrido ($P < 0.005$) para los mismos parámetros. Respecto a la circunferencia de cintura, cadera y al ICC, ésta fue mayor en el grupo so/ob en comparación con el grupo normal y el desnutrido ($P < 0.005$); a su vez el grupo normal tiene mayor circunferencia de cintura, cadera y de ICC que el grupo desnutrido ($P = 0.022$).

Tabla 2. Estado nutricional de los pacientes con diagnóstico genético molecular de la DMD clasificados como normales, desnutridos o con sobrepeso/obesidad (so/ob).

	Normales, n = 26	Desnutridos, n = 12	So/Ob, n = 16	P[†]
Insulina (µU/mL)	10.1 (5.9, 31.6) ^a	10.7 (5.2, 56.6) ^b	16.0 (9.4, 59.9) ^{A,B}	0.011
Glucosa (mg/dL)	90.0 (72.0, 104.9)	90.1 (78.3, 104.3)	87.4 (63.7, 134.5)	0.939
HOMA	2.27 (1.04, 6.88) ^a	2.38 (1.04, 12.34)	4.06 (1.82, 12.91) ^A	0.038
% Grasa corporal	26.8 (10.8, 57.0) ^{a,c}	17.3 (7.6, 39.5) ^{b,C}	45.6 (27.6, 61.1) ^{A,B}	0.000
IMC	16.1 (14.4, 22.5) ^{a,c}	13.3 (10.4, 19.1) ^{b,C}	22.1 (18.5, 33.1) ^{A,B}	0.000
Número de exones eliminados	1 (1, 9)	1.5 (1, 6)	2 (1, 12)	0.887
Cintura (cm)	59.5 (51.3, 92.3) ^{a,c}	53.9 (44.0, 84.8) ^{b,C}	75.5 (67.3, 112.0) ^{A,B}	0.000
Cadera (cm)	63.7 (53.3, 91.0) ^a	60.7 (45.3, 90.9) ^b	78.0 (66.3, 105.5) ^{A,B}	0.001
ICC	0.94 (0.81, 1.06) ^{a,c}	0.91 (0.70, 0.99) ^{b,C}	0.99 (0.93, 1.07) ^{A,B}	0.000
Edad (años)	8.5 (5, 16)	10 (5, 25)	11 (6, 26)	0.150
Percentila	59.8 (14.1, 81.4) ^{a,c}	0.5 (0.0, 8.7) ^{b,C}	94.3 (86.3, 99.7) ^{A,B}	0.000
Z-score	0.25 (-1.07, 0.89) ^{a,c}	-2.59 (-12.00, - 1.36) ^{b,C}	1.58 (1.10, 2.80) ^{A,B}	0.000

Mediana (mínimo, máximo)

[†] Comparación entre grupos con prueba de Kruskal-Wallis. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre grupos $P < 0.05$, con prueba de U-Mann-Whitney.

^{A,a} Diferencia significativa entre el grupo so/ob y normal.

^{B,b} Diferencia significativa entre el grupo so/ob y desnutrido.

^{C,c} Diferencia significativa entre el grupo desnutrido y normal.

Homeostasis Model Assessment-Insuline Resistance (HOMA).

Índice de masa corporal (IMC).

Índice cintura/cadera (ICC).

Además, con el objetivo de observar si el valor de HOMA influye en las concentraciones de insulina en ayuno y en los parámetros antropométricos en los pacientes con DMD, se procedió a clasificar con y sin RI a estos pacientes que presentaron algún tipo de eliminación en el gen *DMD*. En la tabla 3 se observa que el grupo con RI ($HOMA > 3.16$) muestra mayores concentraciones séricas de insulina en ayuno, porcentaje de grasa corporal, IMC, circunferencia de cintura y cadera y mayor edad. El resto de las variables (glucosa, número de exones

eliminados, ICC, percentila y Z-score) no fueron diferentes entre los pacientes con y sin RI.

