



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PLAN ÚNICO DE ESPECIALIDADES MÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UMAE HOSPITAL DE PEDIATRÍA CMN SIGLO XXI**

**CORRELACIÓN ENTRE LOS *HOTSPOTS* AFECTADOS POR ELIMINACIONES
EN EL GEN *DMD* Y LOS ELEMENTOS DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL DE
PACIENTES CON Distrofia Muscular de Duchenne**

**TESIS
QUE PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD EN
GENÉTICA MÉDICA**

**PRESENTA
DR. MIGUEL ÁNGEL RAMÍREZ GARCÍA**

TUTOR:
DRA. MARICELA RODRÍGUEZ CRUZ
INVESTIGADOR TITULAR, UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN NUTRICIÓN,
UMAE HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

COTUTOR:
DR. JUAN CARLOS HUICOCHEA MONTIEL
GENETISTA, DEPARTAMENTO GENÉTICA MÉDICA,
UMAE HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

ASESOR METODOLÓGICO:
M. EN C. MARÍA DE LOURDES BARBOSA CORTES
INVESTIGADOR, UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN NUTRICIÓN,
UMAE HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

COLABORADORES:
DRA. ROSA ELENA ESCOBAR
SERVICIO DE ELECTRODIAGNÓSTICO Y Distrofia Muscular,
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN, SSA

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

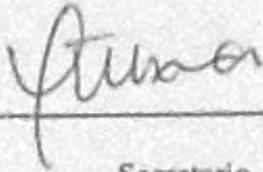
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

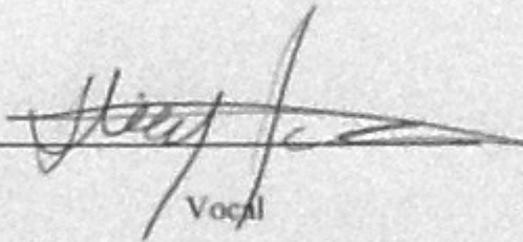
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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



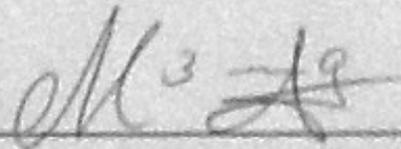
Presidente



Secretario



Vocal



Vocal

Tesista

Dr. Miguel Ángel Ramírez García

Médico Residente de Genética Médica,
UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

Investigadores

Dra. Maricela Rodríguez Cruz

Investigador Titular, Laboratorio de Biología Molecular
Unidad de Investigación Médica en Nutrición,
UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

Dr. Juan Carlos Huicochea Montiel

Genetista, Departamento Genética Médica,
UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

M. en C. María de Lourdes Barbosa Cortes

Investigador, Unidad de Investigación Médica en Nutrición,
UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

Dra. Rosa Elena Escobar

Jefa de servicio de Electrodiagnóstico y Distrofia Muscular,
Instituto Nacional de Rehabilitación, SSA

2013



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

“2006, año del Bicentenario del natalicio del Benemérito de las Américas,
Don Benito Juárez García”

COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Ref. 09-B5-61-2800/02100

Agosto 10, 2006

DOCTORA MARICELA RODRÍGUEZ CRUZ
Unidad de Investigación Médica en Nutrición,
Unidad Médica de Alta Especialidad,
Hospital de Pediatría,
Centro Médico Nacional Siglo XXI

Informo a usted que el proyecto titulado: “**Identificación de obesidad y resistencia a la insulina en pacientes con distrofia muscular de Duchenne o Becker**”, fue sometido nuevamente a la consideración de esta Comisión Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas éticas vigentes y la carta de consentimiento informado es suficientemente explícita, por lo cual tengo el agrado de hacerle saber que con base en las opiniones de los vocales de esta Comisión, se ha emitido dictamen de **AUTORIZADO**, con número de registro: **2006-785-074**.

De acuerdo a la normatividad institucional vigente, deberá informar semestralmente a esta Comisión, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo.

Atentamente

DOCTORA DOLORES MINO LEÓN
Secretario Ejecutivo
Comisión Nacional de Investigación Científica

Con copia:

- Doctor Carlos David González Lara, Director de la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI
- Doctora Mardya López Alarcón, Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición, Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI

DML'brs

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

4° piso Bloque “B” de la Unidad de Congresos Av. Cuauhtémoc 330 Col. Doctores México 06725

INDICE

	Pág.
1. RESUMEN ESTRUCTURADO	6
2. MARCO TEÓRICO	7
Etiología	
Cuadro clínico	
Composición corporal en la Distrofia Muscular de Duchenne	
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
4. JUSTIFICACIÓN	14
5. OBJETIVOS	15
6. HIPÓTESIS	16
7. METODOLOGÍA	17
Diseño del estudio	
Cálculo de muestra	
Universo y muestra	
Criterios de selección	
-Criterios de inclusion	
-Criterios de no inclusion	
-Criterios de eliminación	
8. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE VARIABLES	19
9. PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
10. PROCEDIMIENTOS	21
-Diagnóstico genético molecular de la Distrofia Muscular de Duchenne	
-Análisis de composición corporal mediante Absorciometría Dual por Rayos X	
11. CONSIDERACIONES ÉTICAS	25
12. RESULTADOS	26
13. DISCUSIÓN	33
14. CONCLUSIONES	37
15. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS	38
16. CRONOGRAMA	39
17. BIBLIOGRAFIA	40
18. ANEXOS	43

RESUMEN ESTRUCTURADO

Las afecciones neuromusculares como la distrofia muscular de Duchenne (DMD) se asocian a una alteración en los elementos de la composición corporal, donde el poco estímulo motriz provoca disminución de la masa muscular. Además, como consecuencia de esta baja actividad existe poca estimulación para llevar a cabo el depósito mineral a nivel óseo, generando una disminución del gasto calórico y un consecuente incremento del depósito de grasa.

Desde el reconocimiento de las alteraciones en el gen *DMD* como causa del fenotipo de DMD, los individuos hemiciótopos pueden tener diversos mecanismos mutacionales en el gen *DMD* que confieren pérdida de función del producto proteico, entre ellos, las eliminaciones de material codificante son el mecanismo más prevalente. Este tipo de mutación puede involucrar un único *hotspot* o ambos, considerándose que la gravedad de las manifestaciones puede ser condicionada tanto por el número como el tamaño de las eliminaciones.

Durante su lapso vital los pacientes presentan modificaciones en la composición corporal, debido a la incapacidad de mantener el equilibrio entre degeneración/regeneración de fibras musculares que conlleva incremento en el depósito de tejido de grasa y disminución del contenido mineral óseo.

Objetivo: Determinar la asociación entre el *hotspot* afectado por eliminaciones en el gen *DMD* con los elementos de la composición corporal y la capacidad motriz de pacientes con DMD.

Tipo de estudio: observacional, transversal, analítico y ambielectivo.

Métodos: Se incluyeron 65 pacientes, en quienes se confirmó el diagnóstico molecular de DMD mediante reacción en cadena de la polimerasa múltiple (MPCR), adicionalmente se realizó un escaneo por absorciometría dual por rayos X (DXA) para valorar la composición corporal.

Análisis estadístico: Se realizó estadística descriptiva con frecuencias y porcentajes para las variables cualitativas y medidas de tendencia central (mediana) y dispersión, desviación estándar (mínimos y máximos). Para la prueba de asociación de las variables cualitativas se realizó prueba exacta de Fisher y para las variables cuantitativas prueba de Kruskal Wallis realizando post hoc con prueba de U de Mann Whitney, regresión lineal para ajustar la confusión entre edad y discapacidad.

Resultados: Existe afección solo de un *hotspot* mutacional (mayor o menor) no existen diferencias en los elementos de la composición corporal; sin embargo se muestran tendencias en mayor depósito de masa grasa, así como una mayor afección en la escala motriz cuando existe afección del *hotspot* menor.

Se encontró una disminución en el componente magro total, grasa total y el contenido mineral óseo, siendo menor en el grupo de ambos *hotspots* afectados, comparado contra el grupo que sólo presenta afección en el *hotspot* menor.

La estratificación por grupos de acuerdo a la calificación de capacidad motriz, muestra que un mayor deterioro motor se encuentra asociado a alteraciones en los elementos de la composición corporal.

MARCO TEÓRICO

Etiología

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es la más frecuente de las distrofias musculares, afectando a uno de cada 3,500 recién nacidos vivos varones y estimándose que hasta un tercio de los casos es resultado de mutaciones *de novo* en el gen *DMD* localizado en el cromosoma X, el cual codifica para la proteína distrofina de un peso de 427kDa. [1, 2, 3, 4]

Esta proteína estructuralmente se encuentra conformada por 4 dominios: (i) un dominio N-terminal conformado por 240 residuos de aminoácidos y contiene 3 sitios de interacción con la proteína actina, codificado por la primera decena de exones; (ii) un dominio central de unos 3000 aminoácidos y que conforma una estructura de 24 repetidos similares a la espectrina; es entre los repetidos 11-17 donde se lleva a cabo una interacción al parecer débil con la actina, codificado por los exones 35 a 44, (iii) un dominio rico en cisteína de 280 aminoácidos, que se une al β -dístroglicano y es codificado por los exones 62-69 y (iv) el dominio C-terminal de unos 420 aminoácidos que interacciona con el complejo de glicoproteínas de asociación a distrofina. [5, 6, 7, 8, 9]. La expresión de distrofina parece ser dependiente de tejido específico ya que al menos de las 16 isoformas conocidas su expresión es dependiente del uso alternativo de 7 promotores adicionales que le confieren la capacidad de formar distrofinas de diversos tamaños con expresión tejido específico, sin embargo la forma silvestre es exclusiva de músculo esquelético y cardíaco [6, 10]. Recientemente se ha descrito una región específica del dominio central que involucra los repetidos similares a la espectrina 16 y 17 (codificado por los exones 42-45) y que son necesarios para la localización de la sintetasa de óxido nítrico del sarcolema (SON) [11].

