



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**CARRERA DE BIOLOGÍA
HOSPITAL 20 DE NOVIEMBRE**

Quantificación de la concentración sérica de MMP9, MMP2 y
TIMP1 en pacientes con Distrofia Muscular Duchenne
tratados con Deflazacort

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

PRESENTA:

FROYLAN ARTURO GARCÍA MARTÍNEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LUZ BERENICE LÓPEZ HERNÁNDEZ

ASESORA INTERNA: DRA. JUANA MONROY MORENO



MÉXICO, D.F., 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Agradecimientos

A mi familia, como una fuente de apoyo constante e incondicional en toda mi vida y más aún en mis más duros años de carrera profesional y en especial mi más grande agradecimiento a mis padres que sin su ayuda hubiera sido imposible culminar mi profesión.

A mis amigos que siempre estuvieron a mi lado para ayudarme, escucharme, aconsejarme y en muchas ocasiones guiarme.

A mi asesora de tesis la Dra. Juana Morroy Moreno que me enseñó tanto en la profesión así como por su apoyo en la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Guillermina Avila Ramírez por la orientación y ayuda que me brindo para el desarrollo eficiente de los ELISAs.

Al M. en C. Benjamín Gómez Díaz por brindarme material para la elaboración de la tesis.

Al departamento y grupo de trabajo de Biomédicas del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre.

Y más importante a mi directora de tesis la Dra. Luz Berenice López Hernández, me gustaría agradecer sinceramente por su dedicación y amistad que me permitieron aprender mucho más de lo estudiado en el proyecto. A su manera, ha sido capaz de ganarse mi admiración, así como sentirme en deuda con ella por todo lo recibido durante el periodo de tiempo que ha durado esta tesis.

Resumen

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad ligada al cromosoma X, caracterizada por debilidad y desgaste muscular progresivo, que finalmente conduce a la muerte. Hoy en día, el tratamiento con corticoides es el único capaz de retrasar la progresión de la enfermedad, y debido a la falta de biomarcadores en la DMD es de importancia establecer marcadores de fácil obtención como el suero sanguíneo, que reflejen el progreso de la patología. Las cuantificaciones de la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9), metaloproteinasa de matriz 2 (MMP2) y el inhibidor tisular de metaloproteinasas 1 (TIMP1) fueron medidas y seleccionadas por su papel en el proceso de degeneración/regeneración muscular, para determinar una posible correlación con las pruebas clínicas comúnmente utilizadas en la evaluación de la enfermedad. Las concentraciones de MMP9, MMP2 y TIMP1 fueron cuantificadas en muestras de suero sanguíneo de 16 pacientes diagnosticados con DMD previo al tratamiento con deflazacort, y así como 3 y 6 meses de tratamiento, además de 23 controles sanos mediante la prueba de ELISA. Las concentraciones de MMP9 fueron significativamente más altas en el suero de pacientes con DMD en comparación con los controles sanos, mientras que las concentraciones de MMP2 y TIMP1 no mostraron disimilitudes relevantes. La concentración sérica de MMP9 no resultó en diferencias significativas en los pacientes antes del tratamiento a los 3 y 6 meses con el corticoide. Por otro lado, el resultado de las pruebas cronometradas (como levantarse de una silla), refleja una tendencia a la mejoría clínica; sin embargo, no mostró relación con las concentraciones de ninguna de las proteínas estudiadas. A pesar de esto, MMP9 podría servir como marcador potencial para DMD en futuros ensayos clínicos para la evaluación de nuevos y mejores tratamientos que resulten en la disminución de la inflamación y, por tanto, en menos concentración de MMP9.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
ASPECTOS GENÉTICOS Y MOLECULARES DE LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE	6
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	8
DIAGNÓSTICO.....	9
TRATAMIENTO	11
RESPUESTA INFLAMATORIA Y FIBROSIS EN DMD	16
LAS METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ EN LA PROGRESIÓN DE LA DMD	17
JUSTIFICACIÓN	21
OBJETIVOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	22
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	23
CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.....	23
EXTRACCIÓN DE ADN SANGUÍNEO MEDIANTE EL MÉTODO DETERGENTES CATIÓNICOS	24
VERIFICACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE ADN	25
CUANTIFICACIÓN DEL ADN.....	26
IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES	27
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN SUERO	31
CUANTIFICACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE MMP9, MMP2 Y TIMP1	31
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
RESULTADOS	37
IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES	37
ANÁLISIS DE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE MMP9, MMP2 Y TIMP1	40
CONCENTRACIÓN SÉRICA DE MMP9 PRE Y POSTRATAMIENTO CON DEFLAZACORT	44
ANÁLISIS DE LAS ESCALAS FUNCIONALES Y PRUEBAS CRONOMETRADAS	45
CORRELACIONES ENTRE LAS ESCALAS FUNCIONALES Y LAS PRUEBAS CRONOMETRADAS CON LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE MMP9, MMP2 Y TIMP1 ASÍ COMO DE LAS MISMAS PROTEÍNAS	49
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	51
CONCLUSIONES	55
ANEXOS	57
ÍNDICE DE BARTHEL	57
ESCALAS DE FUNCIONALIDAD MOTORA BROOKE Y VIGNOS.....	59
ESCALA NORTHSTAR.....	60
PRUEBAS CRONOMETRADAS	62
GLOSARIO	63
BIBLIOGRAFÍA	64

INTRODUCCIÓN

Las distrofias musculares son un grupo de enfermedades de origen genético que se caracterizan por debilidad y desgaste muscular progresivo, provocadas por un déficit parcial o total de proteínas musculares (Montañez *et al.*, 2009).

Las distrofias musculares, como la de Duchenne (DMD) o su forma menos severa, la distrofia muscular de Becker (DMB), se caracterizan por un daño permanente del tejido muscular, que finalmente conlleva a la pérdida de tejido muscular y de la función muscular. Dentro de las distrofias musculares, la DMD y DMB son las distrofias más comunes y, por ende, las mejores conocidas desde el punto de vista clínico y genético en el mundo (Gomez-Diaz *et al.*, 2012).

La DMD y DMB son enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X. La DMD afecta 1 de cada 3,500 varones recién nacidos vivos, quienes presentan debilidad muscular progresiva que inicia por los músculos de la pelvis y proximales de las piernas (Figura 1), y después afecta el resto del cuerpo, con un pronóstico no mayor de tres décadas de vida (Biggar, 2006).

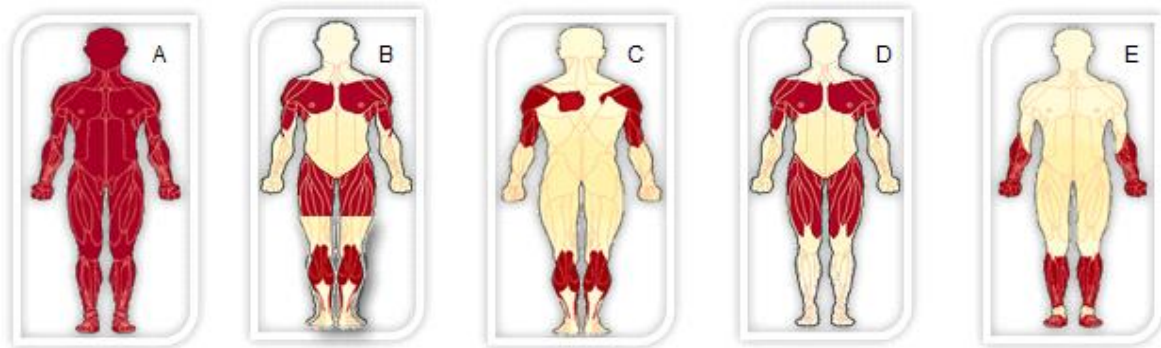


Figura 1. Distribución de los músculos afectados en algunas distrofias musculares. En la distrofia muscular congénita se afectan todos los músculos (A), mientras que en otras distrofias musculares solo se afectan las extremidades. La DMD/BMD muestra afectación de músculos tanto proximales como distales (B) (Modificado de <http://mda.org/>).

Aspectos genéticos y moleculares de la distrofia muscular de Duchenne

Después de que se identificó el gen DMD en 1987, se estableció que la enfermedad en los niños se debe a la ausencia o deficiencia de la proteína distrofina, la cual es transcrita por el gen DMD. El gen DMD es uno de los más extensos en el genoma humano, con aproximadamente 2.2 millones de pares de bases, agrupados en 79 exones, ubicado en el cromosoma X en la región Xp21 (Montañez *et al.*, 2009).

En los pacientes con DMD la función de la distrofina se pierde completamente debido a mutaciones que interrumpen el marco de lectura de la proteína y generan proteínas truncas. En contraparte, los pacientes con DMB presentan disminución de distrofina o presentan mutaciones que no alteran el marco de lectura de la proteína y generan distrofinas cortas pero funcionales (Scheuerbrandt, 2013).

La expresión del gen DMD es dirigida por 8 promotores que regulan el funcionamiento transcripcional. Siete de estos promotores codifican para transcritos específicos, de los cuales cuatro promotores se localizan en el extremo 5' del gen y regulan la expresión de la distrofina de longitud completa que se encuentra en todas las células musculares con altos niveles de expresión en músculo esquelético y en cardiomiocitos. Los otros cuatro promotores están dispuestos hacia el extremo 3' del gen, que codifican para isoformas más cortas (Montañez *et al.*, 2009).

Los pacientes que desarrollan la DMD presentan pérdida completa de la función de la distrofina. Los defectos moleculares más comunes en el gen de la DMD son la delección de uno o más exones, presente en el 72% de los casos; las duplicaciones, en el 7%; las mutaciones puntuales, en el 20%, y el 1% lo causan las mutaciones raras como las que perturban los sitios de empalme o reordenan gran parte de la estructura del gen (Aartsma-Rus *et al.*, 2006).

La distrofina está ubicada en el interior del músculo y participa en el proceso de estabilidad mecánica, debido a su interacción con el citoesqueleto celular y de las proteínas de la membrana, formando una especie de puente entre la fibra muscular y la matriz extracelular (MEC). La distrofina organiza la complicada

estructura del complejo distrofina-glicoproteínas y la ubicación de muchas otras proteínas (Figura 2) (Montañez *et al.*, 2009).

La parte central de la distrofina, dominio de varilla, consta de cadenas de aminoácidos enroscadas que se doblan sobre sí mismas varias veces; de este modo, el movimiento de contracción de la célula muscular fuerza a la proteína distrofina a cambiar su longitud y su estructura, funcionando así como un amortiguador que evita que se sobre estrese el músculo (Scheuerbrandt, 2013).

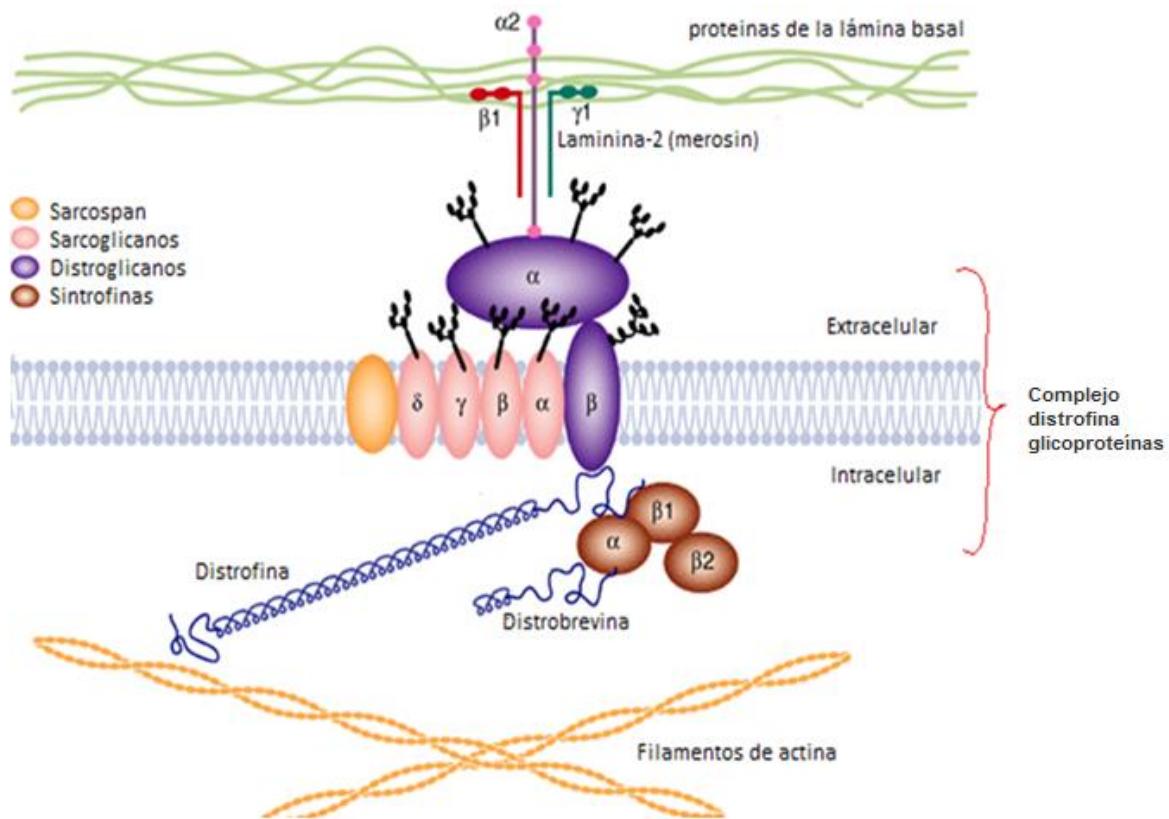


Figura 2. Complejo distrofina-glicoproteínas. Uno de los extremos de la distrofina, el dominio carboxilo terminal, interactúa con un grupo de otras proteínas del sarcolema de la célula muscular, conocido como el complejo distrofina-glicoproteínas, y el otro extremo, el dominio amino terminal, contiene módulos de unión que se conectan a las estructuras contráctiles, filamentos de actina. Este complejo le confiere estabilidad a la membrana, en los procesos de contracción y relajación muscular (Scheuerbrandt, 2013).

Cuando los efectos de organización y protección faltan en la fibra muscular, la contracción provoca que las células se dañen más fácil y frecuentemente. Las consecuencias son una cadena de eventos, como la inflamación y la activación de

fibroblastos que conducen a la fibrosis, tejido cicatrizante que retrasa la regeneración muscular y causa los típicos síntomas de los pacientes con DMD (Mauro, 1961).

Características clínicas

Debido a lo anterior, los pacientes con DMD presentan pérdida de la función muscular, principalmente del músculo esquelético y cardíaco. Los músculos se ven afectados desde el nacimiento, sin embargo, los síntomas de debilidad en los músculos proximales se manifiestan entre los tres y cinco años de edad, con trastornos en la marcha, caídas frecuentes y dificultad para elevar los brazos, así como hipertrofia de la pantorrilla debido a una sustitución de las fibras musculares por tejido conectivo y grasa. El primer grupo muscular afectado es el de la cintura pélvica, seguido por los de la cintura escapular y las pantorrillas. Dichas afecciones se reflejan en el niño con dificultades para caminar en superficies irregulares, un andar lento y se incorpora desde el suelo con dificultad, movimiento conocido como maniobra de Gower's (Figura 3). Las características clínicas más importantes son la marcha en puntas y pseudo-hipertrofia de gemelos, complicando las actividades como saltar, subir escaleras, entre otras (Biggar, 2006; Coral *et al.*, 2010).



Figura 3. Movimientos característicos de un paciente con distrofia muscular. Se observa la maniobra de Gower's, en la que el paciente escala sobre su propio cuerpo para ponerse de pie (www.netterimages.com/image/7518.htm).

Los pacientes entre los 8 y 12 años de edad pierden por completo la capacidad de caminar; el 90% desarrolla una curvatura de la columna en más de 20 grados y se requiere una cirugía para estabilizarla. Al llegar a la adolescencia, la función de las extremidades superiores se deteriora y los niños pierden la capacidad de alimentarse y cuidarse por sí mismos. Entre los 9 y 11 años, la función pulmonar se deteriora disminuyendo la capacidad vital en un 3 a 10%, la tos debilita al paciente y se pierde la capacidad para eliminar las secreciones respiratorias. Comúnmente se presenta neumonía, que es la principal causa de muerte, y por lo regular es necesaria la asistencia respiratoria por la noche, debido a la hipoventilación nocturna (Biggar. 2006; Lopez *et al.*, 2009).