Tabla 3. Parámetros bioquímicos y antropométricos de los pacientes con diagnóstico genético molecular de DMD que presentan resistencia a la insulina con punto de corte de HOMA > 3.16

	HOMA > 3.16	HOMA < 3.16	P[†]
	n = 20	n = 34	
Insulina (μU/mL)	23.9 (12.4, 59.9)	9.9 (5.2, 14.0)	0.000
Glucosa (mg/dL)	90.5 (75.6, 134.5)	89.4 (63.7, 104.9)	0.223
% Grasa corporal	41.6 (12.2, 61.1)	21.7 (7.6, 57.9)	0.004
IMC	20.0 (13.2, 29.9)	16.0 (10.4, 33.1)	0.002
No. exones eliminados	1 (1, 12)	1.5 (1, 9)	0.300
Cintura (cm)	75.2 (49.0, 112.0)	57.0 (44.0, 102.3)	0.000
Cadera (cm)	77.0 (53.0, 105.0)	61.8 (45.3, 105.5)	0.000
ICC	0.97 (0.81, 1.07)	0.94 (0.70, 1.02)	0.095
Edad (años)	11 (6, 26)	8.5 (5, 24)	0.021
Percentile	82.5 (0.2, 99.8)	47.9 (0.0, 98.2)	0.060
Z-score	0.95 (-2.90, 2.80)	-0.05 (-12.00, 2.09)	0.059

Mediana (mínimo, máximo)

[†] Comparación entre grupos con prueba de U-Mann-Whitney con prueba de hipótesis bilateral.

Homeostasis Model Assessment-Insuline Resistance (HOMA).

Índice de masa corporal (IMC).

Índice cintura/cadera (ICC).

Asimismo, también se evaluó si la hiperinsulinemia influye sobre el HOMA y los parámetros antropométricos. En la tabla 4 se observa al grupo de pacientes con hiperinsulinemia (concentración de insulina en ayuno > 12 μU/mL) que muestra mayores valores de índice de HOMA, porcentaje de grasa corporal, IMC, circunferencia de cintura, cadera, edad, percentila y Z-score. El resto de las variables (glucosa, número de exones y el ICC) no fueron diferentes.

Tabla 4. Parámetros bioquímicos y antropométricos de los pacientes con diagnóstico genético molecular de la DMD que presentan hiperinsulinemia con punto de corte de Insulina > 12.00 µU/mL

	Insulina > 12 n = 26	Insulina < 12 n = 28	P[†]
Glucosa (mg/dL)	90.5 (63.7, 134.5)	89.4 (70.4, 104.9)	0.368
HOMA	4.47 (1.96, 12.91)	2.14 (1.04, 2.71)	0.000
% Grasa corporal	41.6 (12.2, 61.1)	21.0 (7.6, 57.9)	0.000
IMC	19.6 (13.1, 29.9)	15.9 (10.4, 33.1)	0.001
No. exones eliminados	1 (1, 12)	1.5 (1, 9)	4.444
Cintura (cm)	74.6 (49.0, 112.0)	55.4 (44.0, 102.3)	0.001
Cadera (cm)	75.7 (53.0, 105.0)	61.0 (45.3, 105.5)	0.001
ICC	0.96 (0.81, 1.07)	0.94 (0.70, 1.02)	0.130
Edad (años)	11 (6, 26)	8 (5, 24)	0.007
Percentile	76.0 (0.2, 99.7)	42.6 (0.0, 98.2)	0.038
Z-score	0.70 (-2.90, 2.80)	-0.19 (-12.00, 2.09)	0.037

Mediana (mínimo, máximo)

[†] Comparación entre grupos con prueba de U-Mann-Whitney con prueba de hipótesis bilateral.

Homeostasis Model Assessment-Insuline Resistance (HOMA).

Índice de masa corporal (IMC).

Índice cintura/cadera (ICC).

Con la finalidad de determinar la frecuencia de las regiones alteradas en los pacientes que presentaron RI determinada por HOMA (n = 20), se calculó el porcentaje de los exones eliminados. En la figura 9 se observa que el total de las eliminaciones fue de 42, donde la frecuencia de estas es la siguiente: promotor = 2.4%, exón 3 = 2.4%, exón 8 = 2.4%, exón 12 = 2.4%, exón 13 = 2.4%, exón 17 = 2.4%, exón 19 = 2.4%, exón 43 = 2.4%, exón 44 = 2.4%, exón 45 = 23.8%, exón 47 = 14.3%, exón 48 = 19.0%, exón 50 = 9.5%, exón 51 = 9.5% y el exón 60 = 2.4%.