La mayor parte de las mutaciones en DMD son producto de la eliminación de exones en aproximadamente el 65-70% de los casos [2]. De manera particular, las eliminaciones se encuentran frecuentemente en 2 regiones propensas a la pérdida de unidades codificantes, los denominados *hotspots* mutacionales, uno de ellos localizado en la porción 5' del gen comprometiendo a los exones 2-20 (*hotspot* menor) y otro más frecuentemente afectado

(hasta el 70% de las eliminaciones) denominado *hotspot* mayor dentro del dominio central (codificado por los exones 44-53) [1, 3]. Al parecer aquellas eliminaciones que alteran el marco producen una proteína trunca, generando un cuadro clínico severo compatible con DMD por pérdida de función [7], mientras que las eliminaciones que mantienen el marco de lectura generan una entidad alélica con un fenotipo leve de distrofia, la distrofia muscular de Becker (DMB), esto se explica por la regla de mantenimiento del marco de lectura propuesta por Monaco *et. al.* [12]. Sin embargo, el cumplimiento de esta regla se da sólo en el 90% de los casos ya que la variación en la severidad del fenotipo también puede ser reflejo de la extensión y localización de las eliminaciones dentro del gen [6, 13, 14]. Las eliminaciones que abarcan mayor número de exones o aquellas en las que se pierden dominios con funciones cruciales tienden a mostrar un fenotipo más severo de la enfermedad. Se menciona generalmente que la pérdida de 36 o más exones se encuentra asociado a un fenotipo grave, independientemente de si se mantiene o no el marco de lectura, sugiriendo un tamaño pequeño de la distrofina funcional [5, 14]. Pese a las diversas hipótesis que intentan explicar el comportamiento mutacional, se ha observado un inusual fenómeno en el cual existe regeneración de fibras de distrofina (fibras revertantes) en modelos animales de la enfermedad y también en músculo de pacientes con DMD, este inusual hallazgo al parecer es resultado de un mecanismo natural que genera transcritos que saltan las lesiones en el gen, aunque se desconoce el mecanismo preciso por el cual se lleva a cabo este tipo de transcripción [15, 16, 17, 18, 19, 20, 21] .

El diagnóstico de la DMD de manera primaria es realizado bajo la sospecha clínica, evolución y determinación de bioquímica de la Creatinina-fosfoquinasa (CPK, por sus siglas en inglés); sin embargo, es importante corroborarlo mediante el análisis del gen o de la proteína. El análisis del gen incluye la identificación de mutaciones; entre los métodos más eficientes y por su bajo costo la utilización de PCR Multiplex (MPCR, por sus siglas en inglés) identifica los exones eliminados [2]. Con esta metodología, es posible detectar hasta el 98% de las eliminaciones utilizando conjuntos de *primers* de diferentes exones [1, 24].

Cuadro Clínico

Los individuos con alteraciones en el gen *DMD* tienen una apariencia normal al nacimiento, mostrando las primeras manifestaciones entre los 2 y 3 años de vida y se estima que hasta el 50% de los pacientes con DMD no caminan hasta la edad de 18 meses y exhiben signos de retraso en la adquisición de habilidades motoras. Conforme avanza su desarrollo los niños presentan la denominada marcha de “pato” (marcha de puntas con hiperlordosis), un aumento de volumen en a nivel de las pantorrillas (pseudohipertrofia de gastrocnemios), dificultad para correr y saltar por la instauración de debilidad muscular simétrica y progresiva [5]. Esto confiere que la mayor parte de los pacientes pierdan la capacidad para deambular alrededor de los 12-13 años, y en algunos casos de manera tan temprana como los 7 años.

Existen diversas herramientas clínicas que tienen como objeto la medida de la capacidad motriz en pacientes con distrofia, una de ellas es la denominada escala Vignos [24] propuesta desde hace varias décadas y que califica de manera sencilla las habilidades motoras presentes en los pacientes (*cuadro 1*).

Cuadro 1. Escala Vignos.

Calificación	Habilidades
1	Camina y sube escaleras sin ayuda.
2	Camina y sube escaleras con ayuda del barandal.
3	Camina y sube escaleras lentamente con ayuda de barandal.
4	Camina sin ayuda y se levanta de la silla, pero no puede subir escaleras.
5	Camina sin ayuda, pero no se levanta de la silla o sube escaleras.
6	Camina solo con asistencia o de forma independiente con apoyo en las piernas.
7	Camina con apoyo en las piernas pero requiere ayuda.
8	Se levanta con apoyo en las piernas, pero es incapaz de caminar incluso con ayuda.
9	Confinado a silla de ruedas, y la flexión de los codos vence gravedad.
10	Confinado a silla de ruedas o cama, flexión de codos no vence gravedad.

En los pacientes con DMD las fibras musculares distróficas tienen poca o nula cantidad de distrofina y ha sido sugerido que esto resulta en la disrupción de las membranas musculares, lo cual altera la actividad de los canales de calcio por lo que un ingreso incrementado de este catión produce desregulación y las fibras musculares son propensas a daño durante la generación del trabajo mecánico generando un estado final de necrosis, el repetitivo daño produce pérdida de tejido muscular y subsecuente reemplazo por tejido adiposo/conectivo en todos los grupos musculares, no solo en los gastrocnemios [25, 26, 27]. La debilidad muscular y la pérdida de la deambulación comprometen aún más la motricidad de los pacientes lo que se traduce en una reducción del gasto calórico por actividad física, este último y la sobrealimentación permiten mayor acumulo de masa grasa [29]. Dicho acumulo es un marcador preciso de la progresión de la enfermedad, y el reconocimiento del incremento de masa grasa puede ayudar a monitorizar a los pacientes, ya que la obesidad es un problema que afecta al 54% de los niños con DMD alrededor de los 13 años de edad [25].

Adicionalmente durante el periodo de postración pueden generarse otras complicaciones como es la propensión al desarrollo de contracturas (fenómeno observado con el progreso de la enfermedad) y un riesgo incrementado de fracturas en huesos largos [29, 30]. La naturaleza crónica de esta entidad, aunado a los cambios progresivos y la pérdida de la independencia motora producen cambios emocionales y alteración del estado psicológico, que repercute en reducción de la calidad de vida de los pacientes [31, 32]. La mayor parte de estos individuos sucumben frente a la enfermedad alrededor de los 20 años como resultado de complicaciones respiratorias y cardíacas. [5]

Por su parte la entidad alélica, la distrofia muscular de Becker (DMB) con un hipotético curso clínico de menor gravedad y progresión lenta, también muestra amplia variación en la severidad clínica ya que algunos individuos son capaces de deambular y llevar una vida normal, mientras que otros pierden la capacidad de deambular al final de la adolescencia o tempranamente pasados los 20 años. [2, 33]

Composición Corporal en la Distrofia Muscular de Duchenne

Tal como se comentó previamente, aquellas condiciones que reducen la movilidad en la niñez como la parálisis cerebral infantil y la distrofia muscular de Duchenne (DMD), se asocian con una modificación importante en la composición corporal, por lo que estimar la cantidad de masa magra así como otros elementos de la composición corporal recobra relevancia cuando se evalúan patologías con gran compromiso motor [34, 35].

Distintos grupos han evaluado la composición corporal de pacientes con DMD mediante la aplicación de diversas metodologías de evaluación *in vivo*. La mayor parte de estas investigaciones han descrito resultados equiparables que consisten en: reducción de la cantidad de masa magra, un depósito mayor de tejido graso y una reducción en el contenido mineral óseo [25, 28, 36, 37, 38].

La alteración de la masa magra responde a una cascada de eventos consecuencia de la sustitución muscular por grasa asociados a la pérdida muscular y la pobre regeneración de este tejido en esta patología, con un aumento del depósito de tejido graso/fibroso y una consecuente reducción del contenido mineral por un pobre estímulo motor, lo cual conlleva a un riesgo incrementado de fracturas [3, 39, 40, 41, 42, 43].

Como se expuso previamente la evaluación de la composición corporal puede realizarse por diversas metodologías, sin embargo el amplio uso de la absorciometría dual por rayos X (DXA, por sus siglas en inglés) como herramienta de evaluación para la composición corporal en el ámbito clínico y de investigación ha puesto de manifiesto un plausible uso en población pediátrica [44]. La medición con DXA es una técnica de escaneo que mide la atenuación diferencial de 2 haces de energía que atraviesan el cuerpo [45], lo cual genera un modelo de 3 compartimentos al subdividir la masa libre de grasa en: masa magra (MM) y el componente mineral óseo o densidad mineral ósea (CMO); además de la estimación de la masa grasa (MG). [46, 47].

La evaluación de la composición corporal mediante la metodología DXA puede ser efectiva en pacientes con DMD, aunque ha sido poco difundida para este propósito. [37, 48]. Sin embargo su uso es la prueba de referencia para la valoración de la densidad mineral ósea [39, 42, 43, 49].

El propósito de esta investigación fue tratar de encontrar una asociación entre los sitios frecuentemente afectados por eliminaciones en el gen *DMD* (*hotspots* mutacionales) y las determinaciones de los elementos de la composición corporal.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La DMD es la distrofia hereditaria mas prevalente en la población mundial, la historia natural de la enfermedad es ampliamente reconocida en la cual un individuo afectado comienza con retraso en la adquisición de la marcha, dificultad para incorporarse, pérdida de la deambulación, confinamiento a una silla de ruedas y muerte a edades tempranas (13).

Los individuos hemicigotos pueden tener diversos mecanismos mutacionales en el gen *DMD* que confieren pérdida de función del producto proteico, entre ellos, las eliminaciones de material codificante son el mecanismo más prevalente. Este tipo de mutación puede involucrar un único *hotspot* o ambos, considerándose que la gravedad de las manifestaciones puede ser condicionada tanto por el número como el tamaño de las eliminaciones (14).

Durante su lapso vital los pacientes presentan modificaciones en la composición corporal, debido a la incapacidad de mantener el equilibrio entre degeneración/regeneración de fibras musculares que conlleva a una disminución del gasto calórico con incremento en el depósito de tejido graso y disminución del contenido mineral óseo.

Actualmente no existen estudios que correlacionen el tipo de mutaciones con los elementos de la composición corporal en pacientes con DMD.

Debido a esto nos planteamos la siguiente pregunta:

1. ¿Existirá alguna asociación entre los *Hotspots* afectados por eliminaciones en el gen *DMD* con los elementos de la composición corporal de pacientes con DMD?.

JUSTIFICACIÓN

El estudio de las enfermedades que causan gran discapacidad es un tema prioritario de investigación en salud en nuestro país. Los pacientes con DMD tienen un curso crónico, con gran compromiso de la motilidad y un desenlace fatídico a edades tempranas.

A la fecha, no se ha descrito si existen mutaciones en el gen *DMD* que se asocien con los elementos de la composición corporal. Este estudio pretendió realizar una asociación entre las mutaciones detectadas en el gen *DMD* mediante la metodología de PCR Multiplex con los elementos de la composición corporal; en el caso particular de nuestra población no ha recibido corticoterapia lo cual cobra relevancia para una descripción del comportamiento de la composición corporal en la historia natural de la enfermedad de pacientes mexicanos.

Los resultados de esta investigación podrían ser la base científica para que el equipo médico cuente con más elementos para el diseño de estrategias de vigilancia de pacientes con distrofia y de esa manera tener más elementos para poder valorar la gravedad del cuadro clínico o progresión de la enfermedad, no sólo basándose en la función motora, sino contar con otros parámetros que en conjunto repercutan en elevar la calidad de vida de los pacientes.