Los pacientes con DMD presentan complicaciones a lo largo de la vida, como contracturas, escoliosis, enfermedad pulmonar, cardiomiopatía, complicaciones gastrointestinales, nutricionales, deficiencias cognitivas y alteraciones en la retina (Coral *et al.*, 2010).

Diagnóstico

El diagnóstico de la distrofia muscular de Duchenne se establece primordialmente después de la evaluación clínica de acuerdo con las características distintivas de la enfermedad; sin embargo, existen otros factores que son considerados para el diagnóstico de DMD: la concentración sérica de creatina cinasa (CK), biopsia de musculo, MLPA, así como PCR en tiempo real.

El incremento en la concentración de CK marca una señal temprana de la enfermedad. Este parámetro se utiliza con mayor frecuencia en el diagnóstico por el laboratorio clínico (Lopez *et al.*, 2009; Carmeli *et al.*, 2004). En la biopsia muscular se observan células musculares con alteraciones distróficas, como núcleos centrales y presencia de infiltrado fibroso, que evidencian la pérdida de la forma poligonal en el corte transversal (Gomez-Diaz, *et al.*, 2012). Cuando se realiza la tinción inmuno-histoquímica, o la inmuno-fluorescencia indirecta, se

observa la deficiencia o ausencia de la distrofina, dístroglicanos, sarcospan o sarcoglicanos. Aun así deben realizarse estas técnicas en conjunto con otras pruebas como amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación (MLPA), reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR TR) de ADN genómico para la identificación de las mutaciones (Bushby *et al.*, 2010; Lopez *et al.*, 2011).

La red de investigación, seguimiento y vigilancia de distrofia muscular (MD STARnet) utiliza la extracción del expediente médico para identificar a los pacientes con DMD/DMB. Si los miembros del comité son discordantes en la asignación de una categoría de caso, el caso es revisado y discutido al menos por 4 miembros. El caso es asignado a la categoría acordada, con "definitivo" el más alto nivel de confianza, seguido de "probable", y "posible" como la más baja (Cuadro 1) (Mathews *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Criterios para diagnosticar la DMD (Mathews *et al.*, 2010).

Definitivo	<p>Un caso "definitivo" presentó los síntomas clínicos atribuibles a una distrofinopatía y el apoyo directo del diagnóstico por lo menos de uno de estos criterios:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. El análisis de ADN demostró una mutación del gen distrofia. 2. La biopsia de músculo presenta anomalías en la distrofina, y por tanto se requiere el estudio de proteínas adicionales, así como las fibras musculares. Si hay antecedentes familiares que demuestran la herencia ligada al cromosoma X, no se requiere información adicional sobre el músculo. 3. Altas concentraciones de CK, y un miembro de la familia que cumpla con los criterios 1 o 2.
Probable	<p>-Tiene concentraciones elevadas de CK, más antecedentes familiares, o alteraciones en la distrofina, pero carece del resto de los elementos.</p>

Possible	-Altas concentraciones de CK y ninguna información adicional.
----------	---

Tratamiento

Se han desarrollado diversas líneas de investigación con el objeto de revertir el daño de DMD/DMB, como el trasplante de mioblastos, transferencia de células madre, la inyección de ADN desnudo en las fibras musculares, y la terapia génica empleando vehículos virales o no virales para reemplazar o reparar el marco de lectura del gen DMD. En el manejo farmacológico de los pacientes con DMD se ha incluido la administración de corticoides (Montañez *et al.*, 2009).

Como se sabe hasta el momento, no existe cura para la DMD. A pesar de esto, los avances en el manejo multidisciplinario del paciente con DMD han llevado a establecer estándares de tratamiento (Bushby *et al.*, 2010). Entre las principales estrategias que se han implementado para retrasar el progreso de la enfermedad está la administración de glucocorticoides (Manzur *et al.*, 2008). Conjunto a esta medida se realiza fisioterapia, así como el tratamiento quirúrgico cuando se requiera realizar la corrección de contracturas, con el objeto de prolongar la marcha independiente. También se utiliza dicho procedimiento para prevenir escoliosis que se presenta frecuentemente en el paciente con DMD y los lleva a estar confinados a una silla de ruedas (Lopez *et al.*, 2009).

El uso de glucocorticoides es el único tratamiento farmacológico paliativo capaz de retrasar la progresión de la enfermedad; sin embargo, también hay efectos no deseados (Manzur *et al.*, 2008). Entre los glucocorticoides empleados en el tratamiento paliativo de la DMD está la prednisona, prednisolona y deflazacort, ya que se ha mostrado que dichos fármacos prolongan la ambulación independiente, mejoran la función pulmonar, retrasan la aparición de las cardiomiopatías y reducen la incidencia de la escoliosis (Moxley *et al.*, 2010). En algunos estudios clínicos se ha reportado que la administración de glucocorticoides en etapas tempranas de la enfermedad (cuando aún se encuentran en la etapa de la deambulación, antes de los 7 años de edad) incrementa la fuerza muscular, así como la calidad de vida del paciente (Coral *et al.*, 2010; Mazzone *et al.*, 2013).

La decisión de emplear esteroides debe consultarse ampliamente con los padres o tutores de cada paciente. El principal requerimiento es que el caso cuente con diagnóstico definitivo. El glucocorticoide más utilizado en el tratamiento de la DMD es el deflazacort, derivado de oxazolina de la prednisolona con actividad anti-inflamatoria e inmunosupresor. Bushby *et al.*, 2010 y McAdam *et al.*, 2012 reportan que para niños de 7 a 9 años con DMD el tratamiento es de 0.9 mg/kg por día de deflazacort. Por tres años resulta en un incremento en los años de deambulaci3n independiente, preserva la funci3n cardiaca y respiratoria, disminuye la incidencia de escoliosis e incrementa la supervivencia.

Markham y Bryson (1995) reportan que el uso frecuente de glucocorticoides produce efectos secundarios, como aumento de peso corporal, desarrollo de la osteopenia, intolerancia a la glucosa, el retraso en el crecimiento y la formaci3n de cataratas. En comparaci3n con la prednisona, el deflazacort ha demostrado que en otras enfermedades los efectos secundarios son m3s sutiles y que incluyen una mejor conservaci3n de la masa 3sea, un menor aumento de peso, un mejor perfil de l3pidos y menos intolerancia a la glucosa (Mott y Werb, 2004).

En el caso de que los efectos secundarios se vuelvan intolerables, se recomienda disminuir la dosis en un 25-33%, y revalorar al paciente en un lapso de un mes. Si a pesar de esto no hay disminuci3n de los efectos y s3ntomas, reduce a3n m3s la dosis administrada o se cambia el esquema de administraci3n en d3as alternos. Y si contin3an las complicaciones, se interrumpe la terapia gradualmente, independientemente del estado funcional motor del paciente (Bushby *et al.*, 2010).

Los glucocorticoides transducen sus acciones mediante la uni3n al receptor de glucocorticoides (GR). El complejo ligando/GR desencadena su translocaci3n al n3cleo donde interact3a con secuencias espec3ficas de ADN, llamadas elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) de la siguiente manera; el ligando/GR se une a elementos de respuesta a glucocorticoides simples (GRES), de esta manera puede mediar la transactivaci3n de genes, mediante el reclutamiento de coactivadores y complejos de remodelaci3n de la cromatina; otra manera es mediante GRE de inmovilizaci3n, en el cual no hay uni3n del complejo ligando/GR

al ADN, sino que los GRE de inmovilización reclutan otros factores de transcripción, que a su vez son dirigidos negativamente por el ligando/GR; también se sabe que el ligando/GR se une a secuencias específicas invertidas, llamadas GRE negativos (nGRE), ocasionando el reclutamiento de correpresores que a su vez reclutan histonas deacetilasas, de esta manera ejercen la represión de genes (Figura 4). Además, se sabe que los glucocorticoides también pueden ejercer sus acciones mediante un mecanismo de señalización más rápido, al unirse con GR pero sin acción genómica (Kadmiel y Cidlowski, 2013).

La evidencia reflejada en diversos estudios sugiere que la subactividad de transactivación se asocia más con los efectos secundarios, mientras que la transrepresión se asocia con la eficacia clínica, debido a la actividad anti-inflamatoria (Hoffman *et al.*, 2012).

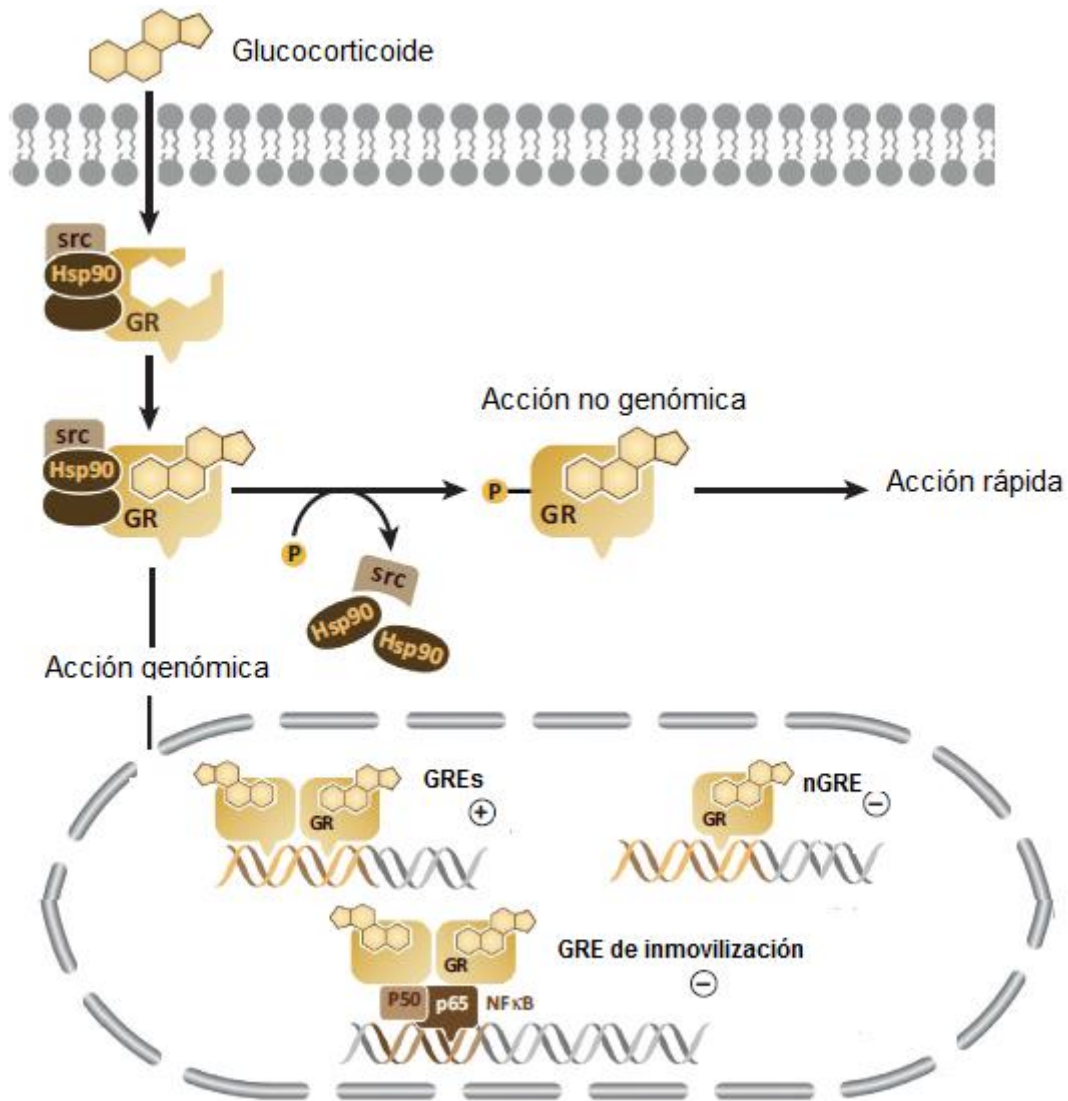


Figura 4. Acción molecular de los glucocorticoides. Los glucocorticoides ingresan al interior de la célula gracias a su naturaleza lipófila, una vez dentro, se une al GR formando un complejo ligando/GR, que a su vez sufre cambios conformacionales debido a una hiperfosforilación, de esta manera se transloca al núcleo, donde puede ejercer sus mecanismos genómicos. Los glucocorticoides también pueden ejercer sus acciones, mediante un mecanismo de señalización más rápido no genómico, mediante la unión del glucocorticoide con GR libre en el citoplasma o GR anclado a la membrana (modificado de Kadmiel y Cidlowski, 2013).

Las valoraciones subsecuentes permitirán evaluar la respuesta al tratamiento y, con ello, la toma de decisiones sobre su continuación o suspensión, basada en la estimación de los riesgos y beneficios. Las evaluaciones de rehabilitación se recomiendan cada seis meses; sin embargo, cuando se está iniciando un programa de esteroides, es deseable que sean cada cuatro meses. Asimismo, la densitometría ósea y radiografías deberán ser anuales (Vázquez *et al.*, 2013). El rehabilitador deberá hacer las pruebas pertinentes que permitan valorar el estado funcional, como la fuerza muscular, la amplitud del movimiento, la postura, así como la marcha de cada paciente; para ello los expertos recomiendan utilizar varias escalas funcionales como la evaluación ambulatoria estrella del norte (*North Star Ambulatory Assessment, NSAA*), Brooke, Vignos, índice de Barthel y pruebas cronometradas (Cuadro 2) (Bushby *et al.*, 2010).

Cuadro 2. Escalas funcionales y pruebas cronometradas utilizadas para la evaluación periódica de la evolución de la enfermedad.

Método	Objetivo de las pruebas	Pruebas
Pruebas cronometradas Uso normalizado de la prueba en función del tiempo.	Medida fácil y relevante del estado funcional diario, sensible a los cambios.	Tiempo 10 metros caminando, maniobra de Gower's, tiempo en subir 4 escalones, tiempo en levantarse de una silla, 6 minutos caminando y tiempo para ponerse una camiseta.
Escalas funcionales Evaluación de la función motora en dominios específicos para dar una puntuación compuesta.	Permite el seguimiento de la progresión y la respuesta a la terapia.	Vignos para miembros inferiores, Brooke para miembros superiores, NSAA e índice de Barthel.

Como se mencionó anteriormente, la CK es el marcador en suero utilizado para el diagnóstico de la DMD, pero desafortunadamente esta no puede ser tomada como biomarcador para monitorear la progresión de la enfermedad, ya que la concentración de CK varía en gran medida día con día, debido a que se ven influenciada por la actividad del paciente, además de que hay una gran

disminución en etapas avanzadas debido a la pérdida importante del tejido muscular (Zatz *et al.*, 1991).

Por tanto, el esfuerzo en establecer biomarcadores es particularmente importante para el seguimiento de la progresión de la enfermedad y la eficacia terapéutica, donde el tamaño de la cohorte es pequeño y fenotipos clínicos pueden ser muy variables, como la DMD (Martin *et al.*, 2014). A falta de biomarcadores moleculares, la prueba de los 6 minutos caminando es una medida clínica comúnmente utilizada para evaluar la progresión de la enfermedad en los niños, así como para evaluar un efecto terapéutico en los ensayos clínicos en la DMD (McDonald *et al.*, 2013).

Respuesta inflamatoria y fibrosis en DMD

El primer evento después de daño muscular es la liberación de citocinas y factores de crecimiento de los tejidos dañados. Estos factores estimulan la infiltración de células inflamatorias en el sitio de lesión, mediando la proliferación y supervivencia celular. En el caso de los humanos, la reparación normal de los músculos después de una lesión aguda. Las fibras muertas o dañadas son eliminadas en primer instancia por estas células inflamatorias, y luego son reemplazadas o reparadas por células madre residentes del tejido muscular conocidas como células satélite (Tidball, 2005).