Exones eliminados en el gen DMD en los pacientes
que tienen resistencia a la insulina

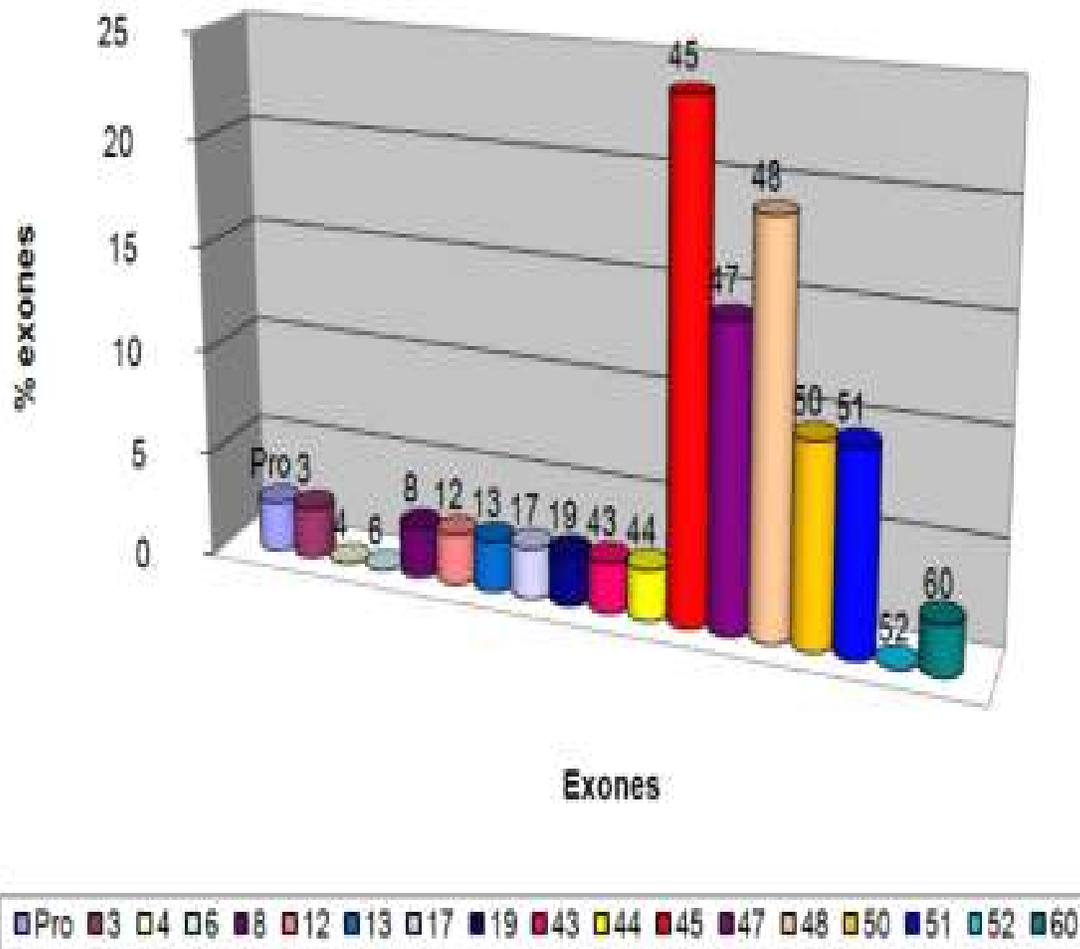


Fig. 9. Frecuencia de los exones eliminados en el gen DMD de los pacientes con distrofia muscular de Duchenne que además presentan resistencia a la insulina determinada por HOMA (n = 20).

Una vez identificada la frecuencia de las regiones eliminadas del gen *DMD*, se procedió a identificar si alguna de ellas es predictora para desarrollar RI. Los resultados del análisis de regresión mostrados en la tabla 5, indican que la eliminación del exon 47 del gen *DMD* y el porcentaje de grasa corporal fueron los mejores predictores de tener resistencia a la insulina determinado por HOMA en

los pacientes con distrofia muscular de Duchenne/Becker. Al utilizar este modelo usando las concentraciones de insulina, se observó el mismo comportamiento, aunque hay una tendencia ($P = 0.057$) a tener mayor concentración de insulina sérica cuando se elimina el exón 47. Cuando se realizó este modelo por HOMA sin ajustar por la edad, la significancia fue $P = 0.004$ con un R^2 de 38.0, en donde $P = 0.015$ si el exón 47 se encuentra eliminado y $P = 0.02$ cuando se trata del porcentaje de grasa corporal. De la misma manera usando el modelo para insulina en ayuno y sin ajustar por la edad se obtuvo lo siguiente: significancia del modelo $P = 0.003$ con una R^2 de 38.4. En donde $P = 0.022$ si el exón 47 se encuentra eliminado y $P = 0.002$ cuando se trata del porcentaje de grasa corporal. Esto confirma que el exón 47 y el porcentaje de grasa corporal son predictores de desarrollar resistencia a la insulina.

Tabla 5. Análisis de regresión lineal para HOMA y concentración de Insulina en pacientes que presentan eliminación en el gen DMD.