OBJETIVOS

General

Determinar la correlación entre el *hotspot* afectado por eliminaciones en el gen *DMD* con los elementos de la composición corporal y la capacidad motriz de pacientes con DMD.

Específicos

Determinar la asociación entre las eliminaciones del *hotspot* mayor con los elementos de la composición corporal.

Determinar la asociación entre las eliminaciones del *hotspot* menor con los elementos de la composición corporal.

Determinar la asociación entre ambos *hotspots* afectados con los componentes de la composición corporal total.

Determinar la asociación entre las variables estudiadas y la capacidad motriz.

HIPÓTESIS

Hipótesis Generales

- Existirá una menor proporción de masa magra, mayor depósito de tejido graso, un menor contenido del componente mineral óseo y mayor alteración en la escala motriz en pacientes con DMD que tengan eliminaciones que afecten el *hotspot* mayor que aquellas que afectan el *hotspot* menor (18).
- Existirá una menor proporción de masa magra, mayor depósito de tejido graso, un menor contenido del componente mineral óseo y mayor alteración en la escala motriz en pacientes con DMD que tengan ambos *hotspots* afectados que en aquellos con afección de un solo *hotspot* (18).

METODOLOGÍA

Tipo de diseño

Este trabajo de investigación es de tipo observacional, transversal, analítico y ambilectivo.

Cálculo de tamaño de muestra

Tomando en cuenta un alfa con potencia del 95% (1.96) con un valor p 0.05, y un valor de β de 0.20 (-0.84) y utilizando la fórmula para diferencia de medias [50] según lo reportado por Palmieri *et. al.* [37], se obtuvo cálculo estimado de tamaño de muestra de 63 pacientes.

Media = 74.3 kg/m²

DE = 3

alfa = 0.05

beta = 0.20

$$N = \frac{\delta^2 (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2}{\Delta^2} = \frac{(DE)^2 (1.96 + 0.84)^2}{(MEDIA)^2}$$

N = 63 pacientes en total

Universo y muestra.

Se incluyeron 65 pacientes derivados de los servicios de Genética y Neurología del Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI, del servicio de Genética del Hospital General

“Gaudencio González” de CMN La Raza y del servicio de Electrodiagnóstico y Distrofia Muscular del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR)

Criterios de Selección

-Criterios de inclusión

- Pacientes de cualquier edad que cuenten con el diagnóstico clínico y molecular de distrofia muscular de Duchenne.
- Consentimiento del paciente y padres o tutores, firmando la carta de autorización para participar en el estudio.

-Criterios de Exclusión

- Pacientes con diagnóstico clínico de distrofia muscular de Becker.
- Pacientes que estén bajo tratamiento con esteroides.
- Pacientes que por la propia historia de la enfermedad presenten un grado avanzado de escoliosis o contracturas que impida mantenerlos en posición supina para llevar a cabo la DXA.

-Criterios de Eliminación

- Padres de pacientes o pacientes que soliciten ser retirados del estudio durante la colección de muestra de sangre o determinación de la DMO.
- En caso de que pueda suceder lesión física al momento de realizar las mediciones

DEFINICION Y CLASIFICACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN
DEMOGRÁFICAS				
EDAD	Tiempo transcurrido desde el inicio del nacimiento hasta su defunción.	Tiempo transcurrido en meses desde el nacimiento hasta el momento en el que se capturan los datos.	Demográfica Cuantitativa Discreta	Años
INDEPENDIENTES				
SITIO PROPENSO A LAS ELIMINACIÓN(ES) (<i>HOTSPOT</i>)	<p><i>Hotspot menor</i> Porción 5' propensa a eliminaciones comprendida por los exones 2-20.</p> <p><i>Hotspot mayor</i> Porción del dominio central propensa a eliminaciones comprendida por los exones 43-60.</p>	<p>Ausencia de amplificación de una o más unidades codificantes entre el promotor y exones 2-20.</p> <p>Ausencia de amplificación de una o más unidades codificantes entre exones 43-60.</p>	Cualitativa Ordinal	<p>1= sitio caliente mayor de eliminaciones</p> <p>2= sitio caliente menor de eliminaciones</p> <p>3= ambos sitios calientes afectados</p>
DEPENDIENTE				
CONTENIDO MINERAL ÓSEO	Disminución de la densidad mineral ósea por debajo de -2.0 desviaciones estándar.	Disminución de la densidad mineral ósea por debajo de -2.0 desviaciones estándar evaluado mediante DXA.	Cuantitativa Continua	<p>g/cm²</p> <p>z-Score</p>
COMPOSICIÓN CORPORAL MAGRA	Proporción de la masa total libre de masa grasa y contenido óseo mineral.	Proporción de la masa total libre de masa grasa y contenido óseo mineral, expresada en gramos.	Cuantitativa Ordinal	Gramos (kg)
COMPOSICIÓN CORPORAL GRASA	Proporción de la masa total libre de masa magra y contenido óseo mineral.	Proporción de la masa total libre de masa grasa y contenido óseo mineral, expresada en gramos.	Cuantitativa Ordinal	Gramos (kg)
CONFUSORA				
CAPACIDAD MOTRIZ	Capacidad que tiene el organismo para la solución eficaz de situaciones motoras desconocidas, gracias al trabajo conjunto del sistema nervioso central y el sistema muscular.	Habilidad para realizar actividades según la escala Vignos (<i>ver cuadro 1</i>).	Cuantitativa intervalo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Marcha autosuficiente. (Vignos 1-5) 2. Marcha y motricidad con apoyo. (Vignos 6-8) 3. Confinamiento a silla de ruedas. (Vignos 9-10)

PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó estadística descriptiva con frecuencias y porcentajes para las variables cualitativas y medidas de tendencia central (mediana) y dispersión, desviación estándar (mínimos y máximos).

Se evaluó la distribución paramétrica y no paramétrica por prueba de Shapiro Wills.

Para la prueba de asociación de las variables cualitativas se realizó prueba exacta de Fisher y para las variables cuantitativas prueba de Kruskal Wallis realizando post hoc con prueba de U de Mann Whitney.

Para predecir el comportamiento de los elementos de la composición corporal en función de variables como la edad, la calificación motora según la escala Vignos y los *hotspots* afectados se realizó un modelo multivariado de regresión lineal.

Se tomaron como variables estadísticamente significativas valores de $p < 0.05$ y se realizó el análisis con el paquete estadístico de SPSS versión 15.

PROCEDIMIENTOS

El médico de las diversas especialidades que identificó clínicamente a los pacientes con DMD, explicó a los padres o tutores de los pacientes los fundamentos, procedimientos del estudio, los beneficios que proporciona su participación, el derecho de confiabilidad y de abandonarlo cuando lo desee. Si los padres/tutores o el sujeto de estudio permitieron la participación, se les pidió que firmaran la carta de consentimiento informado (**Anexo 1**).

Una vez explicado el procedimiento se concertó una cita para realizar historia clínica en hoja de recolección de datos (**Anexo 2**) y la toma de una muestra de sangre periférica por venopunción. La muestra de sangre se colocará en tubos vacutainer con anticoagulante para realizar el diagnóstico molecular para identificar el tipo de mutaciones presentes en el gen *DMD* (*ver diagnóstico molecular*). Se incluyeron aquellos pacientes en donde el diagnóstico molecular confirme la distrofia. Además, en los pacientes se realizó la historia clínica, se midió el peso, la talla y se determinó la composición corporal mediante DXA.

Diagnóstico genético molecular de la DMD

Se tomó una muestra de sangre periférica con anticoagulante, utilizando un tubo con capacidad de 5ml. A partir de esta muestra se extrajo el DNA de leucocitos.

Obtención de leucocitos

El tubo vacutainer con EDTA se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos; obteniéndose una fase inferior de eritrocitos, una interfase que contiene leucocitos y un fase superior con presencia de plasma. Se extrajo la interfase de leucocitos y se realizaron lavados con buffer de lisis de eritrocitos (RBCL que se preparó con TRIS 10mM pH6.7, MgCl₂ 5mM y NaCl) hasta que se eliminaron los eritrocitos obteniéndose un botón blanco-amarillenta (4).

Extracción de DNA

El precipitado de leucocitos se disolvió en 118 μL de NaCl 5 mM y se agitó por inversión. Se agregaron 61.3 μL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%, se agitó por inversión y se dejó reposar durante 5 minutos. A continuación, se agregaron 410 μL de NaCl 6 M agitándose por inversión y se dejó reposar por 5 minutos. Posteriormente se agitó con vortex y se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se trasvasó a un microtubo, se añadió 1 mL de etanol absoluto y se mantuvo en reposo por 30 minutos a -70°C . Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con etanol al 75%. Finalmente, el DNA se disolvió en agua grado biología molecular (100-300 μL aproximadamente) para su posterior cuantificación y análisis de integridad (4).

Cuantificación del DNA

Se realizó una dilución 1:25 de la muestra de DNA y se leyó la absorbancia (A) en un espectrofotómetro a 260/280 nm. El equipo proporciona la relación de A 260 nm/280 nm, que se utiliza para evaluar la pureza del DNA y además proporciona automáticamente la concentración de la muestra. El DNA se considera de pureza aceptable cuando la relación A 260 nm/ 280 nm es entre 1.8 y 2.0. La concentración se reporta en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (4).

Verificación de la integridad del DNA(4)

La integridad del DNA se verificó por electroforesis horizontal utilizando un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (10mg/mL); una alícuota del DNA se sometió a un voltaje de 90V durante 60 minutos en buffer TBE (500 mM de Tris-HCl, 60 mM de ácido bórico y 83 mM de EDTA). La imagen de la electroforesis de DNA se capturó con el equipo Alphamager™ HP system de Alpha Innotech Corporation (California, U.S.A.).

Amplificación del gen DMD por medio de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple

Se realizó la amplificación del gen DMD, a partir de DNA genómico por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiple (MPCR, por sus siglas en ingles)

utilizando 2 conjuntos de *primers*: Set I, exones 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 48, y 51; Set II, promotor y exones 3, 6, 13, 43, 47, 50, 52 y 60 de Maxim Biotech, Inc. (San Francisco CA, U.S.A.) que son específicos para las regiones *hotspot* mayor y *hotspot* menor del gen de la distrofina. Esta reacción se llevó a cabo en un microtubo de 200 μL , se añadieron 25 μL de un buffer que contiene sales, potenciador, estabilizador y dNTPs, 5 μL de oligonucleótidos del Set I o II, 0.5 μL de TaqDNA polimerasa (5 U/ μL), 500 ng de DNA genómico o 5 μL de DNA de la muestra control. Finalmente, se agregó la cantidad necesaria de agua estéril libre de DNAsas para completar un volumen final de 50 μL .