Las principales células inflamatorias presentes en el músculo lesionado son los monocitos y los macrófagos (Tidball, 2005). Los macrófagos residentes y periféricos son importantes en las primeras etapas de la reparación del músculo después de una lesión aguda, ya que macrófagos pro-inflamatorios actúan en primera instancia para borrar el daño, y los macrófagos anti-inflamatorios en conjunto con macrófagos activos están implicados en la posterior reanudación de la inflamación, deposición de la matriz extracelular (Proano *et al.*, 2011) y reparación del tejido. Los macrófagos liberan citocinas anti-inflamatorias y moléculas pro-fibróticas, tales como factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), que a su vez activan los fibroblastos en una manera regulada para producir componentes de MEC temporales y factores de remodelación, incluyendo

la producción autocrina de TGF- β , colágeno, fibronectina, serín proteasas y metaloproteinasas (MMPs) y sus inhibidores tisulares (TIMPs), con el fin de estabilizar el tejido para nuevas fibras musculares (Mann *et al.*, 2011).

Sin embargo, durante el daño tisular crónico, como en DMD, la persistente presencia de macrófagos modifica la intensidad, la duración y las interacciones de estos factores liberados, lo que lleva a la acumulación excesiva de MEC, que finalmente conducirá a fibrosis en lugar de nuevo tejido muscular. Debido a que las células inflamatorias segregan señales de péptidos, hacen que las células satélites se diferencien hacia fibroblastos en lugar de células formadoras de músculo. Los fibroblastos también emiten señales de péptidos, que sostienen y aumentan la formación de fibrosis; esto crea un círculo vicioso en el que se forma más y más fibrosis, mientras que la reparación del músculo ocurre cada vez menos. Mientras se mantenga el daño del tejido muscular, la mayoría de las fibras musculares serán reemplazadas, con el tiempo, por tejido fibrótico, llevando a la pérdida de la función muscular (Scheuerbrandt, 2013; Mann *et al.*, 2011). El exceso de MEC y la persistencia de células inflamatorias sugieren un aumento de las MMPs, así como de sus inhibidores las TIMPs, encargados de la remodelación de MEC.

Las metaloproteinasas de la matriz en la progresión de la DMD

La reparación eficiente del músculo requiere de moléculas que regulen la degradación proteolítica de la MEC. Estas moléculas incluyen una gran familia de MMPs. Estas proteasas se sintetizan como pro-enzimas y son secretadas transmembrana por células locales (macrófagos, monocitos, fibroblastos, células epiteliales, endoteliales y vasculares); después se procesan en una forma activa por la eliminación de un propéptido amino terminal (Vu y Werb, 2000). Las MMPs son inactivadas por inhibidores tisulares de metaloproteinasas TIMPs. El equilibrio entre las MMPs y TIMPs es importante en el mantenimiento de la integridad del tejido (Chen y Li, 2009).

Las MMPs pueden ser liberadas por el músculo dañado, así como por células pro-inflamatorias, procesando componentes de la MEC, con el fin de la infiltración

celular hacia la fibra muscular, facilitando de este modo el reclutamiento miogénico, inflamatorio, vascular y de células fibroblásticas al tejido dañado (Figura 5). La función de las MMPs es regulada por la expresión del músculo dañado, así como por células inflamatorias y sus inhibidores los TIMPs (Visse y Nagase, 2003).

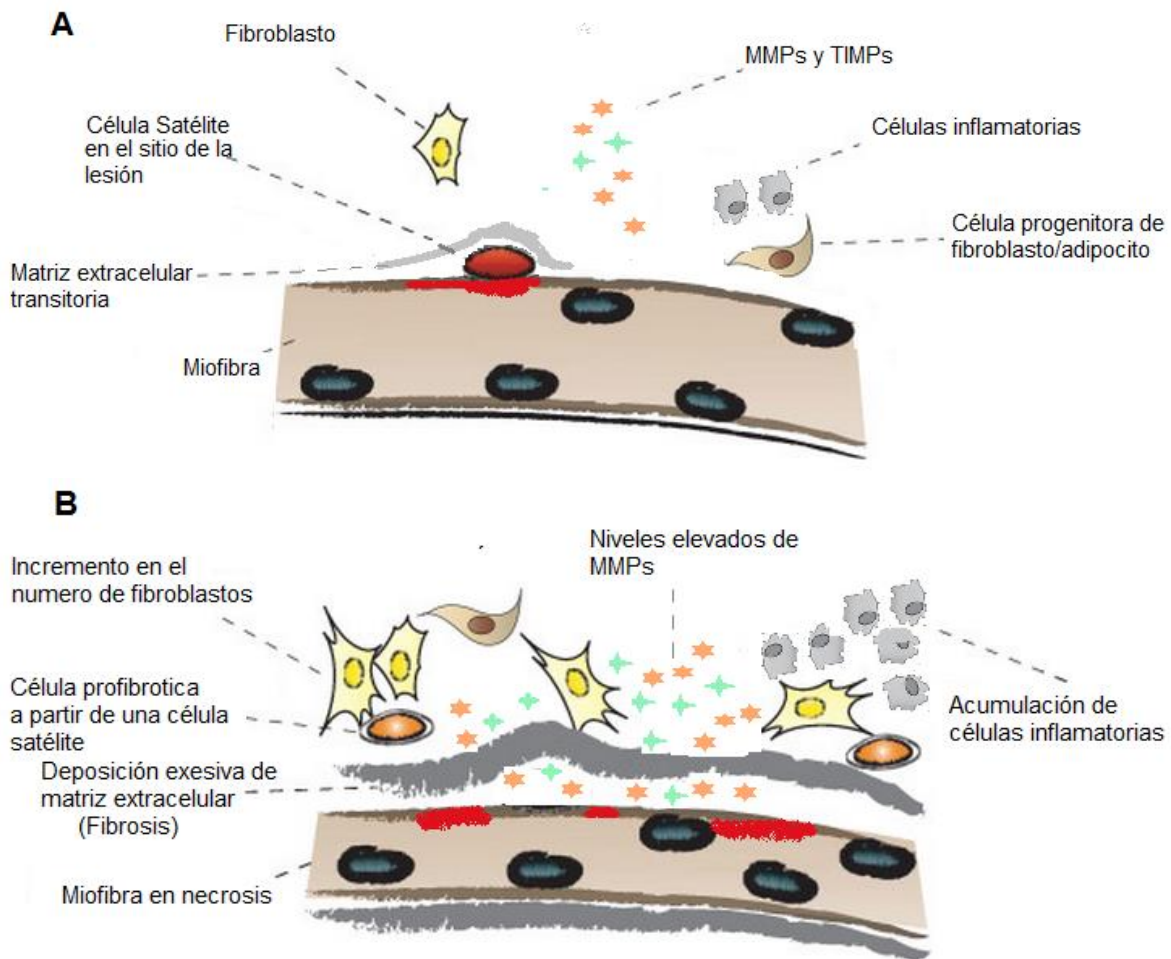


Figura 5. Los procesos de degeneración/ regeneración muscular difieren del tipo de daño. A) En un daño agudo, por ejemplo, después del ejercicio, las células inflamatorias son activadas con el fin de eliminar residuos, haciendo espacio para las nuevas fibras musculares; mientras tanto, el espacio es cubierto por deposición de MEC por parte de los fibroblastos. Las células satélite migran y comienzan a dividirse para fusionarse con las miofibras dañadas. B) En el caso del daño crónico, como sucede con los músculos distroficis, hay una respuesta inflamatoria continua que lleva a la acumulación de células inflamatorias, formación de más fibroblastos a partir de las células satélite que finalmente conduce a la fibrosis (MEC excesiva), lo que llevaría a concentraciones elevadas de metaloproteinasas. Por otra parte, la reparación del músculo ocurrirá cada vez menos y, con el tiempo, será reemplazado por tejido fibrótico, y la función muscular se perderá (modificado de Mann et al., 2011).

La remodelación y el mantenimiento de la MEC son esenciales para una amplia gama de tejidos normales y patológicos. Las MMPs actúan proteolíticamente por la liberación de factores de crecimiento y citosinas en la MEC, que estimulan y activan las células miogénicas durante el proceso de regeneración en experimentos *in vitro* como *in vivo* (Allen *et al.*, 1995; Tatsumi *et al.*, 1998).

En diversos estudios se ha mostrado que la MMP2 y MMP9 tienen un papel esencial en la migración de células satélite del músculo esquelético y en la diferenciación de células musculares, debido a que son las principales involucradas en la degradación de la gelatina, además de diversos componentes de la MEC, como el colágeno tipo I, II, III, IV, V, la elastina, los proteoglicanos y fibronectina. Por otra parte, el aumento de TIMP1, el inhibidor natural de MMP9, podría mediar la disminución de su actividad y, por tanto, de la acumulación de MEC y tejido fibroso en el músculo dañado (Birkedal-Hansen., 1995; Zimowska *et al.*, 2008; Kherif *et al.*, 1999).

A pesar de que estas metaloproteinasas tienen una especificidad en sustratos similares, la expresión de MMP2 y MMP9 parece estar regulada diferencialmente por diversas citocinas y quimiocinas producidas por los músculos en degeneración y macrófagos activados (Mauviel, 1993; Robertson *et al.*, 1993).

La MMP9 se localiza en las células inflamatorias, como leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y eosinófilos, mientras que MMP2 es secretada por macrófagos y fibroblastos adyacentes a las fibras regeneradas del endomisio (Carmeli *et al.*, 2004). La actividad de MMP2 está relacionada con la regeneración de nuevas miofibras debido probablemente por la degradación de colágeno de tipo IV de la membrana basal, que promueve así el desprendimiento de las células satélite, para proliferación, migración y fusión posterior (Kherif *et al.*, 1999).

Diversos investigadores han reportado que en ratones *mdx* (ratones con deficiencia de distrofina) se expresa un mayor nivel de RNAm de MMP9 y MMP2, así como altas concentraciones en suero de MMP9 y TIMP1, y que la inhibición de la actividad de MMP9 resulta en el restablecimiento de las funciones contráctiles de regeneración y reducción del deterioro estructural del músculo, la necrosis, la inflamación y la fibrosis. A su vez, el análisis de expresión génica de los músculos de ratones *mdx* y de humano con DMD mostró una regulación al alza del gen TIMP1 (Gosselin *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009). Con base en lo anterior es necesario incluir en los protocolos de diagnóstico la cuantificación de moléculas como TIMP1 que permitirán tener más criterios de inclusión o exclusión para un mejor diagnóstico de la DMD.

Por otra parte, se ha demostrado que MMP2 puede degradar alfa-distroglicano, que a su vez desencadena la proteólisis de beta-distroglicano por parte de MMP9 así como de MMP2, que resulta en la perturbación del enlace entre el MEC y la membrana celular del complejo distrofina-glicoproteínas en el músculo esquelético de pacientes con DMD y sarcoglicanopatías (Yamada *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2006).

Nadarajah y colaboradores realizó un estudio en 2011 en población holandesa y mostraron que las concentraciones séricas de MMP9 y TIMP1 son significativamente más altas en los pacientes con DMD, en comparación con los controles sanos. En el mismo estudio se siguió, entre 2 a 4 años y medio, a 9 pacientes con DMD, y se reportó que las concentraciones de MMP9 aumentaron significativamente con la edad, pero no los de TIMP1. Todo esto sugiere que MMP9, MMP2 y TIMP1 desempeñan un papel importante en la patogénesis de la distrofia muscular de Duchenne, que implica la remodelación de la MEC durante el ciclo de degeneración y regeneración de la fibra muscular.

Justificación

En la actualidad existe la necesidad de contar con moléculas biológicas específicas que reflejen el estado fisiológico de los músculos de los pacientes con DMD para su posible uso en el monitoreo del progreso de la enfermedad. Por esta razón, en el presente trabajo se busca establecer un grupo de biomarcadores de fácil obtención que ayuden no solo en el diagnóstico, sino que también permitan evaluar la progresión y efecto de los tratamientos en DMD.

Hipótesis

Después del tratamiento con deflazacort a los pacientes con DMD, las concentraciones séricas de MMP9, MMP2 y TIMP1 se modificarán en relación a la evaluación morfo funcional de los pacientes.

Objetivos

- Identificar la mutación en el gen DMD en los casos que se requiera para poder establecer un diagnóstico definitivo.
- Cuantificar las concentraciones séricas de MMP9, MMP2 y TIMP1, de los pacientes con DMD, así como de individuos controles.
- Evaluar si las concentraciones séricas de MMP9, MMP2 y TIMP1 como posibles biomarcadores en pacientes con distrofia muscular de Duchenne antes y después del tratamiento con deflazacort.

Materiales y métodos

El estudio que se realizó es de tipo observacional, descriptivo y longitudinal; En el cual, después de seguir los criterios de eliminación y exclusión, se incluyeron 16 pacientes con diagnóstico definitivo para DMD de acuerdo con los criterios de MD STARnet, con una media de edad de 7 años y rangos de 6 a 10 años; y 23 sujetos sanos con una media de edad de 14 años y rangos de 12 a 18 años.

La identificación de mutaciones por medio de MLPA conjunto a electroforesis capilar, se realizó solo para tres pacientes que requerían confirmación del diagnóstico definitivo, debido a que los otros 13 pacientes ya habían sido diagnosticados previamente con DMD.

Los pacientes fueron tratados con deflazacort (en dosis establecida por el pediatra y de acuerdo con las guías de práctica clínica), provenientes de las instituciones: Sociedad Mexicana de Distrofia Muscular (SMDM A.C), y la Asociación de Distrofia Muscular de Occidente A.C. (ADMO).

En la comparación de los puntajes de las pruebas cronometradas, así como de las escalas funcionales de los pacientes con DMD antes del tratamiento y después de 3 meses de tratamiento con deflazacort, hay variaciones en el número de pacientes por prueba, debido a que el individuo fue incapaz de realizar alguna de ellas.

En el análisis de seguimiento antes del tratamiento, a 3 y 6 meses de tratamiento con deflazacort, solo se muestran los datos para las concentraciones de MMP9 y de solo 4 pacientes, debido a la disponibilidad de las muestras.

Criterios de inclusión

Los pacientes que se incluyeron en este estudio fueron aquellos con un diagnóstico definitivo de DMD que hubieron firmado la carta de consentimiento informado según la Declaración de Helsinki.

Criterios de exclusión

Los pacientes con algún otro tipo de distrofia muscular o patología concomitante.

Criterios de eliminación

Los pacientes que no siguieron el tratamiento con deflazacort, los que no realizaron las pruebas funcionales, y aquellos que abandonaron el estudio.

Extracción de ADN sanguíneo mediante el método detergentes catiónicos

El ADN sanguíneo se extrajo por la técnica DTAB/CTAB (Gustincich et al., 1991).

Consta de una etapa de lisis celular con un detergente catiónico: en este caso, el bromuro dodeciltrimetilamonio (DTAB) en conjunto con NaCl, y una segunda etapa de purificación con el bromuro cetiltrimetilamonio (CTAB).

Utilizando una muestra de sangre total, almacenada en un tubo con EDTA como anticoagulante, se centrifuga a 2000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos para separar el paquete leucocitario.

Extraer el paquete leucocitario y transferirlo a un tubo eppendorf de 1.5 ml con 600µl de DTAB, calentarlo a 68°C durante 5 minutos. Posteriormente agregar 550µl de cloroformo, agitando vigorosamente durante 5 minutos, y centrifugar a 12000rpm durante 10 minutos.

Rescatar la fase acuosa superior transfiriéndola a un nuevo tubo eppendorf de 1.5ml. Agregar 100µl de CTAB, además de 750µl de agua estéril. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos y centrifugar a 10000rpm durante 5 minutos.

Decantar el sobrenadante, conservando el botón en el fondo del tubo, resuspenderlo con 200µl de NaCl al 1.2M y agregar 850µl de etanol absoluto. Se deja reposar durante 10 minutos a -20°C, y posteriormente centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos.

Desechar el sobrenadante y resuspender el botón con 500µl de etanol al 70%. Centrifugar durante 5 minutos a 10000rpm; seguido decantar la fase líquida y conservar el botón dentro de una cámara de secado.