	HOMA			Insulina		
	Coef	SE	P (0.007)	Coef	SE	P (0.004)
Constant	1.815	1.114	0.110	5.986	4.794	0.218
E-45	-0.912	0.763	0.238	-2.480	3.283	0.454
E-48	-0.448	0.753	0.555	-2.517	3.241	0.442
E-51	0.151	0.755	0.842	1.193	3.251	0.715
E-47	2.471	1.092	0.029	9.166	4.698	0.057
E-50	-0.952	0.952	0.323	-3.923	4.099	0.344
E-44	-0.979	1.084	0.372	-4.682	4.666	0.321
E-19	-0.698	1.029	0.501	-3.223	4.428	0.470
% grasa corporal	0.065	0.024	0.011	0.260	0.105	0.018
Edad	0.028	0.084	0.741	0.361	0.363	0.325
R²			38.1			39.7

Coef: Coeficiente beta. SE: Error estándar R²: Coeficiente de determinación

El análisis de regresión logística binaria indicado en la tabla 6, muestra que la probabilidad de presentar concentraciones de insulina en ayuno > 12 $\mu\text{U/mL}$ debido a la pérdida del exón 47 es de 6.4 veces mayor que en los pacientes que no tienen eliminado este exón (IC = 0.94, 43.27, P = 0.057). Los datos fueron ajustados por el porcentaje de grasa corporal y la edad.

Tabla 6. Análisis de regresión logística binaria asociando los valores de insulina en ayuno (> 12 $\mu\text{U/mL}$) contra la eliminación del exón 47, % grasa corporal y la edad.

	Ratio	95% CI	P	R²
E-47	6.387	0.94, 43.28	0.057	
% grasa corporal	1.088	1.03, 1.15	0.003	
Edad	0.991	0.82, 1.20	0.92	
				39.7

Ratio: exp. beta. CI: intervalo de confianza. R²: coeficiente de determinación

10. Discusión.

El objetivo de esta investigación fue determinar si los pacientes con diagnóstico molecular de la distrofia muscular de Duchenne/Becker presentan resistencia a la insulina, además de describir su grado de adiposidad. Primeramente se seleccionaron pacientes con diagnóstico clínico de la distrofia muscular de Duchenne/Becker, para confirmar mediante pruebas moleculares el padecimiento.

A los pacientes, se les determinaron algunas características clínicas y antecedentes heredo familiares para este tipo de distrofias y diabetes tipo 2 (tabla 1). Los síntomas en estos pacientes aparecen desde la infancia temprana, inclusive desde el nacimiento, también se observó que algunos de ellos se encuentran limitados a silla de ruedas desde los nueve años. Otro síntoma patognomónico de la distrofia muscular de Duchenne es la presencia del signo de Gowers el cual se caracteriza porque los pacientes se incorporan apoyándose sobre su propio cuerpo. Además, también se observa que estos pacientes tienen dificultad de movimiento de sus miembros inferiores y superiores, dolor muscular preferentemente en los músculos gastronemios, así como debilidad muscular progresiva. Estas características propias del desarrollo de la enfermedad se han descrito previamente por diferentes autores (13, 14).

También los pacientes presentaron antecedentes heredo familiares de diabetes tipo 2 lo cual aumenta aún más el riesgo en ellos de desarrollar esta enfermedad crónica degenerativa. De manera que es indispensable realizar un escrutinio de los antecedentes familiares en este padecimiento con la finalidad de identificar el riesgo de desarrollar otro tipo de padecimientos que comprometan aún más la calidad de vida de los pacientes con distrofia muscular de Duchenne.

Por otro lado, también identificamos antecedentes heredofamiliares de la distrofia, este hallazgo es fundamental ya que permite detectar si existe la

posibilidad de que se presente la distrofia en otro miembro de la misma familia. La identificación de antecedentes de la distrofia permite sugerir el estudio de portadoras en la familia del propósito. Esto es importante para la prevención y el consejo genético, ya que conociendo el riesgo de tener hijos afectados es posible que el médico proporcione un asesoramiento genético adecuado para disminuir la recurrencia de la distrofia muscular de Duchenne.

Por otro lado, es importante resaltar que los pacientes con distrofia muscular de Duchenne de nuestro estudio presentaron un mayor porcentaje de masa grasa, índice de masa corporal, circunferencia de cintura y cadera de acuerdo a su edad. Estos hallazgos son apoyados por diversos estudios en los que se ha reportado que los individuos que padecen de esta distrofia tienen un mayor porcentaje de masa grasa y una menor masa magra comparado con niños de su edad. Esto da como resultado el desarrollo de sobrepeso u obesidad central, además de una mayor cantidad de masa grasa en regiones periféricas (29, 30, 41, 46). Como es sabido, el mayor porcentaje de masa grasa esta asociado al desarrollo de otros padecimientos como resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, hipertensión, alteraciones cardíacas, cáncer, hiperinsulinemia entre otros (44).