Para la amplificación por PCR, la mezcla anterior se sometió a la mezcla anterior a distintas condiciones en un termociclador T1 Thermoblock Biometra ® (Alemania). En primera instancia, el DNA se desnaturalizó a 94°C durante 3 minutos. Después transcurrieron una serie de 43 ciclos en cada uno de los cuales; primero se desnaturalizó el DNA a 94°C durante 30 segundos, después se alinearon los *primers* a una temperatura de 56°C durante 30 segundos, seguido de la polimerización realizada por la Taq polimerasa a 65°C durante 3 minutos. Finalmente la mezcla de reacción se sometió a una temperatura de 70°C durante 10 minutos y una vez que transcurrió ese lapso de tiempo, el producto de la amplificación se almacenó a -20°C (4).

Para concluir el procedimiento diagnóstico, se tomó una alícuota del producto de PCR y se sometió a una electroforesis horizontal en gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio (10mg/mL) con buffer TBE (500mM de Tris-HCl, 60 mM de ácido bórico y 83mM de EDTA). Además, en el mismo gel se colocó un marcador de 100 pares de bases y un producto de PCR control. El gel se sometió a 80V durante 240 minutos para posteriormente capturar y analizar la imagen de los productos de PCR de las diferentes regiones del gen DMD con el equipo Alphasizer™ HP system de Alpha Innotech Corporation (California, U.S.A.). El diagnóstico consistió en determinar la ausencia de algunos de los productos de PCR de los exones analizados, comparados con el DNA de sujetos sin DMD (control negativo) (ver **Figura 1**).

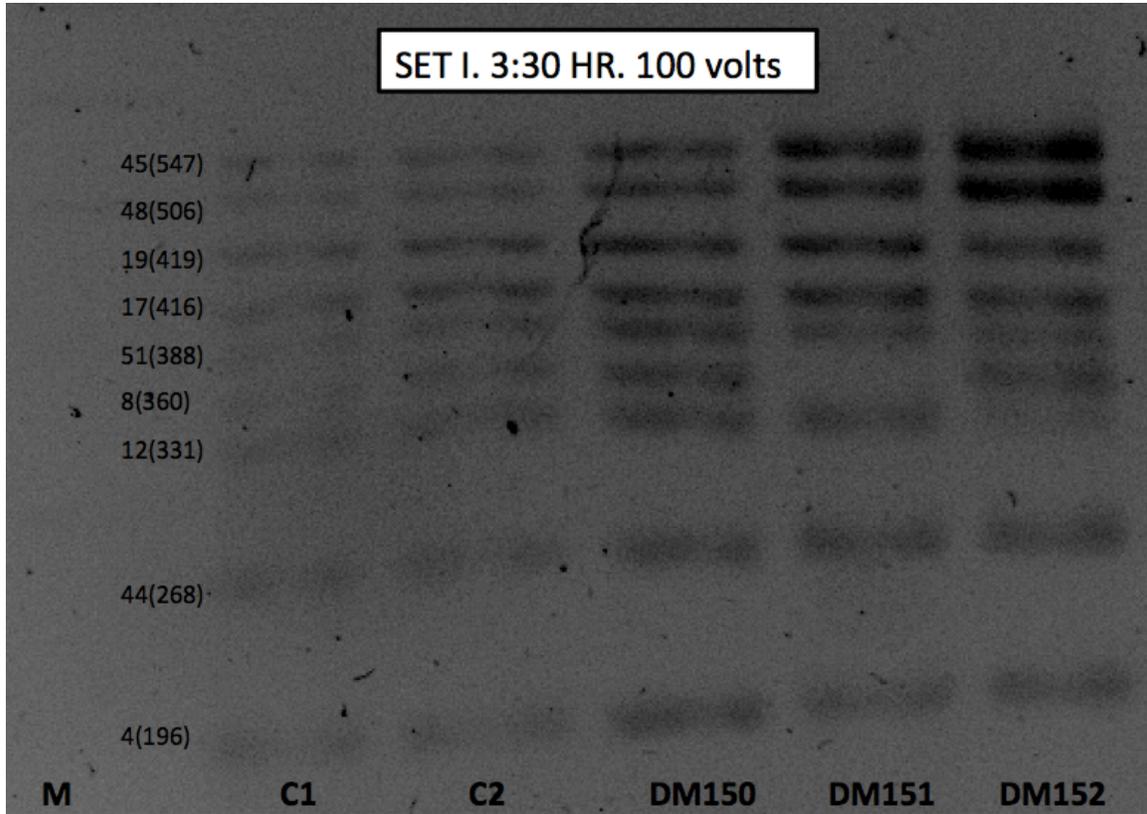


Figura 1. Fotografía de amplicones mediante PCR Múltiple, nótese ausencia de amplificación del exón 8 en el cuarto carril.

Análisis de composición corporal mediante DXA

La composición corporal fue determinada (4) mediante la tecnología DXA utilizando un equipo Lunar Prodigy (G.E. Medical Systems, Wisconsin, Estados Unidos). Todos los datos fueron analizados mediante el software enCORE (versión 9.0x; G.E. Medical Systems, Wisconsin, Estados Unidos).

Este método proporciona grandes ventajas, entre las que destacan que es un procedimiento rápido, no invasivo, indoloro y confiable. Aunque el método DXA se diseñó inicialmente para el estudio de la masa ósea, nos permite valorar claramente los porcentajes de masa grasa y la masa libre de grasa, irradiando poco al individuo (0,05-1,5 mrem) durante 5-15 min/persona. Este método tiene coeficientes de variación pequeños: 0,8% para la grasa corporal total, 1% para la masa ósea y 2% para el tejido magro.

La técnica se fundamenta en la atenuación diferencial de 2 haces de energía que atraviesan el cuerpo, parte de la energía se perderá cuando estos haces interactúen con materia que absorba la energía emitida; calculando el diferencial de esta energía se puede obtener la masa por unidad de área. Con esta metodología se genera un modelo de 3 compartimentos que determina la masa magra (MM), el componente mineral óseo o densidad mineral ósea (CMO) y la masa grasa (MG).

El equipo consiste de una camilla en donde el paciente debe colocarse en decúbito supino y permanecer inmóvil durante el escaneo. Debajo de esta camilla se encuentra un generador de rayos X de baja radiación que pasan a través del cuerpo del paciente con dos corrientes de energía, uno de 40 y otro de 70-100KeV, una es absorbida principalmente por los tejidos blandos y el otro por el hueso. Además, dicho equipo posee un brazo móvil el cual se desplaza de la porción superior a inferior del cuerpo durante el escaneo. Este brazo contiene un detector de rayos X que medirá la cantidad de los dos rayos de energía absorbidos en el cuerpo del paciente. Esta información es colectada y analizada por el software enCORE para estimar la masa grasa, masa magra y densidad mineral ósea. La realización de este estudio tiene una duración aproximada de 5 minutos.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

De acuerdo al reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación (Título Segundo, De los aspectos éticos de la investigación en seres humanos, Capítulos I, Artículo 17) [51], este estudio se considera como riesgo mayor que el mínimo, ya que requirió la toma de 2 muestras y un total de extracción de 5 ml de sangre venosa, las cuales fueron etiquetadas mediante un código para la identificación del paciente, este código fue asignado por el grupo de investigación, con las iniciales del paciente así como el número consecutivo de la muestra tomada, con el propósito de respetar la confidencialidad de los datos e identidad del paciente y respetar su individualidad. Por otro lado, la realización de la absorciometría dual por rayos X (DXA) es un método de baja exposición a rayos X que no implica un riesgo para la salud del paciente. La investigación se desarrolló con apego a la Declaración de Helsinki del año 2000, el Informe Belmont y el Código de Nuremberg [52]. Las personas que participaron en el proyecto tuvieron sensibilidad, honestidad y respeto para el paciente, por lo que evitaron caer en conflictos de intereses durante el desarrollo de dicho estudio. Una vez concluido el proyecto los pacientes que hayan participado tendrán el derecho de acudir para que se les informe sobre los resultados obtenidos de acuerdo a lo especificado en la carta de consentimiento informado.

RESULTADOS

En este estudio se incluyeron 65 pacientes con diagnóstico clínico y molecular de la DMD ya que presentaron al menos una eliminación en alguna de las regiones analizadas en el gen *DMD*. La frecuencia de alteraciones en el gen *DMD* en la población de estudio se distribuyeron de la siguiente manera: 47 pacientes (72%) tuvieron mutaciones en el *hotspot* mayor, 13 (20%) en ambos *hotspots* y 5 (8%) en el *hotspot* menor (ver **Figura 2**).

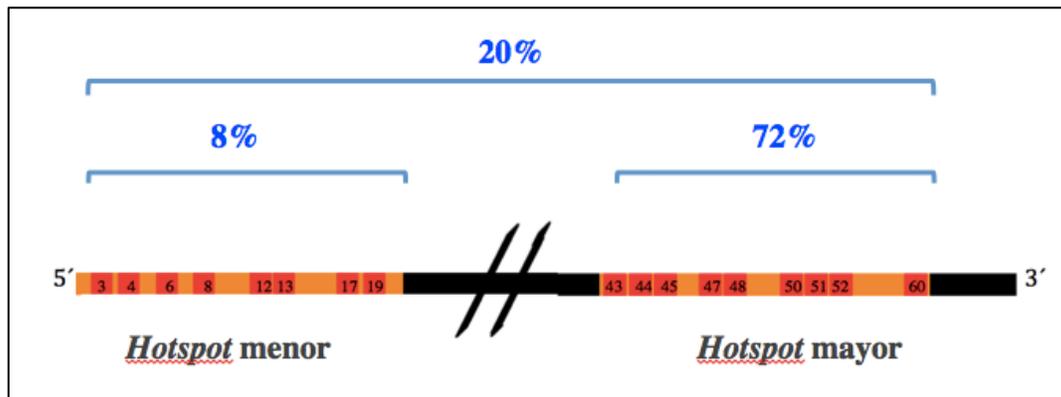


Figura 2. Frecuencia de afecciones en los *hotspots* mutacionales del gen *DMD* en la población de estudio.

Los datos demográficos y los elementos de la composición corporal se resumen en la

Tabla 1.

Tabla 1. Datos demográficos, composición corporal y frecuencia de eliminaciones en los *hotspots* del gen *DMD* en pacientes con distrofia muscular de Duchenne.