Por último, se agrega 100µl de TE (Tris-HCL y EDTA) y se calienta a 65°C durante 30 minutos y resuspender.

Verificación de la integridad de ADN

La electroforesis consiste en la separación de moléculas a través de una matriz tamponada, ya sea agarosa o poliacrilamida, en un medio acuoso, generalmente buffer tris-borato-ácido etilendiaminotetraacético (TBE). La matriz funciona como un filtro: separa las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo al tamaño y a la carga neta que poseen. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es el responsable de la fuerte carga negativa; hace que los fragmentos migren hacia el polo positivo durante la electroforesis. La resolución y velocidad de migración de los fragmentos de ADN dependerán de la concentración de agarosa en el gel y del voltaje aplicado durante el proceso (Sambrook *et al.*, 1989).

Una vez realizada la extracción de ADN, se verificó su integridad, empleando geles de agarosa al 1.5%, en el cual se utilizó 2µl de ADN sanguíneo mezclado con 3µl de azul de bromofenol. Para observar las bandas de ADN se utilizó bromuro de etidio con ayuda del equipo Dolphin-Doc WEALTEC (Figura 6).

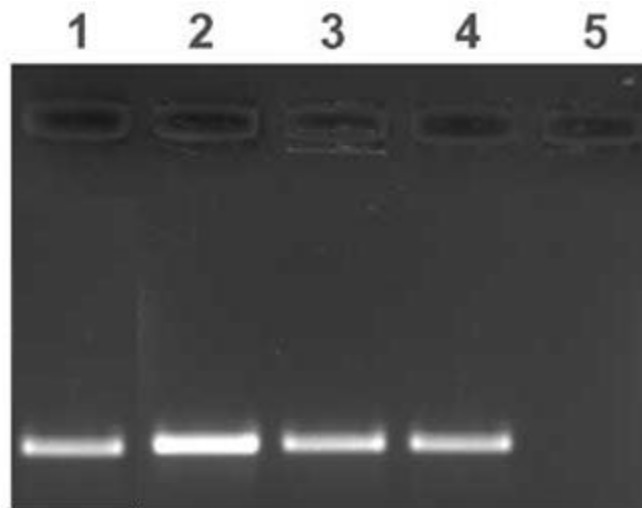


Figura 6. Muestras de ADN en gel de agarosa. Las bandas de fluorescencia muestran su integridad (tomado de <http://bioprep.community.uaf.edu/the-basics-of-gel-electrophoresis/>).

Cuantificación del ADN

Una vez que se verificó la integridad de las muestras de ADN, estas fueron cuantificadas con un espectrofotómetro *NanoDrop-1000* para conocer su concentración y poder preparar alícuotas para los correspondientes métodos. El *NanoDrop-1000* de la marca *Thermo* es un espectrofotómetro de espectro total que puede cuantificar ADN, el cual utiliza longitudes de onda de 260nm para los ácidos nucleicos; 280nm, para proteínas, y 230nm, para otro tipo de contaminantes en la muestra (Figura 7).

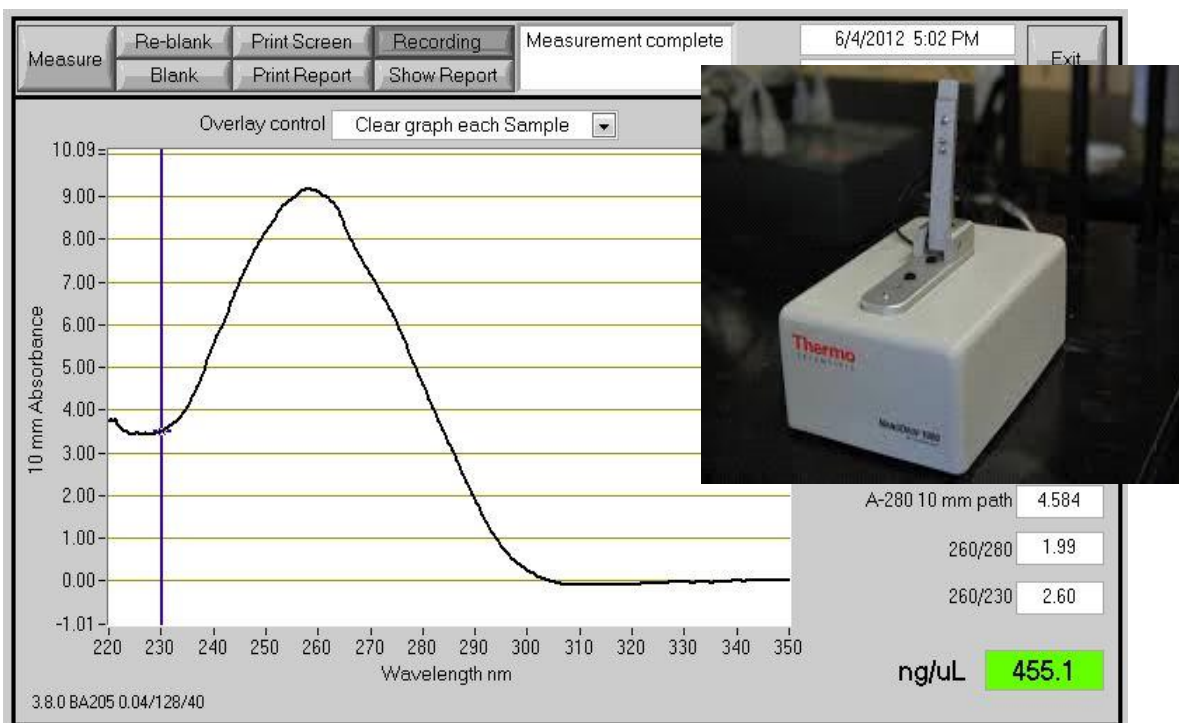


Figura 7. El equipo NanoDrop ND-1000 es un espectrofotómetro que sirve para la cuantificación del ADN. El reporte del software en donde 260nm/280nm indica una estimación de la pureza de ADN con un valor de ≥ 1.8 , y donde 260nm/230nm es una medida secundaria que, de igual forma, evalúa la pureza con valores de ≥ 2 . Estos valores son considerados ideales, pero si los valores son menores a los ya mencionados, indicarían la presencia de contaminantes en la muestra de ADN (tomado de <http://gcf.uta.edu/Nanodrop.html>).

Identificación de mutaciones

La amplificación de sondas dependientes de ligando (MLPA) es un procedimiento de cuantificación de ADN relativo, basado en la amplificación de sondas capaces de hibridar con secuencias específicas en los exones, dependientes de reacción múltiple de PCR. Con dicha técnica es posible detectar anomalías de hasta 50 secuencias de ADN en una única reacción, lo que permite detección de inserciones o deleciones que afectan a uno o varios exones, o incluso secuencias que difieren en un solo nucleótido.

La reacción de MLPA se divide en cinco pasos: 1) la desnaturalización del ADN y la hibridación de las sondas de MLPA, 2) la reacción de ligación, 3) la amplificación por PCR, 4) la separación de los productos de amplificación por electroforesis capilar y 5) el análisis de datos.

En la primera etapa, el ADN se desnaturaliza y se incuba con una mezcla de sondas de MLPA. Las sondas de MLPA consisten en dos oligonucleótidos; cada una contiene un grupo cromóforo y un cebador de PCR, las cuales se hibridan al reconocer las secuencias específicas diana de ADN contiguas. Solamente cuando ocurre la hibridación, pueden ser ligados durante la reacción de ligación. Debido a que solo las sondas ligadas se amplifican exponencialmente durante la reacción de amplificación en PCR, el número de productos de ligación es utilizado como medida para el número de secuencias diana en la muestra. La amplificación por PCR se realiza usando solo un par de cebadores de PCR, uno de los cuales está marcado con fluorescencia. Los productos de amplificación se separan mediante electroforesis capilar para su correcta interpretación (Figura 8) (Coffa *et al.*, 2008).

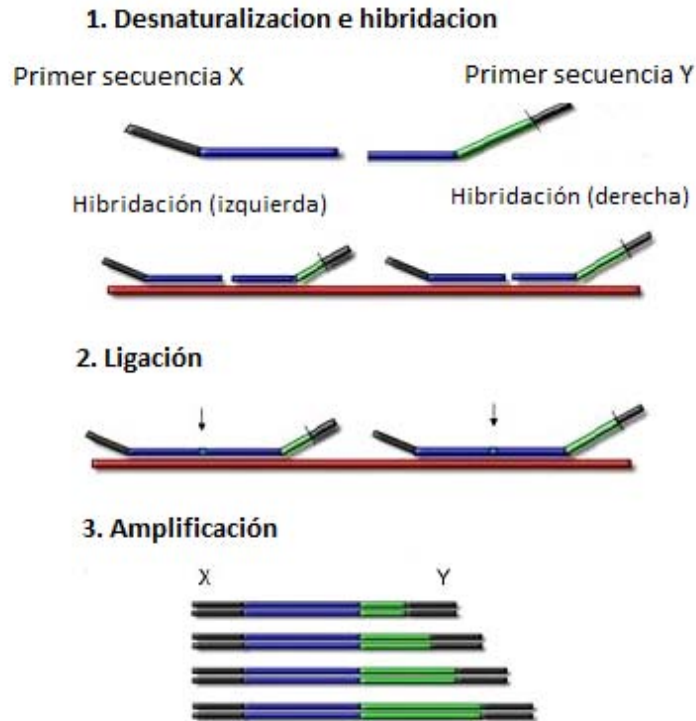


Figura 8. 1- Desnaturalización e hibridación de las parejas de sondas con las secuencias diana específicas del ADN. 2- Ligación solo de aquellas sondas hibridadas. 3- Amplificación de las sondas por PCR, cada sonda genera un producto de amplificación de longitud única (tomado de http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_fNPBLedDVp38p-CxU2h0mQ).

Una vez preparadas las alícuotas a 100 ng/μl de las muestras de ADN sanguíneas, se realizó el análisis por la técnica MLPA. El análisis se realizó siguiendo las indicaciones sugeridas por el proveedor (MCR-Holland) en dos reacciones, P034 y P035, que contienen sondas para cada uno de los exones del gen DMD (Figura 9).

Reacción completa de MLPA

Reacción de hibridación		
1.	98°C	5 minutos
2.	25°C	mantener
3.	95°C	1 minuto
4.	60°C	mantener
Reacción de ligación		
5.	54°C	mantener
6.	54°C	15 minutos
7.	98°C	5 minutos
8.	4°C	mantener
Reacción de PCR		
9.	60°C	mantener
10.	35 ciclos:	
	- 95°C	30 segundos
	- 60°C	30 segundos
	- 72°C	60 segundos
11.	72°C	20 minutos
12.	4°C	mantener

Figura 9. Instrucciones para la reacción completa de MLPA (MCR-Holland) en un termociclador (tomado de http://www.mlpa.com/WebForms/Tag=_fNPBLedDVp38p-CxU2h0mQ).

Para realizar la electroforesis se le dio el siguiente tratamiento a la muestra: a 1µl de producto de PCR.

Reactivo	ABI 310	ABI 3130
Formamida	20 µl	8.7 µl
Liz	0.5 µl	0.3 µl

Para llevar a cabo la electroforesis capilar, incubar las muestras durante 2 minutos a 94°C, y después enfriarlas en una placa fría. Características del capilar: 5-47cm 50µm. ABI402839. Polímero POP-4. Condiciones de la electroforesis: tiempo de inyección 20 segundos a 2.0kV. Tiempo de ejecución: 30 minutos a 60°C y 15 kV.

Los resultados obtenidos de la electroforesis capilar fueron analizados con el software *GeneMarker V 2.1*. Con este programa se cotejan los electroferogramas, en donde se compara la altura o el área de los picos de fluorescencia derivados de PCR con respecto a una muestra control para detectar las duplicaciones o deleciones. También se pueden determinar las mutaciones mediante relación de picos, en el cual estandariza la fluorescencia de cada pico, donde un valor mayor a 1.5 se considera duplicación, y un valor menor a 0.5 es considerada deleción (Figura 10).

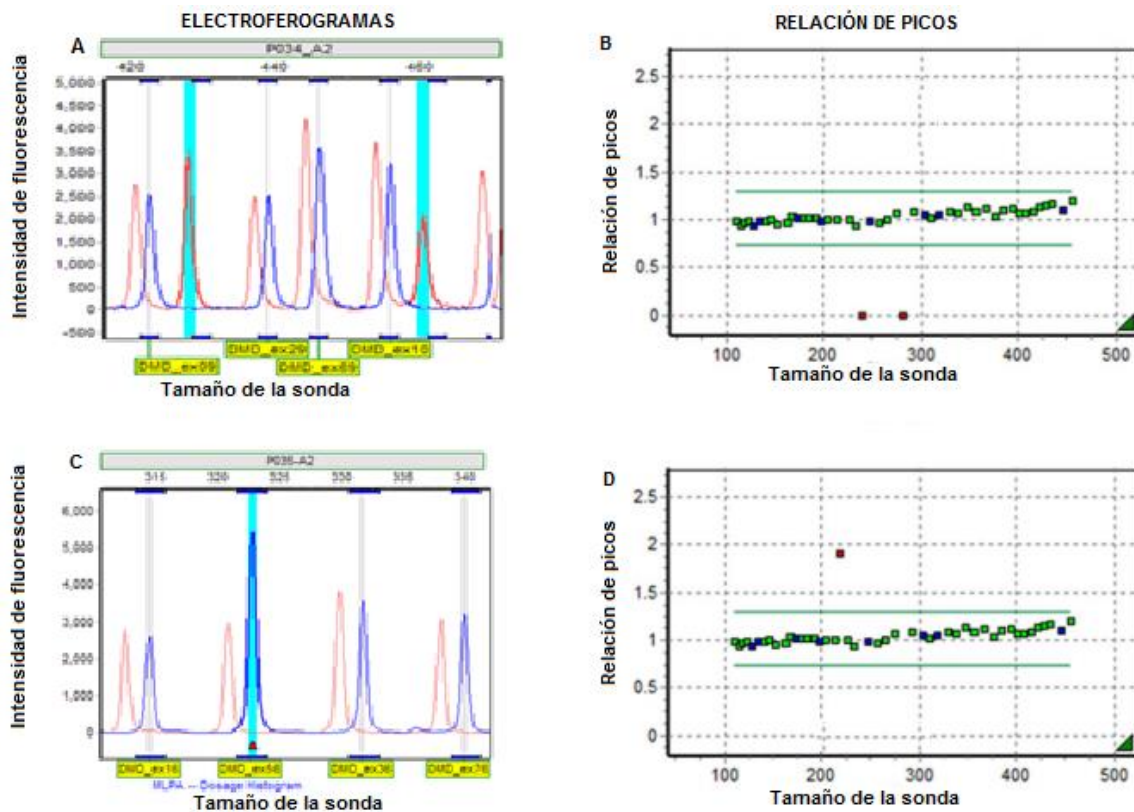


Figura 10. Análisis de la electroforesis capilar con el software GeneMarker. El análisis compara el ADN de un control sano, contra el ADN de un paciente con DMD. A) Deleciones exónicas, los dos picos del control marcado en rojo se encuentran solos. B) Deleciones exónicas, representada por los dos puntos por debajo de 0.7. C) Duplicación exónica, la señal o el pico del paciente se aprecia con una altura mayor a la del control. D) Duplicación exónica, el punto por encima del valor 1.3 representa la duplicación (Coffa et al., 2008).

Cuantificación de proteínas en suero

Este ensayo emplea la técnica ELISA (Enzyme-linked immuno sorbent assay; ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas), basada en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tienen actividad tanto inmunológica como enzimática. Los tipos de ELISA utilizados en este estudio son de tipo sándwich, en el cual un anticuerpo policlonal específico cubre una microplaca de 96 pozos para MMP9, MMP2 o TIMP1 respectivamente para cada kit, seguido de un anticuerpo secundario que también reconoce la molécula en cuestión, conjugado con peroxidasa, la cual reacciona con el peróxido de hidrógeno liberando oxígeno que actúa sobre el cromógeno tetrametilbencidina (TMB), dando un tono azul que refleja la cantidad de proteína contenida en el suero. La reacción enzimática se detiene con una solución de ácido sulfúrico, y la formación de producto se determina por medio de absorbancia con ayuda de un lector de microplacas. La concentración de anticuerpo secundario en la muestra es proporcional a la absorbancia del producto de la reacción en relación con la curva estándar establecida en cada kit.