Es importante resaltar que se ha propuesto que el aumento en la masa grasa en los pacientes con distrofia muscular de Duchenne se debe a la fisiopatología propia de la distrofia. Sin embargo, se requieren más estudios para probar esta hipótesis. Esto se ha propuesto debido a que en estos pacientes podría existir un aumento en la velocidad de reemplazo del músculo por el tejido graso, ya que estos pacientes presentan alteraciones en el complejo de glicoproteínas asociadas a la distrofina lo que provoca un desequilibrio en la permeabilidad de la membrana plasmática causando cambios en la afluencia de fluido extracelular rico en calcio activando proteasas intracelulares. La activación de estas proteasas daña la homeostasis celular, induciendo que las fibras musculares sean reemplazadas por tejido adiposo y tejido conectivo, provocando que las miofibras

cursen por ciclos de deterioro y regeneración hasta que la capacidad de regeneración se termina (10, 36).

Aunque es sabido que la hiperinsulinemia y el desarrollo de la resistencia a la insulina están asociados a un mayor porcentaje de masa grasa (29, 46), es importante recordar que también podrían existir otros factores que incluyan alguna alteración en el mecanismo de la señalización de esta hormona (33, 35). Se ha propuesto que la resistencia a la insulina se manifiesta a nivel celular en donde existen alteraciones río abajo de los receptores involucrados en la señalización de la insulina. Los posibles mecanismos incluyen una baja regulación en estos receptores, mutaciones o polimorfismos genéticos en los genes que codifican para las proteínas que participan en la fosforilación del receptor de la insulina, del sustrato del receptor de la insulina (IRS) o de la PIP-3-cinasa, o incluso se ha propuesto que pueden existir anormalidades en la función del transportador GLUT-4 (35, 40).

Interesantemente nuestros resultados demuestran por primera vez que de la población analizada, el 37% de los pacientes con distrofia muscular de Duchenne/Becker presentan resistencia a la insulina y el 48.1% presentó hiperinsulinemia. Hasta este estudio no existen reportes que demuestren que los pacientes con distrofia muscular de Duchenne presenten resistencia a la insulina, ni mucho menos existe información acerca de los mecanismos moleculares que podría conducir a la resistencia a la insulina en estos pacientes. Sin embargo, diversos estudios han propuesto que la inestabilidad del complejo de glicoproteínas asociadas a la distrofina podría alterar la señalización de la insulina ya que las alteraciones en este complejo conllevan a la inestabilidad de otros subcomplejos como se observó en el tejido adiposo de ratones nulos para β -sarcoglicano que son intolerantes a la glucosa y presentan RI (19). Además, también se ha propuesto que en ratones con diabetes tipo 2, se ha observado una disminución en la expresión de la proteína distrofina, de los distroglicanos α y β , y una acumulación anormal de las vesículas del GLUT-4 en el sarcolema (33).

Todos estos hallazgos juntos conllevan a proponer que la resistencia a la insulina observada en los pacientes con distrofia muscular de Duchenne podría deberse en parte al desarrollo propio de la distrofia y no solo a la presencia del aumento en la masa grasa.

Además, es importante resaltar que a mayor edad, la gravedad de la distrofia muscular de Duchenne también es mayor y nosotros observamos una mayor resistencia a la insulina e hiperinsulinemia en los pacientes de mayor edad. Considerando lo anterior esto podría deberse en parte al progreso propio de la enfermedad donde las fibras musculares se encuentran más dañadas y por lo tanto se presenta de manera más grave la resistencia a la insulina.

Respecto a la hiperinsulinemia, nuestro estudio es apoyado por resultados previos reportados por Freidenberg G., y Olefsky J., en 1985. Los autores observaron un aumento en la concentración de insulina en ayuno en el suero de pacientes con distrofia muscular de Duchenne confinados a silla de ruedas.