Variable	Mediana (mínimos y máximos)
Edad	8 (5-16)
Peso (kg)	24 (11-78.3)
z-Score	-1 (-3.6-0.4)
Grasa total (kg)	6.14 (0.879-46.08)
Grasa total (%)	26 (7.6-60)
Magro total (kg)	16.63 (10.68-33.22)
Vignos	3 (1-10)
Mutación	Número de pacientes (%)
<i>Hotspot</i> mayor	47 (72%)
<i>Hotspot</i> menor	5 (8%)
Ambos <i>hotspots</i>	13 (20%)

Observamos que la mediana de edad fue de 8 años y el peso fue de 24 kg. Referente a la composición corporal los datos muestran que el valor de la mediana de la masa grasa en kg fue 6.14 y en porcentaje de 26, estos datos muestran que en general los pacientes tienen una elevada adiposidad de acuerdo a la edad.

Sin embargo, es importante notar que de acuerdo a los parámetros para sobrepeso y obesidad de acuerdo al porcentaje de masa grasa para edad evaluado mediante DXA propuestos por Taylor *et. al.* [53], el elevado porcentaje de masa grasa refleja la presencia de sujetos con sobrepeso en 27.6%, de estos el 94% son menores de 12 años; mientras que el 40% son obesos de los cuales el 65% son menores de 12 años y el 35% mayores de 12 años (ver **Figura 3**).

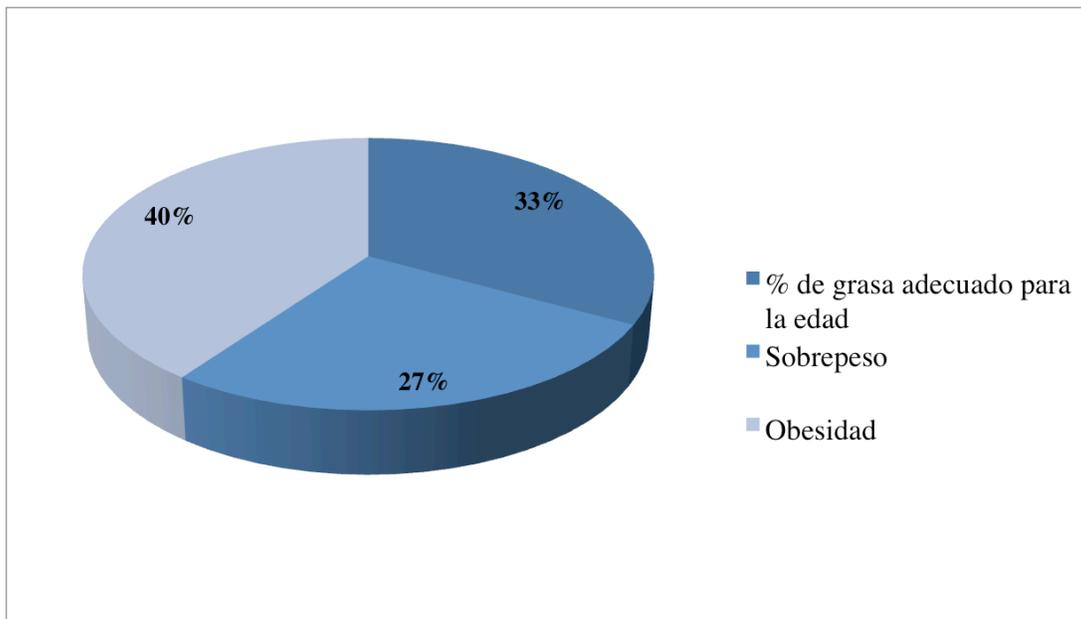


Figura 3. Proporción de pacientes con sobrepeso u obesidad de acuerdo al porcentaje de masa grasa para la edad evaluado por DXA.

El componente magro fue de 16.63 kg (10.68-33.22). La mediana del z-score de la DMO fue de -1; el 38.4% de la población mostró valores de z-score menores a -1; mientras el 12.3% de los pacientes mostró valores del z-score menores a -2 que de acuerdo a la

Sociedad Internacional de Densitometría Clínica (ISCD, por sus siglas en ingles) se considera bajo CMO (ver **Figura 4**) [54].

Finalmente la mediana de la calificación en la escala de capacidad motriz Vignos fue de 3, en donde la población de estudio mostró intervalos de la escala del 1-10.

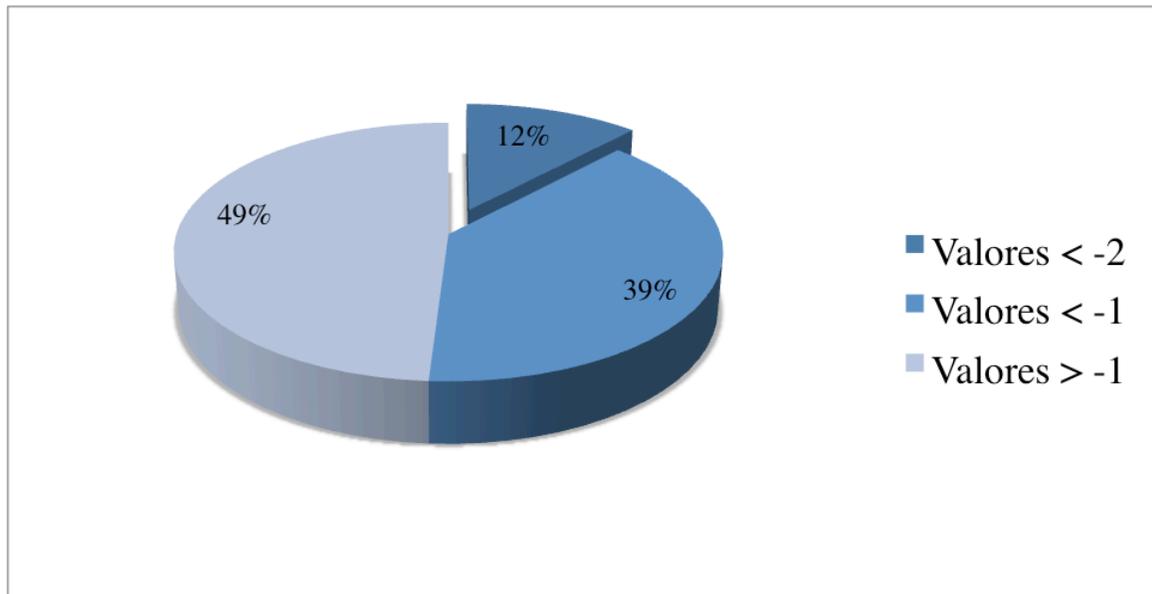


Figura 4. Valores de z-score entre la población de estudio.

Las diferencias entre los grupos de los *hotspots* son mostrados en la **Tabla 2**. Cuando se realizó una comparativa entre el *hotspot* mayor y el *hotspot* menor no existieron diferencias estadísticamente significativas en las variables analizadas. Sin embargo, es importante notar que en estos grupos no existen diferencias en las variables de peso y edad, lo cual los vuelve equiparables.

Al analizar las variables entre la afección del *hotspot* mayor y ambos *hotspots*, la edad ($p= 0.002$), el peso ($p= 0.032$), la masa magra ($p = 0.02$), masa grasa en g ($p = 0.05$) y CMO ($p = 0.03$) fueron mayores en los pacientes que presentaron mutaciones en el *hotspot* mayor. Igualmente la calificación de la escala Vignos tuvo mayor puntuación en el *hotspot* mayor (valor de $p= 0.02$) que cuando las eliminaciones incluyen ambos *hotspots*.

Por último, la comparativa entre el *hotspot* menor y ambos *hotspots*, las medianas del peso ($p = 0.05$), la grasa total en gramos ($p = 0.05$) y en porcentaje ($p = 0.03$), y la calificación Vignos ($p = 0.01$), fueron mayores en el grupo del *hotspot* menor comparado con la afección de ambos *hotspots*.

Tabla 2. Comparación entre las eliminaciones de los *hotspots* en el gen *DMD* con la composición corporal y escala de Vignos en pacientes con distrofia muscular de Duchenne.

Variable	<i>Hotspot</i> mayor (N = 47)	<i>Hotspot</i> menor (N = 5)	Ambos <i>hotspots</i> (N = 13)
Edad ¥	9 (5-16) ^a	12 (5-16) ^{a, b}	7 (5-8) ^b
Peso (kg) ¥	24.9 (11.9-78) ^a	37.4 (18.2-58.6) ^{a, c}	19.6 (15-32.6) ^b
Magro total (kg)	17.43 (10.68-33.22) ^a	16.30 (13.66-26.14) ^{a, b}	15.49 (13.11-19.24) ^b
Grasa total (kg) ¥	6.45 (0.87-46.08) ^a	20.28 (1.22-30.73) ^a	3.79 (1.28-12.62) ^b
CMO (g)	739.2 (355-1,719) ^a	784.5 (476-1,751) ^{a, b}	572 (409-884) ^b
Grasa total (%) ¥	26 (7.6-60) ^{a, b}	52 (10.8-55.4) ^a	18.8 (8.5-39.6) ^b
z-Score	-1 (-3.6-0.4) ^a	-1.6 (-2.4-0.1) ^a	-0.8 (-1.6-0.3) ^a
Vignos ¥	3 (1-10) ^a	8 (2-9) ^{a, c}	2 (1-5) ^b

¥ Valor de $p < 0.05$ Kruskal Wallis

^{a, b, c} Valor de $p < 0.05$ post hoc U de Mann Whitney

De acuerdo a los resultados obtenidos en la posible asociación entre el tipo de mutaciones y la capacidad motriz, se estratificó a la población en 3 grupos de acuerdo a la gravedad que mostraban en las siguientes categorías: 1-5 puntos marcha autosuficiente, 6-8 puntos marcha y motricidad con apoyo y 9-10 puntos en aquellos confinados a silla de ruedas, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en todas las variables analizadas (ver **Tabla 3**).

Tabla 3. Diferencias entre los componentes de la composición corporal estratificados por grupos según la escala de capacidad motora Vignos.