Cuantificación de las concentraciones séricas de MMP9, MMP2 y TIMP1

Se utilizó una placa de 96 pozos, pre-cubierta con un anticuerpo policlonal específico para MMP9, MMP2 o TIMP1, dependiendo de cada kit.

Se adicionaron 100µl de diluyente de muestra en cada uno de los pozos.

A partir de un concentrado de MMP9, MMP2 o TIMP1, se preparó una curva estándar en siete tubos eppendorf de 1.5ml, en los que se elaboraron diluciones con el diluyente calibrador proporcionado en cada kit (Figuras 11, 12 y 13).

Se adicionó 50µl de estándar o de suero por duplicado en cada pozo, excepto para MMP9, que se adicionaron 100µl. La placa se cubrió con una mica y se incubó a temperatura ambiente, agitando a 500rpm en un shaker durante 2 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió a decantar la solución seguido de leves sacudidas sobre una sanita; enseguida se lavó la placa con 400µl de buffer de lavado por cada pozo, repitiendo esto durante tres tiempos para

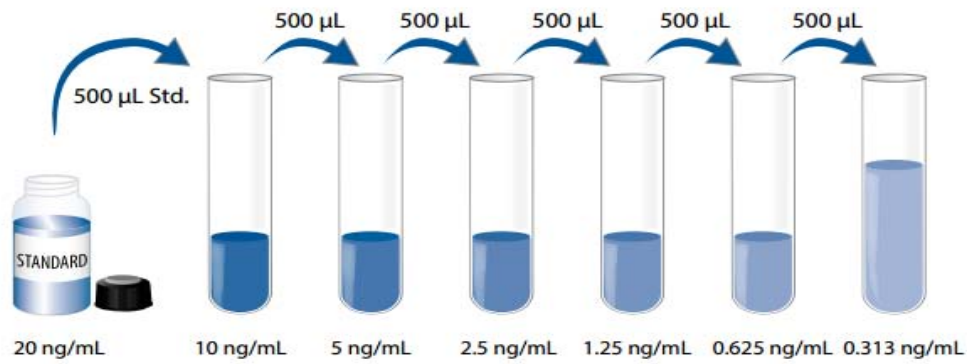
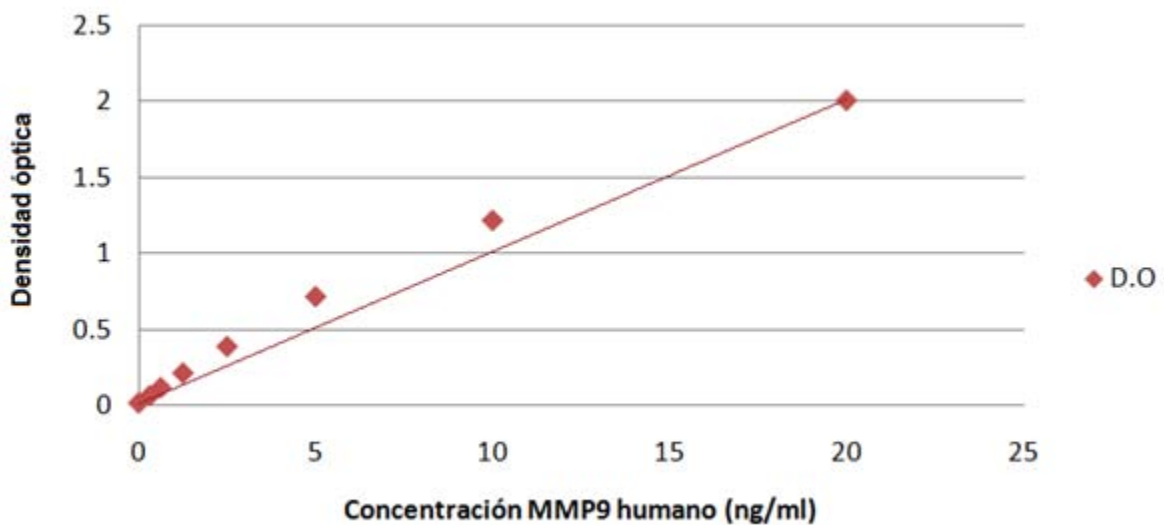


Figura 11. Preparación de la curva estándar para MMP9 a partir de un stock de 20ng/ml.



Gráfica 1. Curva estándar para MMP9 con un coeficiente de correlación de $r = 0.985$, de la cual logró obtenerse el valor de la pendiente (0.10), así como el valor de la intersección de la recta en el eje y (0.098).

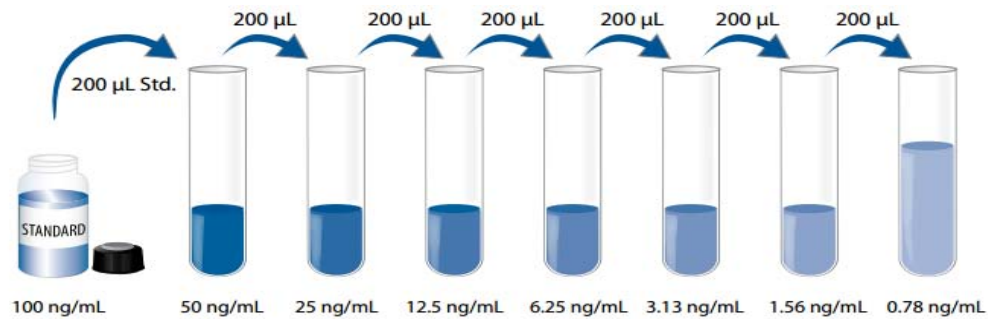
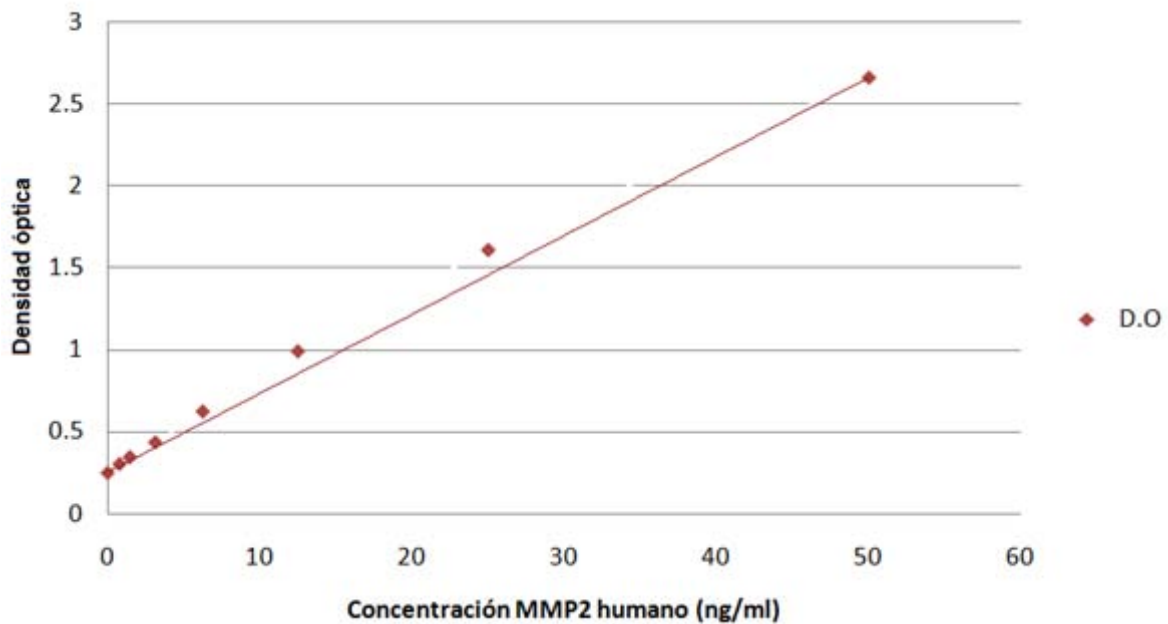


Figura 12. Preparación de la curva estándar para MMP2 a partir de un stock de 100ng/ml.



Gráfica 2. Curva estándar para MMP2, con un coeficiente de correlación de $r = 0.995$, de la cual pudo obtenerse el valor de la pendiente (0.049), así como el valor de la intersección de la recta en el eje y (0.296).

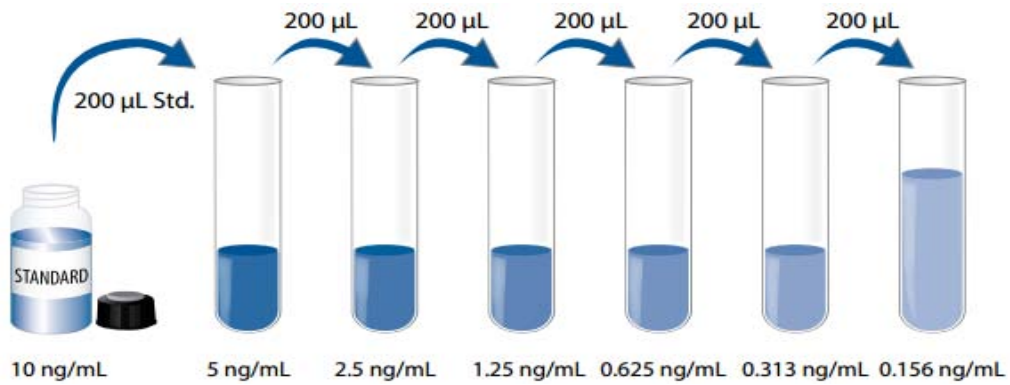
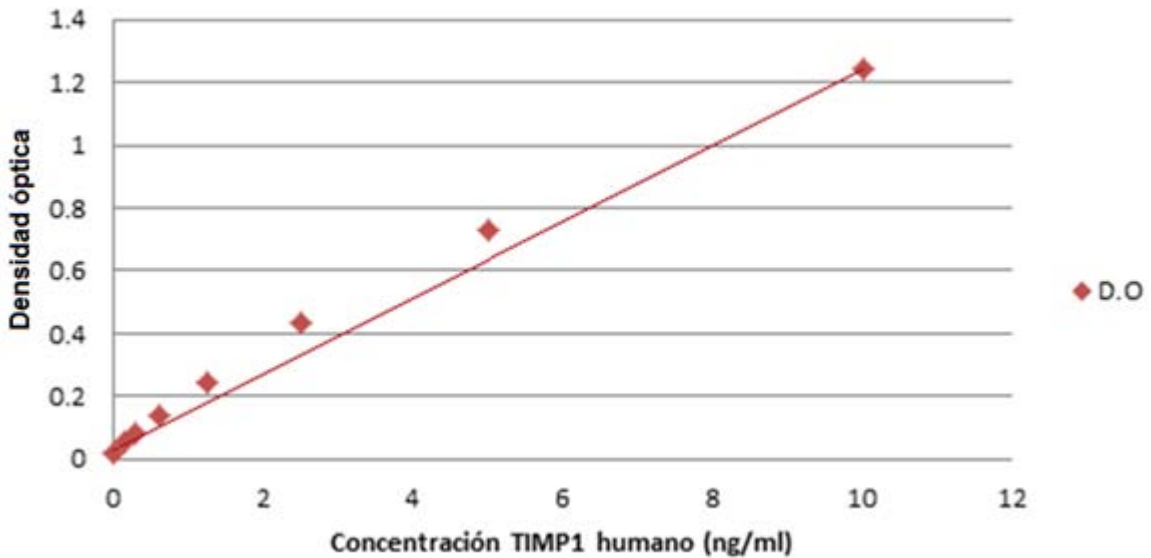


Figura 13. Preparación de la curva estándar para TIMP1 a partir de un stock de 10ng/ml.



Gráfica 3. Curva estándar para TIMP1, con un coeficiente de correlación de $r = 0.996$, de la cual logró obtenerse el valor de la pendiente (0.122), así como el valor de la intersección de la recta en el eje y (0.056).

un total de cuatro lavados. Posteriormente, se adicionaron 200 μ l del anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) en cada pozo, y se volvió a cubrir con una mica; se incubó a temperatura ambiente agitando en un Shaker (Bio Rad Western Blot System, México) a 500rpm durante 1 hora. En el caso de MMP2 se agitó por 2 horas.

Se realizaron 4 lavados y se adicionaron 200 μ l de la solución sustrato tetrametilbencidina (TMB) en presencia de peróxido de hidrogeno en cada uno de los pozos, cubriendo nuevamente con una mica además de papel aluminio para cubrirlo de la luz, incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente sin agitación.

Por último, se adicionaron 50 μ l de una solución de parado; en este caso, ácido sulfúrico en cada pozo, evitando la formación de burbujas.

La lectura de la placa se realizó por un lector de microplacas iMark (Bio-Rad Microplate Absorbance Reader Figura 14) a una longitud de onda de 450nm, con una corrección de longitud de onda ajustada a 540nm. Estas correcciones omiten imperfecciones ópticas en la placa.



Figura 14. Lector de placas iMarck y microplaca de 96 pozos utilizados en el estudio.

A partir de los resultados obtenidos de las diferentes concentraciones del stock se construyó una curva estándar trazando la absorbancia media en el eje de las y contra las concentraciones en el eje de las x (Gráficas 1, 2 y 3), y así lograr una curva, en la cual pueda extrapolarse la media de las absorbancias de cada muestra y, de esta manera, obtener la concentración (www.RnDSystems.com).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados por el paquete estadístico para las Ciencias Sociales SPSS IBM, versión 21. Todos los resultados fueron sometidos a la prueba de normalidad, utilizando el método de Shapiro-wilk. Para comparar los resultados entre los grupos y saber si había diferencia entre ellos se aplicó la prueba U de Mann-Whitney para dos muestras independientes. La concentración sérica de MMP9, MMP2 y TIMP1 fueron analizados por la estadística descriptiva, donde calculamos el valor de la mediana y el rango intercuartílico (RIQ). Se utilizó el análisis de varianza para medidas repetidas para determinar si había diferencia antes del tratamiento contra 3 y 6 meses de tratamiento para las concentraciones de las diferentes proteínas, así como para las escalas funcionales y las pruebas cronometradas. Para analizar si existía relación entre las concentraciones y las escalas funcionales o las pruebas cronometradas, utilizando la correlación de Pearson o de Spearman. En todos los casos se tomó un intervalo de confianza del 95% y se aceptaron como significativos aquellos valores menores o iguales a 0.05.

Resultados

Identificación de mutaciones

Se muestran los resultados obtenidos de tres pacientes que requerían confirmación del diagnóstico definitivo para DMD. Mediante la técnica MLPA conjugada con electroforesis capilar, se obtuvo que efectivamente los tres pacientes presentaban mutaciones en el gen DMD (Figuras 15, 16 y 17).