Como se mencionó anteriormente, es necesario confirmar mediante estudios moleculares si los pacientes con datos clínicos de la distrofia muscular de Duchenne presentan mutaciones en el gen *DMD* lo que confirma esta distrofia. Interesantemente, observamos que el 65.8% de los pacientes presentan al menos una eliminación en el gen *DMD*, aunque esto no indica que el resto de los pacientes no tienen la distrofia. Esto puede explicarse ya que faltan regiones, que no fueron analizadas, debido a que son menos frecuentes a presentar alguna mutación. Nuestro estudio incluyó el promotor y 17 de los 79 exones que conforman el gen *DMD*. (25). Por lo tanto, los pacientes que no presentaron alguna alteración en el gen *DMD*, y que muestran datos clínicos de esta distrofia pueden presentar alguna mutación poco frecuente en el gen *DMD* y que no fue analizada en este estudio. Además, debido a que existen otro tipo de distrofias con alteración muscular similar, clínicamente resulta complejo diferenciarlas entre sí.

Actualmente los estudios moleculares consisten en el análisis de las dos regiones que son más frecuentemente reportadas que presentan mutaciones en el gen *DMD*; *Hot Spot mayor y menor*. (8, 9, 25, 38). Generalmente el análisis de estas regiones consiste en amplificar mediante PCR y detectar principalmente si se observa una eliminación. En la actualidad existen estuches comerciales que incluyen únicamente el análisis de las regiones del gen *DMD* antes mencionadas, esto se debe a que es incosteable analizar todo el gen por su gran tamaño. Además, aproximadamente en el 50-60% de los casos con DMD y el 85% con DMB, las principales mutaciones son eliminaciones parciales (38), tal y como se observó en nuestro estudio.

Con respecto a la frecuencia de los exones eliminados en el *Hot spot mayor* del gen *DMD* (fig. 8), se observó que los exones 45, 48, 51, 47 y 50 son, en ese orden los más alterados. Previamente se ha reportado que estos exones son los que se eliminan con mayor frecuencia tanto en nuestra población como en la de otras poblaciones (8, 18). Dentro del *Hot spot mayor* también se observaron otros exones eliminados con menor frecuencia como el 52 y el 60 tal y como ya ha sido reportado (18). Respecto al *Hot spot menor* los exones 19, 17, 12 y 13 son los que se eliminaron con mayor frecuencia al igual que en otras poblaciones (18).

Después de seleccionar únicamente a los pacientes con distrofia muscular de Duchenne que presentaron la resistencia a la insulina se determinó en ellos la frecuencia de los exones eliminados. Se observó que los tres exones más frecuentemente alterados fueron en el siguiente orden: el exón 45, 48 y 47. Después de observar este cambio de frecuencia en los exones eliminados, se determinó si la falta de alguno de ellos predispone al desarrollo de la resistencia a la insulina ajustando por porcentaje de masa grasa y edad. El análisis mostró que el exón 47 es un predictor del desarrollo de la resistencia a la insulina en los pacientes con distrofia muscular de Duchenne, esto no fue observado con ninguno de los otros exones eliminados en el gen *DMD*. Además, como ya es sabido en otras poblaciones el porcentaje de grasa corporal fue otro predictor de esta

alteración (35). Asimismo, también se identificó que la eliminación del exón 47 del gen *DMD* es una región específica que aumenta la probabilidad de tener mayores concentraciones de insulina en ayuno, a diferencia de otras regiones cuya eliminación no mostró ningún efecto.

Nuestros resultados sugieren que el exón 47 podría estar directamente involucrado con el desarrollo de la resistencia a la insulina en estos pacientes, aunque no sepamos en este momento cual es el mecanismo molecular de señalización de insulina involucrado con esta región del gen *DMD*. Se sabe que el exón 47 codifica para el dominio vara de la proteína distrofina y este dominio une al sarcolema con el sarcoplasma proporcionando una conexión lateral extendida entre distrofina y filamentos de F-actina (12), este dominio le da la característica a la distrofina de ser una proteína elástica y flexible (10). Lo anterior nos lleva a proponer que esta mutación afecta drásticamente a la distrofina y por lo tanto conlleva a una inestabilidad mayor del complejo de glicoproteínas asociadas a la distrofina y alterar al sarcolema dañando a la fibra muscular y finalmente alterando los mecanismos de señalización de la insulina. Sin embargo, a nuestro conocimiento no existen estudios reportados que muestren si la eliminación de algún exón del gen *DMD* este involucrado con el desarrollo de la resistencia a la insulina. Debido a esto es necesario realizar más investigaciones que esclarezcan el mecanismo molecular de la alteración de la distrofina y el desarrollo de la resistencia a la insulina.

11. Conclusiones.

1. El diagnóstico genético molecular es indispensable para confirmar el diagnóstico clínico de la distrofia muscular de Duchenne/Becker.
2. Nuestros resultados demuestran que los pacientes con diagnóstico genético molecular de la distrofia muscular de Duchenne/Becker presentan resistencia a la insulina.
3. El grado de adiposidad presente en los pacientes con distrofia muscular de Duchenne/Becker es mayor de acuerdo a su edad.