Escala Vignos	1-5 (N = 49)	6-8 (N = 7)	9-10 (N = 9)
Edad ¥	7 (5-13) ^a	10 (6-16) ^b	12 (11-16) ^c
Peso (kg) ¥	21.3 (11.9-51.52) ^a	34.6 (24-58.6) ^{b, c}	40(25.6-78.3) ^c
Magro total(kg) ¥	16.48 (10.68-33.22) ^a	17.47 (13.66-26.14) ^{a, b}	18.95 (13.65-30.70) ^b
Grasa total(kg) ¥	4.21 (0.87-23.06) ^a	14.04 (7.27-30.73) ^{b, c}	20.51 (11.37-46.08) ^c
CMO (g) ¥	669.8 (355-1,719) ^a	809.9 (583-1,751) ^{a, b}	1,008 (662.5-1,575.2) ^b
Grasa total(%) ¥	20.5 (7.6-50.6) ^a	41 (30-54) ^b	51.8 (43-60) ^c
z-Score ¥	-0.8 (-2.3-0.4) ^a	-1.3 (-2.4-0.1) ^{a, b}	-1.9 (-3.6 /-0.4) ^b
# Mutaciones ¥ H			
Hotspot mayor	35 (71%) ¹	5 (71%) ²	7 (78%) ²
Hotspot menor	1 (2%)	2 (29%)	2 (22%)
Ambos hotspots	13 (27%)		

¥ Valor de $p < 0.05$ Kruskal Wallis

^{a, b, c} Valor de $p < 0.05$ post hoc U de Mann Whitney

H ^{1, 2, 3} Valor de $p < 0.05$ post hoc Chi cuadrada lineal

La edad, el peso, la masa grasa en kg y en porcentaje, así como la afección de los *hotspots* son diferentes entre el primer y segundo grupo (calificación 1-5 vs. 6-8), todos los parámetros fueron mayores para este último grupo, exceptuando la afección de los *hotspots*, al parecer esta diferencia puede ser debida a que un porcentaje de pacientes muestran mayor afección del *hostpot* menor.

En una comparativa entre los grupos con calificación 1-5 y 9-10, se encontraron diferencias entre el peso, masa magra, grasa total en kg/porcentaje y CMO siendo mayores en el segundo grupo, así también mostrando diferencia en la afección de los *hotspots*, de la misma manera que la comparativa entre los primeros grupos la diferencia puede ser debida a que un mayor porcentaje de pacientes muestran afección del *hostpot* menor.

En la comparativa entre el grupo de marcha y motricidad con apoyo contra aquellos confinados a silla de ruedas, existió diferencias entre la edad, masa magra y el porcentaje de tejido graso.

Una vez estratificados los grupos de acuerdo a su capacidad motriz notamos que los mismos eran diferentes en relación a la edad por lo que se decidió estratificar por grupos de edad (5-10, 11-15 y 16-20 años) y valorar los parámetros de la composición corporal (ver *Tabla 4*).

Tabla 4. Diferencias entre los elementos de la composición corporal estratificados por grupos de edad.

Edad	5-10 (N = 50)	11-15 (N = 13)	16-20 (N = 2)
Peso (kg) ¥	21.5 (11.9-36.7) ^a	37.3 (25.6-78.3) ^b	55.9(53-58) ^b
Vignos ¥	2 (1-8) ^a	9 (2-10) ^b	8 (8-9) ^b
Magro total (kg) ¥	16.36 (10.68-21.61) ^a	20.86 (13.65-33.22) ^b	24.24 (22.24-26.24) ^b
Grasa total (kg) ¥	4.24 (0.879-15.50) ^a	17.11 (3.13-46.08) ^b	30.15 (29.56-30.73) ^c
CMO (g) ¥	660 (355-1,124) ^a	921 (662-1,719) ^b	1,528 (1,304-1,751) ^b
Grasa total (%) ¥	21 (7.6-45.8) ^a	49 (12.2-60) ^b	55.5 (54-57) ^b
z-Score ¥	-0.75 (-2.3-0.4) ^a	-1.7 (-2.9-0.1) ^b	-3 (-3.6 /-2.4) ^b
# Mutaciones ¥ ¶			
Hotspot mayor	35 (70%) ¹	11 (85%) ²	1 (50%) ^{2,3}
Hotspot menor	2 (4%)	2 (15%)	1 (50%)
Ambos hotspots	13 (26%)		

¥ Valor de $p < 0.05$ Kruskal Wallis

^{a, b, c} Valor de $p < 0.05$ post hoc U de Mann Whitney

¶ ^{1, 2, 3} Valor de $p < 0.05$ post hoc Chi cuadrada lineal

En los grupos de 5-10 y de 11 a 15 años apreciamos diferencias en todos los elementos de la composición corporal, así como la afección de los *hotspots*, siendo el grupo de mayor edad el que tiene valores mayores en todas las variables.

En una comparativa entre los grupos de edad de 5-10 contra los de 16-20 años, todos mostraron diferencias excepto la afección de los *hotspots*. La comparación entre el grupo de 10-15 años contra aquellos del grupo de 16 a 20 el sólo el componente graso en kg mostró diferencia.

Debido a la presencia de diferencias significativas cuando se realizó el análisis de correlación entre la estratificación de capacidad motriz y grupos de edad, se realizó un análisis de regresión lineal para predecir el comportamiento que tiene cada uno de los elementos de la composición corporal, se encontró que la edad es asociada positivamente al componente magro, masa grasa total y al contenido mineral óseo pero es negativa la relación con el z-Score ($p=0.0001$). Respecto a la escala de Vignos, se observa que ésta solo se asoció de manera negativa a la masa grasa total ($p=0.001$) (ver *tabla 5*).

Tabla 5. Análisis de regresión lineal del contenido magro total, grasa total, contenido mineral óseo y z-score.

Variable	Magro total		Grasa total		CMO		z-Score	
	R2	P	R2	P	R2	P	R2	P
Edad	0.9	0.0001	0.97	0.0001	0.9	0.0001	0.9	0.0001
Vignos	0.8	0.1	0.7	0.001	0.9	0.24	0.8	0.9
Mutaciones	0.4	0.8	0.3	0.39	0.5	0.4	0.3	0.14
Hotspots								

DISCUSIÓN

Las entidades con gran compromiso motriz muestran alteraciones en los elementos de la composición corporal. Particularmente las afecciones neuromusculares como la distrofia muscular de Duchenne se asocian a una alteración en los elementos de la composición corporal, donde el poco estímulo motriz provoca disminución de la masa muscular. Además, como consecuencia de esta baja actividad existe poca estimulación para llevar a cabo el depósito mineral a nivel óseo, generando una disminución del gasto calórico y un consecuente incremento del depósito de grasa [25, 28, 36, 37, 38]. Acorde a esto, nuestra población de estudio mostró sobrepeso en 27.6% y obesidad en 40%, siendo la población menor de 12 años la más afectada en un 94% y 65% respectivamente para cada grupo. Aunque nuestros resultados se alejan de lo descrito por Mok *et. al.* [45] quien ha demostrado que hasta el 54% de los pacientes con DMD desarrollan obesidad alrededor de los 13 años. Sin embargo, tomando en cuenta que el 77% de nuestra población es menor de 10 años, misma que no ha llevado corticoterapia, cobra relevancia describir que en la historia natural de la enfermedad de DMD de pacientes mexicanos la obesidad se encuentra presente desde etapas muy tempranas. Por otro lado, el 12.3% de los pacientes mostraron cifras del z-score por debajo de -2, lo cual es considerado como bajo CMO [54], lo cual se asocia con un riesgo incrementado de fracturas de huesos largos principalmente en la población que aún deambula [39, 55].

Desde el reconocimiento de las alteraciones en el gen *DMD* como causa del fenotipo de distrofia muscular de Duchenne, diversas teorías han tratado de explicar el comportamiento de las mutaciones y sus posibles efectos sobre el fenotipo. Una de las primeras teorías sobre el comportamiento mutacional fue la propuesta por Monaco *et al.*, [12] la cual se basa en la premisa de que existe una relación aparente del fenotipo con el comportamiento de la mutación: las eliminaciones, duplicaciones o mutaciones puntuales que irrumpen el marco de lectura, se encuentran asociadas a un fenotipo grave por falla en la producción del producto proteico (distrofina). Por el contrario toda aquella mutación (de cualquier tipo) que permita continuar el marco de lectura, podrá formar una proteína falta en alguna región, con duplicación de algún dominio o cambio en la

conformación estructural, pero que finalmente permitiría el mantenimiento de una función parcial del producto proteico y un fenotipo al parecer de menor gravedad. Sin embargo este comportamiento mutacional sólo se cumple en el 90% de los casos. [14, 56]

En nuestro estudio pretendimos evidenciar la existencia de diferencias en los elementos de la composición corporal dependiendo de si las eliminaciones afectaban uno o ambos *hotspots*, justificado en el supuesto de que estas zonas propensas a la pérdida de material genético codifican regiones que a nivel proteico cumplen una función importante para la interacción con otras proteínas.

Cuando se realizó una comparativa de las variables analizadas entre el *hotspot* mayor y el *hotspot* menor no existieron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.06$). Sin embargo, estos grupos son equiparables en cuanto peso y edad, mostrando que las alteraciones del *hotspot* menor muestran tendencias en mayor porcentaje de masa grasa y una calificación de la capacidad motriz con mayor deterioro, en una cohorte de 205 pacientes con DMD Magri et. al. [57].

Por otro lado, se encontró una disminución en el componente magro total del grupo de ambos *hotspots* afectados, comparado contra el grupo que sólo presenta afección en el *hotspot* mayor. Este mismo comportamiento se observa en el componente de la grasa total y el contenido mineral óseo, siendo menor en el grupo de ambos *hotspots*. Atribuimos que estas diferencias son esperadas en el componente magro total y el contenido mineral óseo, considerando que el grupo más afectado según nuestra hipótesis es el de aquellos sujetos que presentan mutaciones en ambos *hotspots*; esto pudiera estar relacionado a que la afección de ambos *hotspots* codifican tanto los dominios de fuerte interacción con actina en la región amino terminal (*hotspot* menor), así como también el dominio central interacciona con actina al parecer de una manera débil. Adicionalmente se ha descrito que los exones 42-45 (*hotspot* mayor) que codifican para los repetidos similares a la espectrina 16 y 17 son necesarios para que interaccione una sintetasa de óxido nítrico (NOS) que participa en la vasodilatación durante la actividad física para que se lleve a cabo una adecuada perfusión de las fibras musculares. La pérdida de los exones

codificantes de estos dominios se han asociado a mayor deterioro muscular en pacientes con DMD [11].

Si bien, el componente graso puede traducir sustitución del músculo estriado por tejido adiposo en manifestaciones graves de la enfermedad, nuestros resultados muestran un mayor nivel de contenido graso en el grupo de *hotspot* menor dado que la mediana de edad en este grupo es de 9 años comparada con 7 del grupo contrario. Sin embargo, es importante considerar que si bien la pubertad es retrasada en los pacientes con DMD, el paciente en edad pediátrica acumula más cantidad de grasa en las etapas previas al inicio de la pubertad [58]. Esta podría ser una de las razones por la cual el grupo de *hotspot* menor presenta mayor contenido graso en comparativa con el grupo de ambos *hotspots* afectados.

Es evidente la existencia de una diferencia entre la calificación de la capacidad motriz entre los 3 grupos, encontrando que los valores son menores en el grupo de sujetos con mutaciones en ambos *hotspots* en comparativa con los 2 grupos restantes. Esto no implica que el grupo con afección de ambos *hotspots* tenga una capacidad motriz con menor compromiso que aquellos con la afección única del *hotspot* mayor o menor; aunque el valor de p es significativo, el número de sujetos que integran este grupo (ambos *hotspots*) puede ocasionar un error tipo 1 ya que se no puede explicarse el comportamiento por la mutación sino por la edad y el grado de discapacidad, por lo que generalizar este comportamiento al resto de los sujetos puede ser inadecuado.