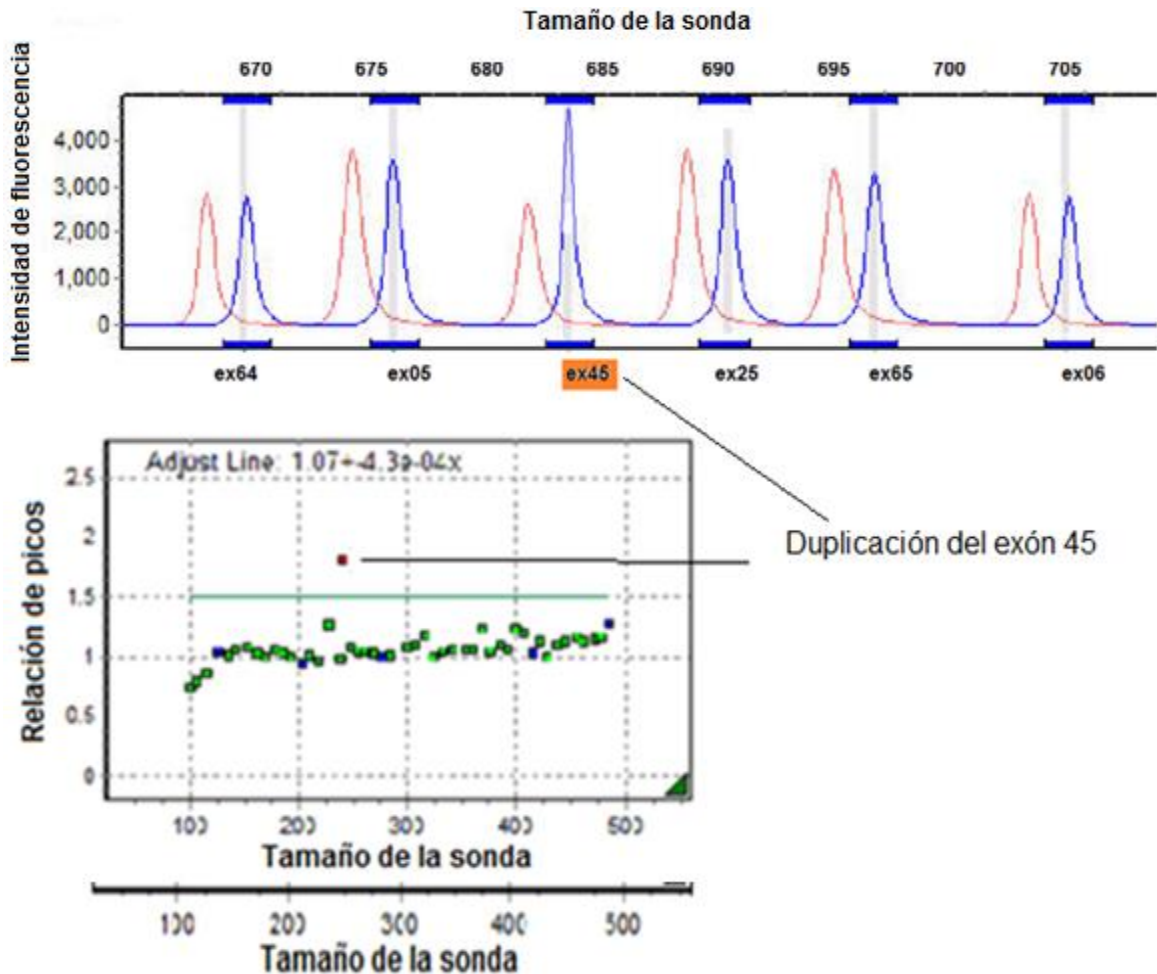


Figura 15. Identificación de una duplicación en el gen DMD de un paciente. Se observa en el electroferograma que el pico en color azul (paciente) tiene una intensidad de fluorescencia de casi el doble al pico en color rojo (control). En la relación de picos se observa que el punto rojo tiene un valor mayor a 1.5, indicando una duplicación del exón 4.

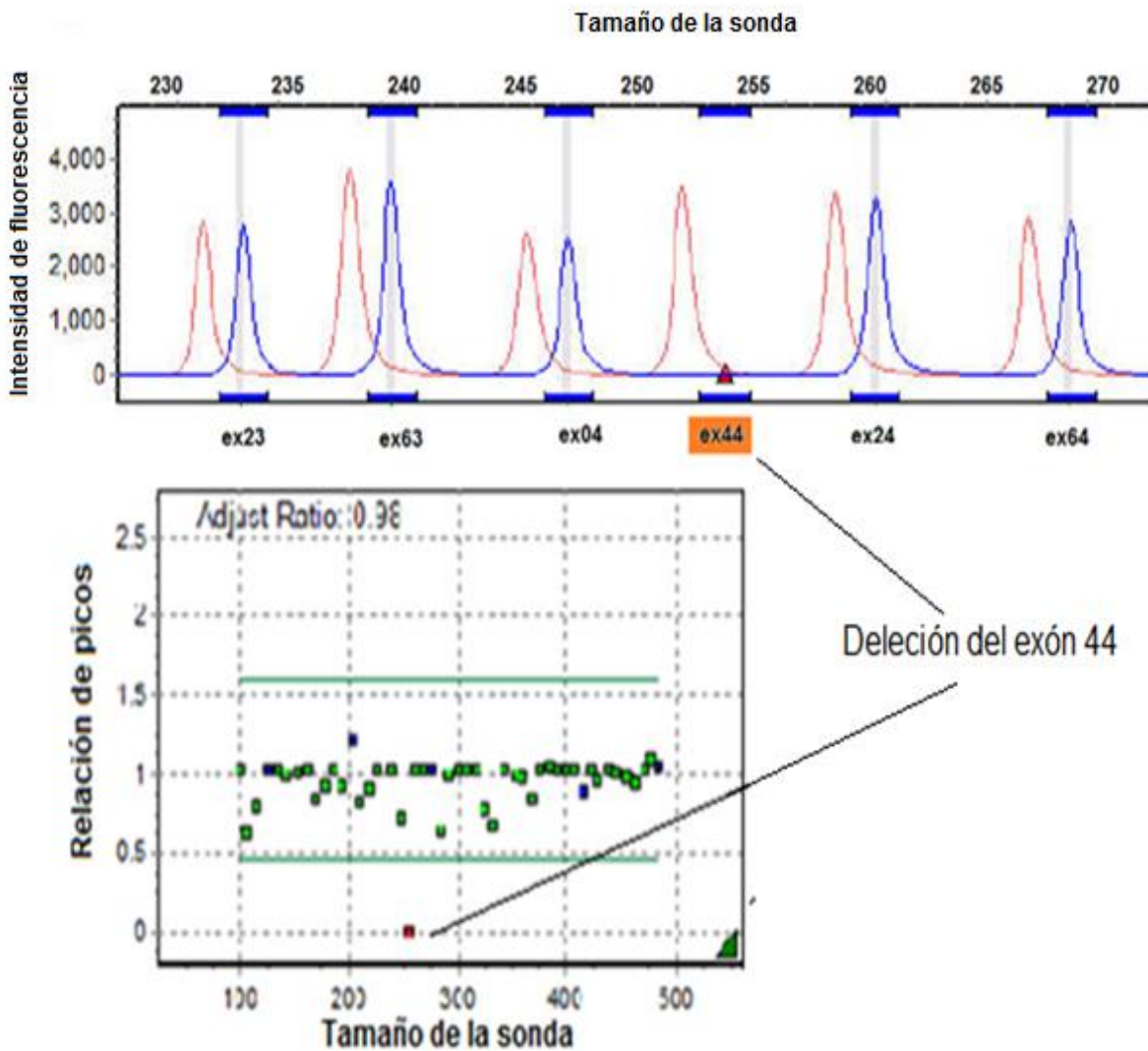


Figura 16. Identificación de una delección en el gen DMD. Se observa en el electroferograma que falta un pico en color azul (paciente) con respecto al pico en color rojo (control). En la relación de picos se observa que el punto rojo tiene un valor menor a 0.5, indicando la delección del exón 44.

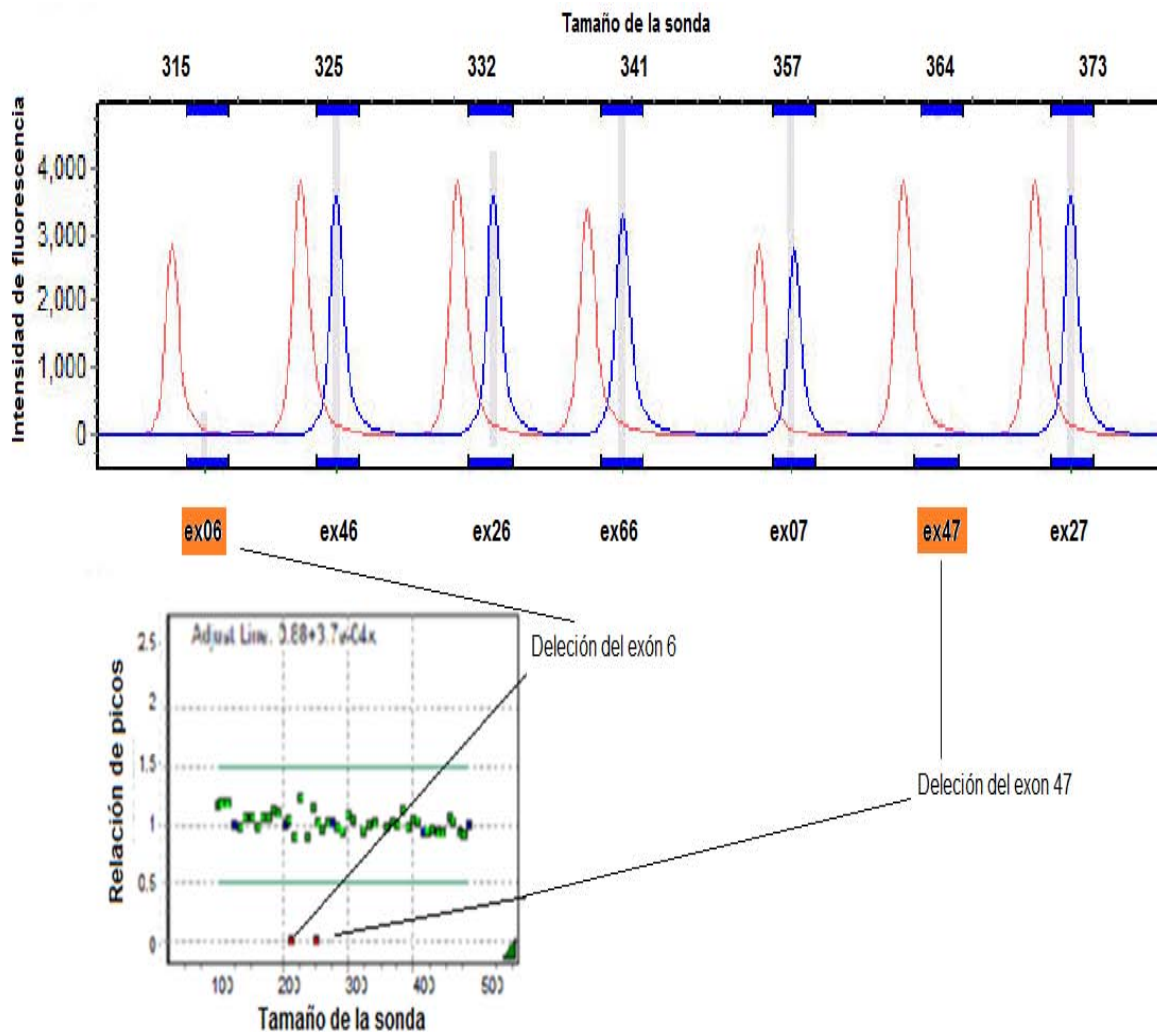
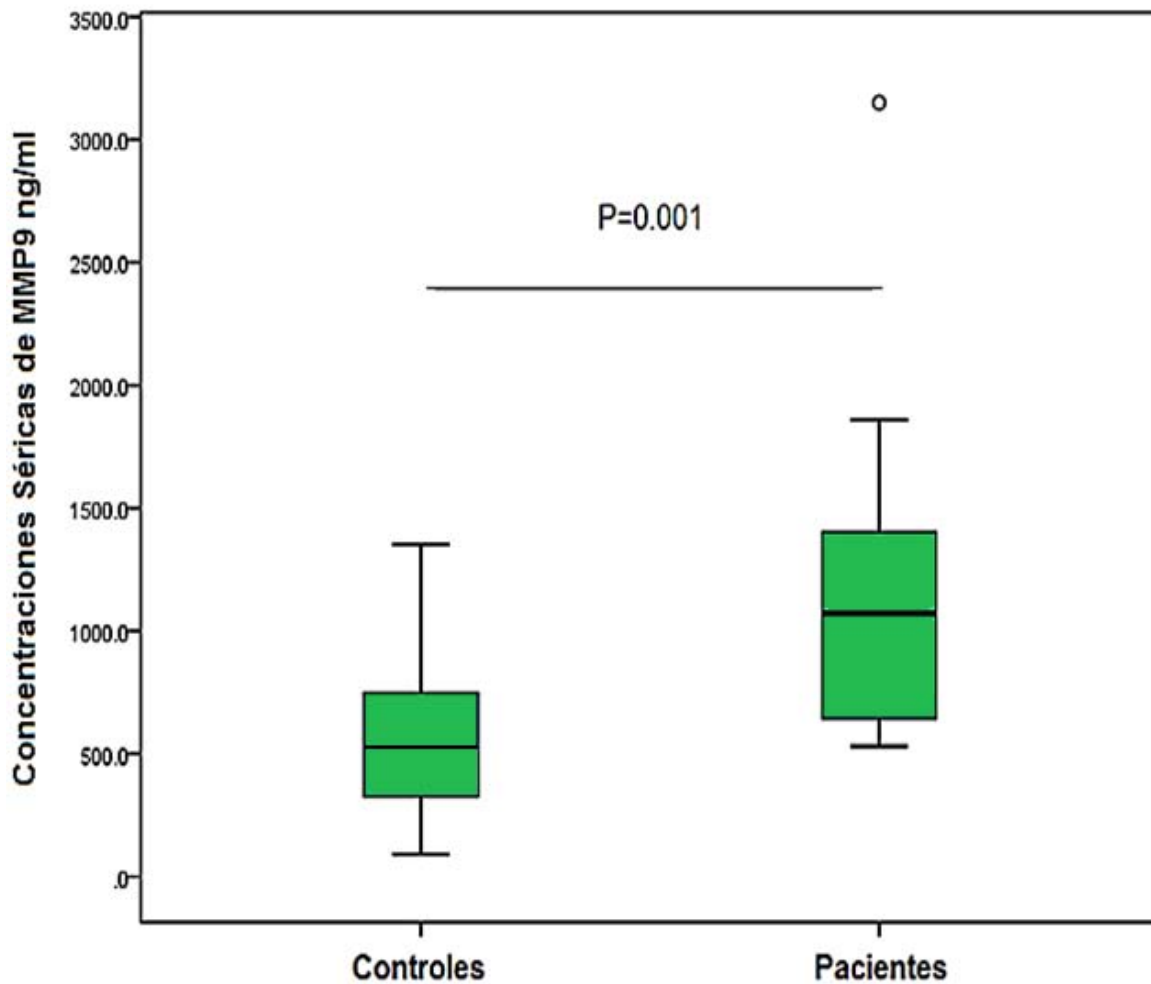


Figura 17. Identificación de dos deleciones en el gen DMD. Se observa en el electroferograma que faltan dos picos en color azul (paciente) con respecto a los picos en color rojo (control). En la relación de picos se observa que los dos puntos en rojo tienen un valor menor a 0.5, indicando las deleciones del exón 40 y 44.