12. Perspectivas.

Cuantificar y analizar la localización de la distrofina y otras proteínas del complejo de glicoproteínas asociadas a la distrofina en fibras musculares de pacientes con distrofia muscular de Duchenne/Becker.

Explorar los posibles mecanismos involucrados en la señalización de la insulina y su posible alteración que se puede presentar en este tipo de pacientes.

Determinar si los pacientes presentan algún otro componente del síndrome metabólico.

13. Referencias.

- (1) Anderson J, Rogers R and Jarret H. Ca^{2+} - calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *J Biol Chem.* 1996;271:6605-6610.
- (2) Barbujani G, Russo A, Danieli G, Spiegler A, Borkowska J and Petrusewics I. Segregation analysis of 1885 DMD families: significant departure from the expected proportion of sporadic cases. *Human Genet.* 1990;84:522-526.
- (3) Boord J, Graber A, Christman J and Powers A. Practical management of diabetes in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:1763-1767.
- (4) Brenman J, Chao D, Xia H, Aldape K and Bret D. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell.* 1995;82:743-752.
- (5) Bunell T, Jaeger M, Fitzsimons D, Prins K and Ervasti J. Destabilization of the Dystrophin-Glycoprotein Complex without functional deficits in α -Dystrobrevin null muscle. *Plos One.* 2008;3:1-6.
- (6) Cardellá-Hernández. *Bioquímica médica.* Editorial Ciencias Médicas, La Habana. 1999; tomo IV, capítulo 66: 1167-1182.
- (7) Committee on Nutrition American Academy of Pediatrics. *Pedriatic Nutrition Handbook.* 4° edición. 1998;capítulo 11:173.
- (8) Coral-Vázquez R, Arenas D, Cisneros D, Peñaloza R, Salamanca F, Kofman S, Mercado R and Montañez C. Pattern of deletions of the dystrophin gene in Mexican Duchenne/Becker muscular dystrophy patients: The use of new designed primers for the analysis of the major deletion "Hot Spot" region. *Am J Med Genet.* 1997;70:240-246.

- (9) Darras B, Blattner P, Harper J, Spiro A, Alter S and Francke U. Intragenic deletions in 21 Duchenne muscular dystrophy (DMD)/Becker muscular dystrophy (BMD) families studied with the dystrophin cDNA: Location of breakpoints on HindIII and Bg/II exon-containing fragment maps, meiotic and mitotic origin of the mutations. *Am J Hum Genet.* 1988;43:620-629.
- (10) Davies K and Nowak K. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7: 762-773.
- (11) Dohm G. Exercise effects on muscle insulina signaling and action. Invited review: Regulation of skeletal muscle GLUT-4 expression by exercise. *J Appl Physiol.* 2002; 93:782-787.
- (12) Ehmsen J, Poon E and Davies K. The dystrophin-associated protein complex. *J Cell Science.* 2002;115:2801-2803.
- (13) Emery E. The muscular dystrophies. *The Lancet.* 2002; 359: 687-695.
- (14) Erazo-Torricelli R. Actualización en distrofias musculares. *Rev Neurology.* 2004; 39: 860-871.
- (15) Ervasti J and Campbell K. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol.* 1993;122:809-823.
- (16) Freidenberg G. and Olefsky J. Dissociation of insulin resistance and decreases insulin receptor binding in Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985;60:320-327.
- (17) Gibson SR. Principles of nutritional. 2° edición. Oxford University Press, New York. 2005; capítulo 14: 366-368.

- (18) González-Huerta N, Hernández-Zamora E, Arenas-Sordo M, Escobar-Cedillo R, Miranda-Duarte A and Leyva-García N. Identificación de deleciones en el gen DMD mediante PCR múltiple en pacientes mexicanos con distrofia muscular de Duchenne/Becker. *Rev Med Hosp Gen.* 2004;67:196-202.
- (19) Groh S, Zong H, Goddeeris M, Lebakken C, Venzke D, Pessin J and Campbell K. Sarcoglycan complex: Implications for metabolic defects in muscular dystrophies. *J Biol Chem.* 2009;C109.010728:1-10.
- (20) Guízar-Vázquez J. *Genética clínica.* 2° edición. Editorial El Manual Moderno, México. 1994; capítulo 18:273-296.
- (21) Guyton Arthur C. *Tratado de Fisiología médica.* 11° edición. Editorial Elsevier, España. 2003; capítulo 6:72-84.
- (22) Kempter B. Quick preparation of high molecular weight by freezing. *Trends Genet.* 1992;8:7-8.
- (23) Keskin M, Kurtoglu S, Kendirci M, Emre M and Yazici C. *Pediatrics.* 2005;115:500-503.
- (24) Klug W and Cumming MR. *Conceptos de genética.* 5° edición. Editorial Pearson, México. 1999; capítulo 10:286-287.
- (25) Koenig M, Hoffman E, Bertelson C, Monaco E, Feener C and Kunkel L. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell.* 1987;50:509-517.
- (26) Kunkel L, Monaco A, Middlesworth W, Ochs H and Latt S. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proc Natl Acad Sci.* 1985;82:4778-4782.