Advertimos que al realizar una estratificación de acuerdo a la calificación de capacidad motriz, encontramos resultados equiparables a lo descrito en la literatura [37]. Por ejemplo, Skalsky *et. al.*, [48] describieron en 23 pacientes con DMD evaluados mediante DXA, disminución del tejido magro, aumento del depósito graso y disminución en la fuerza en las extremidades. Todos estos datos demuestran que la menor capacidad motriz está asociada a las alteraciones en la composición corporal.

Adicionalmente, al estratificar a la población por grupos de edad se observa un comportamiento similar, evidenciando diferencias significativas con disminución del componente magro, mineral óseo y aumento de la grasa total conforme la edad incrementa. Confirmando una vez más que esto es el reflejo del deterioro de los elementos de la composición corporal en la DMD, el cual es más evidente conforme progresa la enfermedad [36].

Por esta razón, resulta imperioso confirmar si el comportamiento de los elementos de la composición corporal puede estar exclusivamente vinculado con las regiones alteradas en el gen *DMD*. Para tratar de responder este cuestionamiento el análisis de regresión lineal explica que hay una predicción del comportamiento de estos elementos directamente con la edad. Esto expone que probablemente la disminución de la masa muscular se deba propiamente al curso crónico de la enfermedad y no pueda ser explicado exclusivamente por la presencia de alteraciones en los *hotspots*. Por tal motivo, consideramos que a pesar de que existen diferencias significativas con el análisis delimitado a los grupos de mutaciones, la edad también parece correlacionar con el estado de los elementos de la composición corporal, de tal manera que no rechazamos las hipótesis nulas.

CONCLUSIONES

Nuestro estudio demuestra que en la historia natural de la DMD de pacientes mexicanos la obesidad se encuentra presente desde edades muy tempranas. Asimismo el 12.3% de estos pacientes muestra bajo contenido mineral óseo.

Se encontró una disminución en el componente magro total, grasa total y el contenido mineral óseo, siendo menor en el grupo de ambos *hotspots* afectados, comparado contra el grupo que sólo presenta afección en el *hotspot* menor.

La estratificación por grupos de acuerdo a la calificación de capacidad motriz, muestra que un mayor deterioro motor se encuentra asociado a alteraciones en los elementos de la composición corporal. Asimismo, el deterioro de estos elementos es más evidente conforme progresa la enfermedad.

LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

Consideramos que el este estudio muestra debilidades en su diseño para refutar la hipótesis nula. Debido a esto, podríamos sugerir la realización de un estudio de cohorte en el que se incluyan pacientes una vez que se advierta el inicio de las primeras manifestaciones motrices. Además, de realizar el diagnóstico molecular de manera temprana utilizando no solo PCR múltiple que solo detecta eliminaciones en ambos hotspots; también debe incluirse otras técnicas como el análisis de prueba de amplificación múltiple por ligación (MLPA, por sus siglas en inglés) el cual identifica eliminaciones y duplicaciones en todo el gen *DMD*. Todo lo anterior permitiría ponderar los cambios en función de los años de evolución. Una vez realizada la identificación precisa de una alteración en el gen *DMD*, se podrá evaluar en el mismo paciente la composición corporal y capacidad motriz durante el progreso de la enfermedad. Esta información permitirá valorar el tipo de mutaciones y su asociación con los cambios en la composición corporal, así como los elementos de la vitamina D, calcio, fosforo y dieta.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDADES	SEMESTRE 2012						SEMESTRE 2013					
	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun
Delimitación del tema a estudiar.												
Revisión de bibliografía												
Elaboración de protocolo												
Revisión por el comité local de investigación												
Recolección de la información												
Análisis de los resultados												
Redacción del informe final												
Examen de especialidad												

BIBLIOGRAFÍA

1. Prior W, Thomas and Bridgeman Scott J. Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne Muscular Dystrophy. *Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 7, no. 3 (2005) 317-326.
2. Laing Nigel G, Davis Mark D, Bayley Klair, Fletcher Sue and Wilton Steve D. Molecular Diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy: Past, Present and Future in Relation to Implementing Therapies. *Clin Biochem Rev* Vol. 32 (2011) 129-134.
3. Blake D, Weir A, Newey S and Davies K. Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle. *Physiol Rev* (2002) 82: 291–329.
4. Kalman L, Leonard J, Gerry N, Tarleton J, Bridges C, Gastier-Foster JM, Pyatt RE, Stonerock E, Johnson MA, Richards CS, Schrijver I, Ma T, Miller VR, Adadevoh Y, Furlong P, Beiswanger C, Toji L. Quality assurance for Duchenne and Becker muscular dystrophy genetic testing: development of a genomic DNA reference material panel. *JMD* March 2011, Vol. 13, No. 2.
5. Wilton SD, Fletcher S. Exon skipping and Duchenne muscular dystrophy: hope, hype and how feasible. *Neurol India*. 2008;56:254–262.
6. Muntoni F, Torelli S and Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* (2003); 2: 731–40.
7. Nelson SF, Crosbie RH, Miceli MC, Spencer MJ. Emerging genetic therapies to treat Duchenne muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol* 2009;22:532-8.
8. Rybakova IN, Amann KJ, Ervasti JM. A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J Cell Biol* 1996;135: 661– 672.
9. Rybakova IN, Humston JL, Sonnemann KJ, Ervasti JM. Dystrophin and utrophin bind actin through distinct modes of contact. *J Biol Chem* 2006;281:9996–10001.
10. Nicolas A, Lucchetti-Miganeh C, Yaou RB, Kaplan JC, Chelly J, Leturcq F, Barloy-Hubler F, Le Rumeur E. Assessment of the structural and functional impact of in-frame mutations of the DMD gene, using the tools included in the eDystrophin online database. *Orphanet J Rare Dis*. 2012 Jul 9;7:45. doi: 10.1186/1750-1172-7-42.
11. Lai Y, Thomas GD, Yue Y, Yang HT, Li D, Long C, et al. Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy. *J Clin Invest* 2009; 119: 624–35.
12. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. *An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus*. *Genomics* 1988;2:90-5.
13. Muntoni F, Gobbi P, Sewry C, Sherratt T, Taylor J, Sandhu SK, et al. Deletions in the 5' region of dystrophin and resulting phenotypes. *J Med Genet* 1994;31:843-7.
14. Aartsma-Rus A, van Deutekom JCT, Fokkema IF, van Ommen GB, den Dunnen JT (2006) Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy database: An overview of mutation types that and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 34: 135–44.
15. Schatzberg SJ, Anderson LV, Wilton SD, Kornegay JN, Mann CJ, Solomon GG, et al. *Alternative dystrophin gene transcripts in golden retriever muscular dystrophy*. *Muscle Nerve* 1998;21:991-8.
16. Sherratt TG, Vulliamey T, Dubowitz V, Sewry CA, Strong PN. Exon skipping and translation in patients with frameshift deletions in the dystrophin gene. *Am J Hum Genet* 1993;53:1007-15.
17. Lu QL, Morris GE, Wilton SD, Ly T, Artem'yeva OV, Strong P, et al. Massive idiosyncratic exon skipping corrects the nonsense mutation in dystrophic mouse muscle and produces functional revertant fibers by clonal expansion. *J Cell Biol* 2000; 148: 985–96.
18. Klein CJ, Covert DD, Bulman DE, Ray PN, Mendell JR, Burghes AH. Somatic reversion/suppression in Duchenne muscular dystrophy (DMD): evidence supporting a frame-restoring mechanism in rare dystrophin-positive fibers. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 950–9.
19. Arechavala-Gomez V, Kinali M, Feng L, Guglieri M, Edge G, Main M, et al. Revertant fibres and dystrophin traces in Duchenne muscular dystrophy: implication for clinical trials. *Neuromuscul Disord* 2010b; 20: 295–301.
20. Nicholson LV, Bushby KM, Johnson MA, den Dunnen JT, Ginjaar IB, van Ommen GJ. Predicted and observed sizes of dystrophin in some patients with gene deletions that disrupt the open reading frame. *J Med Genet* 1992; 29: 892-96.
21. Sherratt TG, Vulliamey T, Dubowitz V, Sewry CA, Strong PN. Exon skipping and translation in patients with frameshift deletions in the dystrophin gene. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 1007–15.