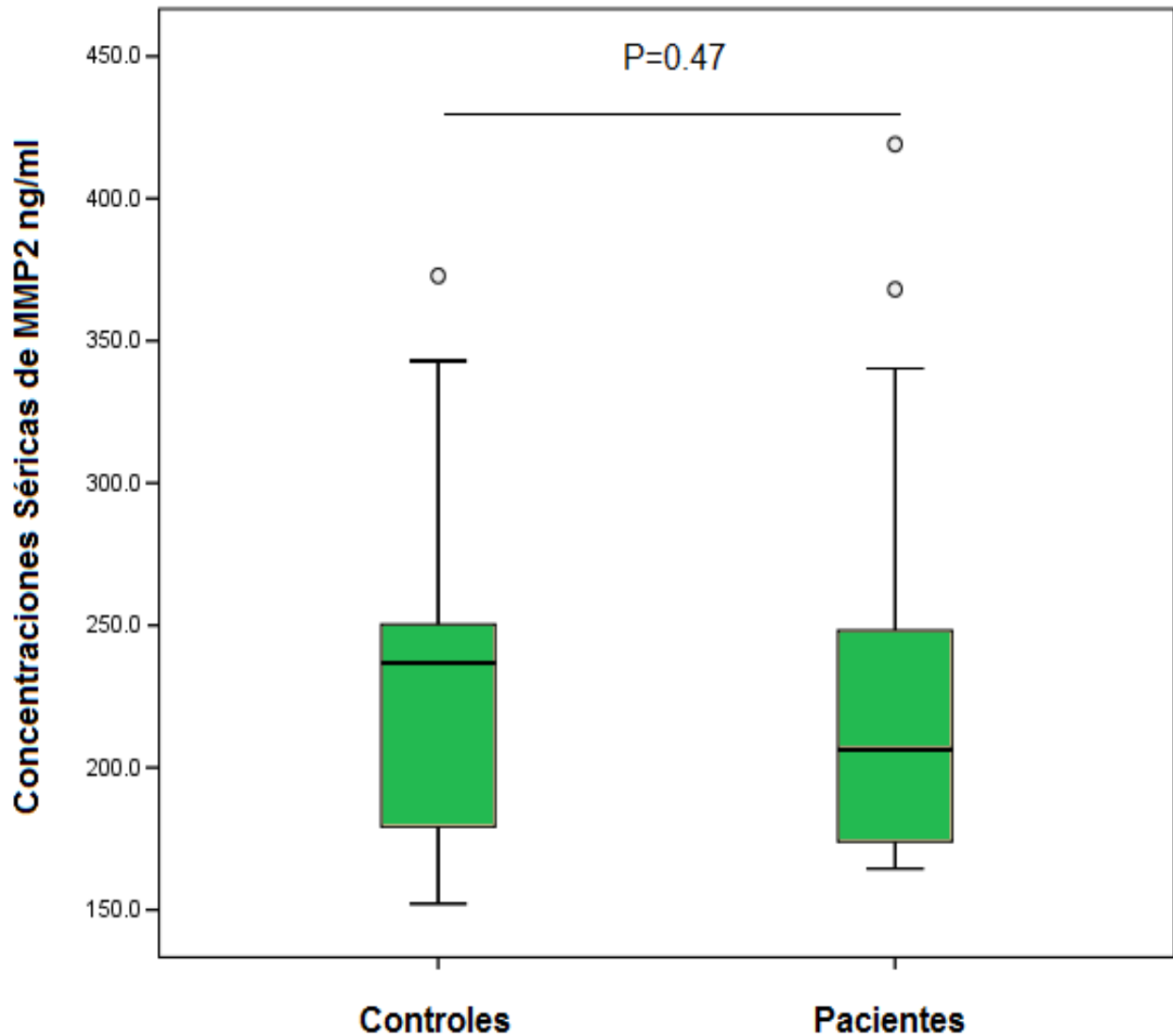
Análisis de las concentraciones séricas de MMP9, MMP2 y TIMP1

En comparación con el grupo de individuos controles, la concentración sérica de MMP9 en pacientes con DMD fue estadísticamente mayor (Gráfica 4). En cambio, no se observaron diferencias estadísticas en la concentración de MMP2 y TIMP1 (Gráfica 5 y 6).

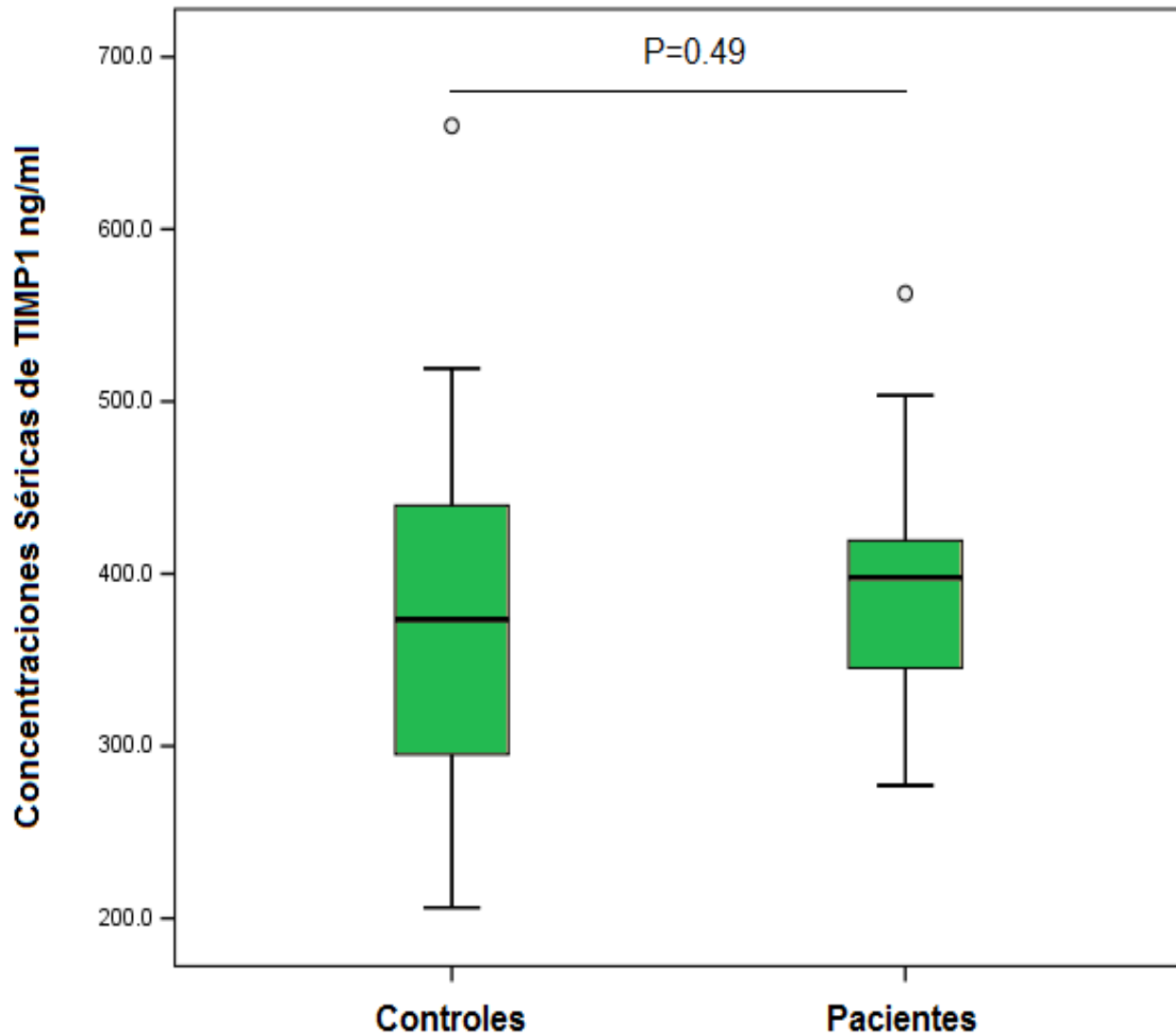
Se realizó la prueba U de Mann-Whitney para las edades de los controles contra los pacientes, que resultó en que los controles eran significativamente mayores con una media de edad de 14 años con rangos de 12 a 18 años y para pacientes con una media de edad 8 años con rangos de 6 a 10 años, con una significancia de $p < 0.001$.



Gráfica 4. Gráfica de caja y bigotes de las concentraciones séricas de MMP9 controles contra pacientes con DMD. Las medianas de las concentraciones séricas se indican mediante la línea que corta la caja por la mitad; los bigotes representan las concentraciones máximas y mínimas, mientras que \circ indica los valores atípicos y el RIQ representa el alto de la caja. Las concentraciones séricas de MMP9 en pacientes muestran una mediana de 1071ng/ml y un RIQ de 718 que comparado con los controles, los cuales tienen una mediana de 532ng/ml y un RIQ de 492, resulta en una $p=0.001$.



Gráfica 5. Gráfica de caja y bigotes de las concentraciones séricas de MMP2 controles contra pacientes con DMD. Las concentraciones séricas de MMP2 en pacientes tienen una mediana de 206ng/ml y un RIQ de 97, que comparado con los controles con una mediana de 236ng/ml y un RIQ de 80, resulta en $p=0.47$.



Gráfica 6. Gráfica de caja y bigotes de las concentraciones séricas de MMP2 controles contra pacientes con DMD. Las concentraciones séricas de TIMP1 en pacientes tienen una mediana de 406ng/ml y un RIQ de 103 que comparado con los controles con una mediana de 374ng/ml y un RIQ de 149, resultan en una $p=0.49$.

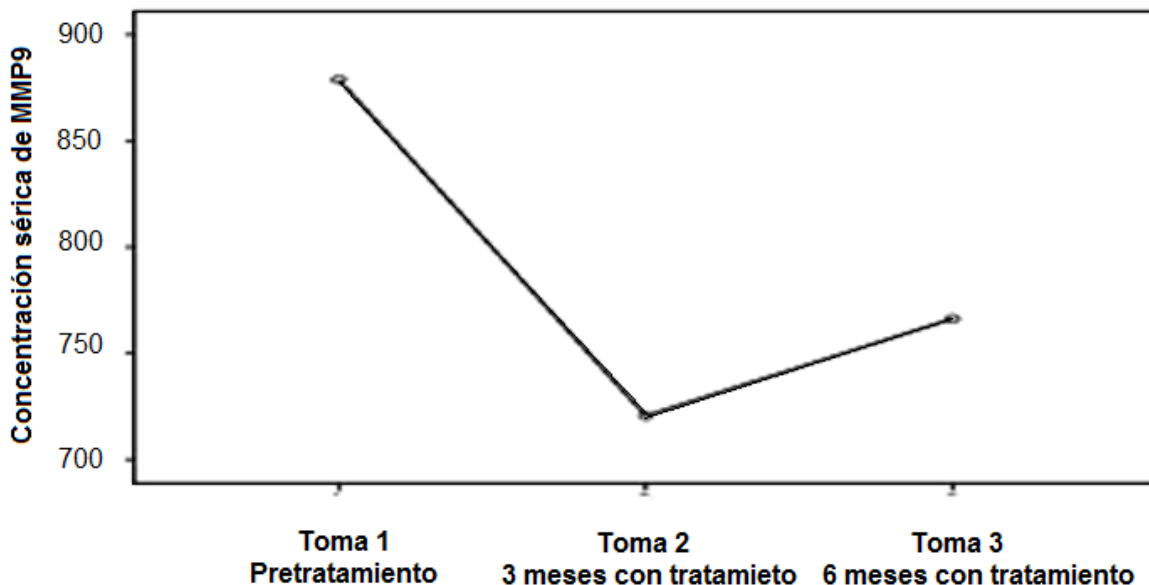
Concentración sérica de MMP9 antes de l tratamiento y postratamiento con deflazacort

La concentración de MMP9 en los cuatro pacientes con DMD tratados por tres y seis meses con deflazacort fue similar a los valores obtenidos antes de iniciar el tratamiento (Cuadro 1).

Cuando se analizó la concentración en función del tiempo postratamiento se observó que a los seis meses de tratamiento con deflazacort la MMP9 se incrementó ligeramente sin llegar a ser estadísticamente significativa en relación con las muestras obtenidas a los tres meses de tratamiento con deflazacort (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de las concentraciones de MMP9 antes y después del tratamiento.

Toma de la muestra		Medias estimadas de las concentraciones de MMP9	
1	Antes del tratamiento	878.800 ng/ml	
2	3 meses con tratamiento	720.550 ng/ml	
3	6 meses con tratamiento	766.300 ng/ml	
Toma MMP9	Diferencia de medias	Valor de p	
1 2	158.250	p=0.27	
1 3	112.500	p=0.57	
2 3	45.750	p=0.68	



Gráfica 7. Gráfico de perfil representando las medias estimadas de las concentraciones antes del tratamiento y después de 3 y 6 meses de tratamiento con deflazacort, donde a pesar de que hay una tendencia en la disminución de la concentración de MMP9 a los 3 meses y posteriormente un aumento a los 6 meses, no hay diferencias significativas en ninguna de las tomas.

Análisis de las escalas funcionales y pruebas cronometradas

En las tablas 2 y 3 se muestran los resultados de las escalas funcionales, así como las pruebas cronometradas antes del tratamiento y a 3 meses de tratamiento con deflazacort. Los datos se analizaron mediante la prueba Wilcoxon de muestras relacionadas para aquellos datos que se distribuían de manera diferente a la normal, mientras que para los datos que tenían una distribución normal se les aplicó la prueba t de Student de muestras relacionadas que en las tablas se indica con un asterisco (*).

En la tabla 2, donde se presentan los puntajes de las escalas funcionales, no hay diferencias significativas para ninguna de las escalas con $p > 0.05$. Por otro lado, en la tabla 3, de las pruebas cronometradas, solo la prueba levantarse de una silla resultó significativamente diferente con una $p = 0.004$, la cual muestra una disminución de los segundos y refleja una mejoría en los pacientes. Para más información de las escalas funcionales y pruebas cronometradas ver anexos.

Tabla 2. Comparación de las escalas funcionales antes del tratamiento y después de tres meses de tratamiento con deflazacort.

	IBarthel	BrookeSup	BrookeInf	Vignos	NSAS
Medianas de los puntajes antes del tratamiento	90 (65– 95)	1.5 (1 – 3)	2.5 (1 – 5)	2.5 (2 – 5)	9 (8 – 13)
Medianas a 3 meses de tratamiento	92.5 (50 – 95)	1 (1 – 2)	2 (1 – 8)	2 (1 – 7)	12.5 (5 – 16)
Valor de P según la prueba de Wilcoxon	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05
Número de pacientes	6	10	10	10	4

(Índice de Barthel/ IBarthel, Brooke para miembros superiores/BrookeSup, Brooke miembros inferiores/BrookeInf, Vignos para miembros inferiores/Vignos y NortStar/NSAS).

Tabla 3. Comparación de las pruebas cronometradas antes del tratamiento y después de tres meses de tratamiento con deflazacort.

	Gower's	SubEsc	LevSilla	Camiseta	Co10m	Cam10m	6minC
Medianas en segundos antes del tratamiento	10 (7 – 13)	6 (5 -15)	*3.20 (2 – 4)	*16.05 (10-24)	1.3 (1.1 – 1.5)	.8 (.2 – .9)	*300.33 (144-415)
Medianas en segundos 3 meses de tratamiento	5 (5 – 8)	6 (4 – 13)	*2 (1 – 3)	*14.75 (6-22)	1.3 (1.1 – 1.3)	1 (.8 – 1)	*372.66 (290-442)
Valor de P							
Prueba Wilcoxon	p>0.05	p>0.05	* p=0.004	*p>0.05	p>0.05	p>0.05	*p>0.05
Número de pacientes	4	5	5	6	5	5	4

(Maniobra de Gower's/Gower's. Subir 4 escalones/SubEsc. Levantarse de una silla/LevSilla. Ponerse una camiseta/camiseta. Correr 10 metros/Co10m. Caminar 10 metros/Cam10m. Prueba de los 6 minutos caminando/6minC, para la cual se observan los metros recorridos y no en segundos).

En la tabla 4 se hacen las comparaciones de las medias estimadas con la prueba análisis de la varianza para medidas repetidas antes del tratamiento contra los 3 y 6 meses de tratamiento, mostrando los rangos máximos y mínimos entre paréntesis, de los cuales solo tomamos al índice de Barthel, la prueba de Brooke para miembros superiores y la prueba de Vignos para miembros inferiores, en lo que se refiere a las escalas funcionales. Mientras que en las pruebas cronometradas se tomaron la maniobra de Gower's, subir 4 escalones, ponerse una camiseta y la prueba de los 6 minutos caminando. Como puede observarse no hay diferencias significativas entre las tres diferentes tomas en ninguna de las escalas funcionales ni tampoco para las pruebas cronometradas con $p > 0.05$ en todas ellas.

Tabla 4. Comparación de las escalas funcionales y pruebas cronometradas de 4 pacientes, antes así como a tres y seis meses de tratamiento con deflazacort.