- (27) Lapidos K, Kakkar R and McNally E. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Cir Res.* 2004;94(8):1023-1031.
- (28) López M and Rodríguez M. Epidemiología y genética del sobrepeso y la obesidad. Perspectiva de México en el contexto mundial. *Bol Méd Hosp Inf Méx.* 2008;65:421-430.
- (29) McDonald C, Carter G, Abresch R, Widman L, Styne D, Warden N and Kilmer D. Body composition and water compartment measurements in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Phys Med Rehabil.* 2005;84:483-491.
- (30) Mok E, Béghin L, Gachon P, Daubrosse C, Fontan J, Cuisset J, Gottrand F and Hankard R. Estimating body composition in children with Duchenne muscular dystrophy: comparison of bioelectrical impedance analysis and skinfold-thickness measurement. *Am J Clin Nutr.* 2006;83:65-69.
- (31) Molero C, Morales L, Fernández V, Raleigh X, Casanova A, Connell S, Gómez M, Ryder E and Campos G. Insulina, leptina y hormona del crecimiento y su relación con índice de masa corporal e índice de obesidad en adolescentes. *ALAN.* 2006;56:1-13.
- (32) Monaco A, Bertelson C, Liechti-Gallati S, Moser H and Kunkel L. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics.* 1988;2:90-95.
- (33) Mulvey C, Harno E, Keenan A and Ohlendieck K. Expression of the skeletal muscle dystrophin-dystroglycan complex and syntrophin-nitric oxide synthase complex is severely affected in the type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat. *Eur J Cell Biol.* 2005;84:867-883.
- (34) Persrghin G, Caumo A, Arcelloni C, Benedini S, Lanzi R, Pagliato E, Sereni LP, Testolin G, Battezzati A, Comi G, Comola M and Luzi L. Contribution of abnormal insulin

secretion and insulin resistance to the pathogenesis of type 2 diabetes in myotonic dystrophy. *Diabetes Care*. 2003;26:2112-2118.

(35) Sánchez M, García M, Alarcón A and Cruz M. Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gac Méd Méx*. 2005;141:505-512.

(36) Tidball J. and Wehling M. Evolving Therapeutic Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy: Targeting Downstream Events. *Pediatr Res*. 2004;56(6):831-840.

(37) Torres H. Obesidad, resistencia a la insulina y características del músculo esquelético. *Acta Cient Venez*. 1999;50:34-41.

(38) Un K, Jae J, Sook H, Chung C, and Yong N. Molecular diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy by polymerase chain reaction and microsatellite analysis. *Mol Cells*. 2002;13:385-388.

(39) Viladot V. Lecciones básicas de biomecánica del aparato locomotor. Springer-Verlag, España. 2000:32-33.

(40) Wilcox G. Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochem Rev*. 2005;26:15-36.

(41) Willig T, Carlier L, Legrand M, Riviere H and Navarro J. Nutritional assessment in Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol*. 1993;35:1074-1082.

(42) Xu H, Barnes G, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou C, Sole J, Nichols A, Ross J, Tartaglia L and Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insuline resistance. *J Clin Inves* 2003; 112:1821-1830.

(43) Yang B, Jung D, Moto D, Meyer J, Koretzky G and Campbell K. SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J Biol Chem*. 1995;270:11711-11714.

(44) Yanovski S, Yanovski J. Obesity. *N Engl J Med.* 2002;346:591-602.

(45) Yoshida M, Hama H, Ishikawa-Sakurai M, Imamura M, Mizuno Y, Araishi K, Wakabayashi-Takai E, Noguchi S, Sasaoka T and Ozawa E. Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoplycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoplycanopathy. *Hum Mol Gen.* 2000;9:1033-1040.

(46) Zanardi M, Tagliabue A, Orcesi S, Berardinelli A, Uggetti C and Pichiecchio A. Body composition and energy expenditure in Duchenne muscular dystrophy. *Eur J Clin Nutr.* 2003;57:273-278.