22. Prior TW, Bartolo C, Papp AC, et al. Dystrophin expression in a Duchenne muscular dystrophy patient with a frame shift deletion. *Neurology* 1997; **48**: 486–88.
23. Beggs AH, Koenig M, Boyce F, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990;86:45-8.
24. Vignos PJ Jr, Spencer GE Jr, Archibald KC. Management of progressive muscular dystrophy in childhood. *JAMA* 1963; 184: 89–96.
25. Mok E, Béghin L, Gachon P, et al. Estimating body composition in children with Duchenne muscular dystrophy: comparison of bioelectrical impedance analysis and skinfold-thickness measurement. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2006;83(1):65–69.
26. Kinali M, Arechavala-Gomez V, Cirak S, Glover A, Guglieri M, Feng L, et al. Muscle histology vs MRI in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*. 2011;76(4):346–353.
27. Nicolas A, Lucchetti-Miganeh C, Yaou RB, Kaplan JC, Chelly J, Leturcq F, Barloy-Hubler F, Le Rumeur E. Assessment of the structural and functional impact of in-frame mutations of the DMD gene, using the tools included in the eDystrophin online database. *Orphanet J Rare Dis*. 2012 Jul 9;7:45. doi: 10.1186/1750-1172-7-42.
28. Zanardi, M.C., Tagliabue, A., Orcesi, S., Berardinelli, A., Uggetti, C. & Pichiecchio, A. (2003) Body composition and energy expenditure in Duchenne muscular dystrophy. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57, 273–278.
29. Quinlivan R, Roper H, Davie M, Shaw NJ, McDonagh J y Bushby K. *Report of a Muscular Dystrophy Campaign funded workshop Birmingham, UK, January 16th 2004. Osteoporosis in Duchenne muscular dystrophy; its prevalence, treatment and prevention. Neuromuscular Disorders* 15 (2005) 72–79.
30. Vestergaard P, Glerup H, Steffensen BF, et al. Fracture risk in patients with Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *J Rehabil Med* 2001;33(4):150–5.
31. Pehler SR, Craft-Rosenberg M. *Longing: the lived experience of spirituality in adolescents with Duchenne muscular dystrophy. J Pediatr Nurs*. 2009 December ; 24(6): 481–494.
32. Bendixen RM, Senesac C, Lott DJ, Vandeborne K. *Participation and quality of life in children with Duchenne muscular dystrophy using the International Classification of Functioning, Disability, and Health*. *Health Qual Life Outcomes*. 2012 May 22;10(1):43.
33. Morandi, et al. Dystrophin characterization in BMD patients: correlation of abnormal protein with clinical phenotype. *Journal of the Neurological Sciences* 132 (1 995) 146-155.
34. Arrowsmith FE, Allen JR, Gaskin KJ, Gruca MA, Clarke SL, Briody JN, Howman-Giles RB, Somerville H, O'Loughlin EV. Reduced body protein in children with spastic quadriplegic cerebral palsy. *Am J Clin Nutr*. 2006 Mar;83(3):613-8.
35. Henderson RC, Berglund LM, May R, et al. The relationship between fractures and DXA measures of BMD in the distal femur of children and adolescents with cerebral palsy or muscular dystrophy. *J Bone Miner Res*. 2010;25:520–526.
36. Pichiecchio, A., Uggetti, C., Egitto, M.G., Berardinelli, A., Orcesi, S., Gorni, K.O.T., Zanardi, C. & Tagliabue, A. (2002) Quantitative MR evaluation of body composition in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Eur. Radiol.* 12, 2704–2709.
37. Palmieri GM, Bertorini TE, Griffin JW, Igarashi M, Karas JG. Assessment of whole body composition with dual energy x-ray absorptiometry in Duchenne muscular dystrophy: correlation of lean body mass with muscle function. *Muscle Nerve*. 1996 Jun;19(6):777-9.
38. Leroy-Willig, A., Willig, T.N., Henry-Feugeas, M.C., Frouin, V., Marinier, E., Boulter, A., Barzic, F., Schouman-Claeys, E. & Syrota, A. (1997) Body composition determined with MR in patients with Duchenne muscular dystrophy, spinal muscular atrophy, and normal subjects. *Magn. Reson. Imaging* 15, 737–744.
39. Quinlivan R, Roper H, Davie M, Shaw NJ, McDonagh J y Bushby K. *Report of a Muscular Dystrophy Campaign funded workshop Birmingham, UK, January 16th 2004. Osteoporosis in Duchenne muscular dystrophy; its prevalence, treatment and prevention. Neuromuscular Disorders* 15 (2005) 72–79.
40. Henwood, Maria and Bonkovitz, Larry. *Update on Pediatric Bone Health*. *JAOA*. Vol 109. No 1 (2009) 4-12.
41. McDonald DG, Kinali M, Gallagher AC, et al. *Fracture prevalence in Duchenne muscular dystrophy*. *Dev Med Child Neurol* 2002;44(10): 695–8.
42. Larson CM, Henderson RC. *Bone mineral density and fractures in boys with Duchenne muscular*

- dystrophy*. *J Pediatr Orthop* 2000;20: 71–4.
43. Söderpalm AC, Magnusson P, Ahlander AC, et al. *Low bone mineral density and decreased bone turnover in Duchenne muscular dystrophy*. *Neuromuscul Disord*. 2007;17:919–928.
 44. Ellis KJ, Shypailo RJ, Pratt JA, Pond WG: Accuracy of dual energy X-ray absorptiometry for body composition measurements in children. *Am J Clin Nutr* 1994;60:660–665.
 45. Manzoni P, Brambilla P, Pietrobelli A, Beccaria L, Bianchessi A, Mora S and Chiumello G. Influence of body composition on bone mineral content in children and adolescents. *Am J Clin Nutr*. 1996;64:603-7.
 46. Duren DL, Sherwood RJ, Czerwinski SA, et al. Body composition methods: comparisons and interpretation. *J Diabetes Sci Technol*. 2008;2(6):1139–1146.
 47. Andreoli A, Scalzo G, Masala S, Tarantino U, Guglielmi G (2009) Body composition assessment by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). *La Radiologia Medica* 114/2: 286–300.
 48. Skalsky AJ, Han JJ, Abresch RT, Shin CS, McDonald CM. Assessment of regional body composition with dual-energy X-ray absorptiometry in Duchenne muscular dystrophy: correlation of regional lean mass and quantitative strength. *Muscle Nerve*. 2009 May;39(5):647-51.
 49. Bianchi M L., Biggar D., Bushby K., Rogol A D., Rutter M M. and Tseng B. Endocrine Aspects of Duchenne Muscular Dystrophy. *Neuromuscular Disorders* 21 (2011) 298-303.
 50. Rosner, B. 2000. Sample Size estimation when testing for the mean of a normal distribution. In *Fundamentals of Bioestistics*. (pp 238-40) Fifth edition. Duxbury Thompson Learning.
 51. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html>
 52. Declaración de Helsinki 2000. http://www.inb.unam.mx/bioetica/documentos/declaracion_helsinki.pdf
 53. Taylor RW, Jones IE, Williams SM, Goulding A. Body fat percentages measured by dual-energy X-ray absorptiometry corresponding to recently recommended body mass index cutoffs for overweight and obesity in children and adolescents aged 3-18 y. *Am J Clin Nutr*. 2002 Dec;76(6):1416-21.
 54. <http://www.iscd.org/official-positions/2007-iscd-official-positions-pediatric/>
 55. Vestergaard P, Glerup H, Steffenson BF, et al. Fracture risk in patients with Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *J Rehabil Med* 2001;33(4):150–5.
 56. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 1989; **45**: 498–506.
 57. Magri F, Govoni A, D'Angelo MG, Del Bo R, Ghezzi S, Sandra G, Turconi AC, Sciacco M, Ciscato P, Bordoni A, Tedeschi S, Fortunato F, Lucchini V, Bonato S, Lamperti C, Coviello D, Torrente Y, Corti S, Moggio M, Bresolin N, Comi GP. Genotype and phenotype characterization in a large dystrophinopathic cohort with extended follow-up. *J Neurol*. 2011 Sep;258(9):1610-23.
 58. Taylor RW, Falorni A, Jones IE, Goulding A. Identifying adolescents with high percentage body fat: a comparison of BMI cutoffs using age and stage of pubertal development compared with BMI cutoffs using age alone. *Eur J Clin Nutr*. 2003 Jun;57(6):764-9.

ANEXO 1

Carta de Consentimiento Informado



México, D.F. a ____ de _____ del 20__.

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

Le invitamos a participar en un proyecto de investigación que tiene el objetivo de 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 ósea y se le tome una muestra de sangre (10mL). Se me ha informado que esta muestra se utilizará 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, matrícula y firma del investigador responsable:

Dra. Maricela Rodríguez Cruz 10949038 _____

Responsables: *Dra. Maricela Rodríguez Cruz, Dr. Miguel Ángel Ramírez García.*

Teléfono: 56276900, Extensiones: 22483, 21941 y 22409.

ANEXO 2

Hoja de Recolección de Datos

I. DATOS GENERALES

Nombre:

Fecha de nacimiento: (Día/Mes/Año)

Edad: años

Domicilio:

Teléfono:

Escolaridad:

Primaria
Licenciatura

Secundaria
Postgrado

Bachillerato

Origen:

Mexicano (especifique estado)

Extranjero (especificar)

Origen de los Padres

Padre

Mexicano (especificar estado) Extranjero (especificar) _____

Madre

Mexicano (especificar estado) Extranjero (especificar) _____

Abuelo Paterno

Mexicano (especificar estado) Extranjero (especificar) _____

Abuela Paterna

Mexicano (especificar estado) Extranjero (especificar) _____

Abuelo Materno

Mexicano (especificar estado) Extranjero (especificar) _____

Abuela Materna

Mexicano (especificar estado) Extranjero (especificar) _____

Escolaridad de los Padres

Madre

Primaria
Licenciatura

Secundaria
Postgrado

Bachillerato

Padre

Primaria
Licenciatura

Secundaria
Posgrado

Bachillerato

II. Antecedentes Heredo familiares:

	Vive? (Si/No)	Edad al Fallecimien	Causa Fallecimien	Diabetes (Si/No) tipo	C.isquémica	Nefropatía Diabética (Si/No)	Dislipidemia (Si/No)	Obesidad (Si/No)	Distrofia	Otros
Padre										
Madre										
Hermanos										
Otros										

III. ANTECEDENTES

Tipo de Distrofia _____

Edad de inicio de los síntomas _____

Edad al diagnóstico _____

Primer síntoma _____

Usa silla de ruedas si _____ no _____

A que edad dejo de caminar _____

Miembros inferiores:

Dificultad para subir escaleras _____
Levantarse de una silla _____
Levantarse de decúbito dorsal _____
Levantarse de cuclillas (Gowers) _____
Pararse de puntas _____
Caídas fáciles _____
Limitación del perímetro de la marcha _____

Miembros superiores:

Dificultad para levantarlos _____
Cargar cosas _____
Extenderlos (flexión) _____
Cerrar o abrir las manos _____
Abrir frascos de botellas _____

Debilidad de cuello no si, inicio _____
Visión doble (diplopia) no si, inicio _____
Alteración de movimientos faciales no si, inicio _____
Dificultad para deglutir (disfagia) no si, inicio _____
Dificultad para hablar (disartria) no si, inicio _____
Falta de aire (diseña) no si, inicio _____
Dolor muscular no si, inicio _____
Mioglobinuria (orina roja asociada o no a mialgias) no si, inicio _____
Calambres no si, inicio _____
Problema visual no si, inicio _____
Problema auditivo no si, inicio _____

Tratamiento (no) (si),
especificar _____

Rehabilitación (no) (si) y
tipo _____

Suplementos vitamínicos o PUFAs _____

Dosis, frecuencia, marca y desde hace cuanto
tiempo _____

Consumo de pescado u otros alimentos ricos en LC-PUFAs y
frecuencia _____

Antecedentes personales patológicos:

Hipertensión arterial
Enfermedades del corazón (especificar)

Enfermedades del riñón (especificar)
Enfermedad de la vesícula biliar (especificar)
Cirugías (especificar)
Otras (especificar)

Evaluación de la actividad física:

¿Practica alguna actividad? : Sí Cual? _____ No
Duración: Mínima/ Día veces por semana:

Obesidad:

Edad de inicio: años
Peso máximo: Kg. Edad a la que lo presento: Años
Peso hace un año: Kg.
Peso mas reciente: Kg.

Sobrepeso:

Exploración física:

Peso: Kg. _____
Talla: m _____
Circunferencia de la cintura: cm. _____
Circunferencia de la cadera: cm _____
Presión arterial (1ª medición): mmHg. _____
Presión arterial (2ª medición): mmHg. _____

¿Ha presentado una infección aguda en las últimas dos semanas? Sí No

¿Cuál?

ARBOL GENEALOGICO