	Escalas de funcionalidad.			Pruebas cronometradas.		
	IBarthel	BrookeSup	Vignos	Gower's	Escalones	Camiseta
Pretratamiento	80 (60-95)	1.6 (1 - 3)	2.8 (2 - 5)	11.50 (1 - 32)	5.60 (5- 7)	18.42 (11 - 24)
3 meses con tratamiento	85 (65 -95)	1.7 (1 - 2)	3.6 (2 - 7)	6.5 (5 - 8)	5.50 (5 - 6)	14.83 (6 - 22)
6 meses con tratamiento	78.33 (50-95)	1.8 (1 - 3)	4.2 (1 - 9)	7.5 (4 - 11)	4.50 (4 - 5)	14.83 (10 - 20)
Valor de P	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$

Correlaciones entre las escalas funcionales y las pruebas cronometradas con las concentraciones séricas de MMP9, MMP2 y TIMP1 así como de las mismas proteínas

De acuerdo con las tablas 5 y 6, no hay ninguna correlación entre las concentraciones de MMP9, MMP2 y TIMP1 con las escalas funcionales ni con las pruebas cronometradas antes del tratamiento a 3 meses y 6 meses con deflazacort, respectivamente. En las tablas 5 y 6 se marca con un asterisco (*) aquellos datos obtenidos con la prueba de correlación de Pearson, mientras que los demás datos corresponden a la prueba de correlación de Spearman; con respecto al símbolo -° indica que no hubo datos suficientes para realizar tal prueba. Además, no existió correlación entre las diferentes proteínas con $p > 0.05$ tabla 7.

Tabla 5. Correlación entre las proteínas y las diferentes escalas funcionales.

Toma antes del tratamiento	lBarthel	BrookeSup	BrookeInf	Vignos	NSAS
MMP9	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	* $p > 0.05$
MMP2	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
TIMP1	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
3 meses de tratamiento					
MMP9	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
6 meses de tratamiento					
MMP9	* $p > 0.05$	$p > 0.05$	-°	* $p > 0.05$	-°

Tabla 6. Correlación entre las proteínas y las pruebas cronometradas.

Toma antes del tratamiento	Gower's	SubEsc	LevSilla	Camiseta	Correr 10m	Cam 10m	6minC
MMP9	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	*p>0.05	*p>0.05	*p>0.05
MMP2	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
TIMP1	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
3 meses de tratamiento							
MMP9	p>0.05	p>0.05	*p>0.05	*p>0.05	p>0.05	p>0.05	*p>0.05
6 meses de tratamiento							
MMP9	*p>0.05	*p>0.05	-°	*p>0.05	-°	-°	-°

Tabla 7. Correlación entre las diferentes proteínas.

	MMP9	MMP2
MMP9		
MMP2	p>0.05	
TIMP1	p>0.05	p>0.05

Discusión de resultados

Los candidatos a marcadores en este estudio, MMP9, MMP2 y TIMP1, inicialmente se mencionaron estar elevados en el modelo animal mdx, en comparación con los ratones sanos. Con base en esto, en nuestros resultados de pacientes con DMD solo la concentración de MMP9 se encuentra significativamente elevada en comparación con los controles.

El incremento de MMP9 se explica por la inflamación crónica causada por la enfermedad, debido a que la expresión de esta proteína está involucrada predominantemente durante los procesos de inflamación durante la degeneración muscular, ya que se sintetiza en las células proinflamatorias como los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, que son las células inflamatorias más abundantes en los procesos de inflamación relacionados con el daño muscular; otra causa es por la progresión de la enfermedad, que conlleva a la sustitución de musculo esquelético por una deposición de MEC. (Carmeli *et al.*, 2004; Fukushima *et al.*, 2007).

Por otro lado se esperaba que la concentración de TIMP1 estuviera elevada en los pacientes con DMD, esto debido a que TIMP1 podría estar regulando la actividad de la MMP9, como lo indican en el estudio de Nadarajah *et al.*, 2011 en el que reportan concentraciones elevadas de MMP9 así como de TIMP1 en los pacientes con DMD comparado con los controles. Sin embargo las concentraciones de TIMP1 en nuestros pacientes y controles son similares, esto se puede deber a que TIMP1 se incrementa con forme aumenta la edad (Bonnema *et al.*, 2007), ya que nuestros pacientes con DMD son mucho menores (media de edad de 7 años) comparados con los controles (media de edad de 14 años). Por otro lado el aumento de TIMP1, no solo está relacionado con la regulación de la actividad de MMP9, sino también durante la promoción del crecimiento y proliferación celular, por ejemplo durante el desarrollo del tejido óseo, debido a que TIMP1 está implicada en la proliferación de osteoblastos, que lleva a la osificación como en la mandíbula, las costillas, así como de los huesos más largos (Chin y Werb., 1997), lo cual podría estar sucediendo en los controles debido a que se reporta que hay

un desarrollo óseo importante en varones en edades de entre 12 y 14 años de edad (Pérez y Prieto., 2006).

Ya que no hay reportes sobre concentraciones de MMP2 en pacientes con DMD, esperábamos que las concentraciones de esta proteína estuvieran elevadas en los pacientes, basándonos en el modelo animal mdx. Sin embargo, no se observan diferencias significativas entre las concentraciones de los pacientes con DMD y los controles, esto se puede deber una vez más a la diferencia de edades, ya que MMP2 también se incrementa con la edad; además de esto se ha reportado que las concentraciones de MMP2 aumentan durante hipertrofia muscular, y debido a que el mayor desarrollo de la hipertrofia muscular ocurre durante la pubertad (Zhang *et al.*, 2014), que es en la etapa en la que se encuentran la mayoría de nuestros controles. Otra explicación posible, es que la actividad MMP2 tiene un incremento asociado con las posteriores etapas de diferenciación de mioblastos y las primeras etapas de fibras musculares en regeneración y crecimiento (Fukushima *et al.*, 2007), lo cual podría estar sucediendo cada vez menos en los pacientes con DMD, debido a que ya se encuentran en etapas de declive de la enfermedad (cada vez menos tejido muscular) y por tanto una menor concentración de MMP2 posible.

A pesar de que MMP9 y MMP2 forman parte la misma familia de gelatinasas y de tener sustratos similares, la sobre expresión de MMP9 a diferencia de la MMP2, se debe a que la región promotora del gen de MMP9, contiene una zona de unión a la proteína activadora 1 (AP-1) y para el factor nuclear kappa B (NF- κ B), los cuales están ausentes en el gen de MMP2. Por ejemplo, el TNF α e IL-1 β regulan la expresión de MMP9 por medio de AP-1 o NF- κ B, pero no afectan la expresión de MMP2 (Li *et al.*, 2009).

En el caso del seguimiento de pacientes, no se observaron diferencias entre las concentraciones de MMP9 antes del tratamiento con deflazacort, a los tres meses de tratamiento y seis meses de tratamiento; sin embargo, hay una leve disminución de la concentración de MMP9 a corto plazo (tres meses de tratamiento), como se muestra en la gráfica 7, que coinciden con la mejora clínica,

reflejada de las escalas funcionales y las pruebas cronometradas, a pesar de esto no hay relación entre las concentraciones de MMP9 con ninguna de las pruebas cronometradas y escalas funcionales. La disminución de la concentración de MMP9 a los tres meses de tratamiento, se explica por la capacidad de los glucocorticoides a ser potentes anti-inflamatorios, mientras que el posterior aumento se debe a que las concentraciones de MMP9 se incrementan con la progresión de la enfermedad (Nadarajah *et al.*, 2011), ya que los glucocorticoides solo son capaces de retrasar la enfermedad.

Con respecto a las escalas funcionales y las pruebas cronometradas, existe una ligera tendencia a la mejora clínica, como se mencionó anteriormente solo después del tratamiento a corto plazo, con solo un resultado estadísticamente significativo en la prueba de “levantarse de una silla” con una $p=0.004$ (Tabla 3). Sin embargo cuando el análisis fue a los tres tiempos de tratamiento (Tabla 4), hay una discrepancia entre las escalas funcionales NSAA y Barthel que muestran mejorías, mientras que para Brooks y Vignos hay puntajes negativos; esto se debe a que Brook y Vignos, evalúan solo las extremidades superiores e inferiores por separado, y como sabemos la DMD se caracteriza por debilidad y desgaste muscular progresivo principalmente de las extremidades.

El que no haya diferencias estadísticamente significativas de las diversas escalas funcionales y las pruebas cronometradas en los tres diferentes tiempos, se debe a que los glucocorticoides no son una cura para la DMD, como se mencionó anteriormente, solamente son capaces de retrasar la progresión de la enfermedad; además se conoce que la mejor respuesta obtenida por la administración de glucocorticoides es en edades de entre los 3 y 5 años de edad, ya que para aquellos niños que se encuentran en etapas de declive, como es el caso, apenas se alcanzan beneficios terapéuticos, ya que nuestros pacientes se encuentran en edades entre los 6 y 10 años de edad, debido a un retraso en el diagnóstico; esto se debe a que en nuestro país existe un retraso en diagnóstico de la DMD, al confundirla con el pie plano (Vazquez-Cardenas *et al.*, 2013).

No se observó ninguna correlación entre las concentraciones de MMP9, MMP2 y TIMP1 con las escalas funcionales ni con las pruebas cronometradas, ni entre ellas mismas (Tablas 5, 6 y 7). Por otro lado Nadarajah *et al.*, 2011, menciona que sí hay una relación positiva entre las concentraciones de MMP9 con la edad en los pacientes, mientras tanto en nuestro estudio no hay tal relación; esto se debe a que la cantidad de pacientes utilizados para nuestro estudio es de 16 con rangos de edad entre 6 a 10 años de edad, mientras que en el estudio de Nadarajah *et al.*, 2011, se utilizaron 63 pacientes con rangos de edad entre 2.9 a 31.2 años de edad.

Por último debido a su papel en la inflamación, la migración celular, la angiogénesis y la fibrosis, las concentraciones de MMP9, MMP2 y TIMP1, han sido investigados como marcadores por su papel en diversos tipos de cáncer (mama, vejiga y páncreas), enfermedades cardiovasculares, preeclampsia, artritis reumatoide, el asma etc. En los pacientes con asma por ejemplo, presentan altas concentraciones de MMP9, que se asocia con la gravedad del asma; sin embargo cuando los pacientes asmáticos son tratados, hay una disminución significativa de la inflamación y de la concentración de MMP9 que reflejan mejora en el paciente (Wu *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2014). Esto sugiere que un tratamiento que pueda llegar a más eficaz que el de los glucocorticoides, debería ser capaz de reflejar la mejoría clínica con la disminución de la concentración MMP9, que se pudiera lograr después de ser posible por la restauración de la distrofina. Mientras que para tomar las concentraciones de MMP2 y TIMP1 como valiosos biomarcadores en DMD, se sugieren estudios adicionales en el que se utilicen controles semejantes a los pacientes. para así determinar la utilidad de estas proteínas.

Conclusiones

Las proteínas MMP2 y TIMP1 no pueden ser utilizadas como biomarcadores, debido a que las concentraciones séricas de estas proteínas no muestran diferencias significativas entre los pacientes y los controles.

Por otro lado, MMP9 puede ser utilizado como biomarcador, en ayuda al diagnóstico de DMD, debido a las diferencias de las concentraciones séricas entre pacientes contra controles.

Perspectivas

Se sugiere que para las proteínas MMP2 y TIMP1 se realicen pruebas futuras de ser posible con controles con edades similares a los pacientes de este estudio, para definir si puede existir un uso útil de estas proteínas como biomarcadores en la DMD.

Además, MMP9 se sugiere a ser utilizado como marcador de seguimiento, para determinar la utilidad de nuevos tratamientos que puedan llegar a ser más eficientes que los corticoides, que sean capaces de restaurar la deficiencia de distrofina, ocasionando la reparación del tejido muscular y aminorando la inflamación, reflejada con la disminución de la concentración sérica de MMP9 como se observa en el caso del asma, lo cual se pretende con el uso de células pluripotenciales y la terapia del salto de exón.

Anexos

Índice de Barthel

Instrumento para detectar 10 actividades básicas de la vida diaria, dando mayor importancia a la puntuación de los temas relacionados con el control de esfínteres y la movilidad. Esta prueba es fácil y rápida de realizar (Shah *et al.*, 1989).

Para su medición se establecen los siguientes criterios:

- a. Las actividades se valoran de forma diferente, pudiéndose asignar 0, 5, 10 o 15 puntos.
- b. El rango global puede variar entre 0, completamente dependiente, y 100 puntos, completamente independiente (90 para pacientes limitados en silla de ruedas).
- c. Para los temas de deposición y micción, se deberá valorar la semana previa.

Para su interpretación, la puntuación se agrupa en grados de dependencia:

- | | | |
|---------------|--------------------|-----------------------|
| 1) Total < 20 | 2) Grave = 20 a 35 | 3) Moderada = 40 a 55 |
| 4) Leve > 60 | 5) Autónomo =100 | |

Parámetro	Situación del paciente.	Puntuación
Comer	Totalmente independiente.	10
	Necesita ayuda para cortar carne, pan, etc.	5
	Dependiente.	0
Levantarse	Independiente: entra y sale solo del baño.	5
	Dependiente.	0
Vestirse	Independiente: capaz de ponerse y de quitarse la ropa, abotonarse, atarse los zapatos.	10
	Necesita ayuda.	5
	Dependiente.	0
Arreglarse	Independiente para lavarse la cara, las manos, peinarse, afeitarse, maquillarse, etc.	5
	Dependiente.	0
Deposición	Continencia normal.	10
	Ocasionalmente algún episodio de incontinencia, o necesita ayuda para administrarse supositorios o lavativas.	5
	Incontinencia.	0
Micción	Continencia normal, o es capaz de usar la sonda si tiene una puesta.	10
	Un episodio diario como máximo de incontinencia, o necesita ayuda para cuidar de la sonda.	5
	Incontinencia.	0
Usar el retrete	Independiente para ir al cuarto de aseo, quitarse y ponerse la ropa.	10
	Necesita ayuda para ir al retrete, pero se limpia solo.	5
	Dependiente.	0
Trasladarse	Independiente para ir del sillón a la cama.	15
	Mínima ayuda física o supervisión para hacerlo.	10
	Necesita gran ayuda, pero es capaz de mantenerse solo.	5
	Dependiente.	0
Deambular	Independiente, camina solo 50 metros.	15
	Necesita ayuda física o supervisión para caminar 50 metros.	10
	Independiente en silla de ruedas sin ayuda.	5
	Dependiente	0
Escalones	Independiente para bajar y subir escaleras.	10
	Necesita ayuda física o supervisión para hacerlo.	5
	Dependiente	0

Escalas de funcionalidad motora Brooke y Vignos

La escala de función motora de Brooke y Vignos se utiliza para evaluar los miembros superiores e inferiores, de la siguiente tabla (Lue *et al.*, 2006).

Miembros Superiores (Brooke)
1. Partiendo de la posición de brazos colocados a lo largo del cuerpo, puede abducir los brazos en un círculo completo hasta que se tocan por encima de la cabeza.
2. Puede elevar los brazos por encima de la cabeza, pero solo flexionando los codos.
3. No puede levantar las manos sobre la cabeza, pero puede llevar un vaso de agua a la boca (usando dos manos si es necesario).
4. No puede llevar la mano a la boca pero puede sostener un bolígrafo o coger una moneda de una mesa.
5. No tiene ninguna función útil con la mano.
Miembros inferiores (Vignos)
1. Camina y sube escaleras sin ayuda.
2. Camina y sube escaleras con ayuda o pasamanos.
3. Camina y sube escaleras lentamente con ayuda de pasamanos (tarda más de 12 segundos en subir cuatro escalones).
4. Camina sin ayuda y se levanta de una silla pero no puede subir escaleras.
5. Camina sin ayuda pero no puede levantarse de una silla ni subir escaleras.
6. Camina solamente con ayuda de órtesis largas.
7. Camina con órtesis largas pero necesita ayuda para mantener el equilibrio.
8. Se sostiene de pie con órtesis pero no puede caminar ni con ayuda.
9. En silla de ruedas.
10. Confinado en cama.

Escala NorthStar

Desarrollado para medir la capacidad motora funcional en los niños ambulatorios con DMD (Ergul *et al.*, 2012).

Tipo de Prueba	2 puntos	1 punto	0 puntos	Comentarios
1. Estar de pie	Está de pie recto, inmóvil y simétricamente, sin compensación (con los talones en el suelo y las piernas en neutral) con un conteo mínimo de 3 segundos.	Está de pie quieto, pero con cierto grado de compensación (por ejemplo, con los dedos o con las piernas extendidas o con la parte inferior sobresaliente) con un conteo mínimo de 3 segundos.	No puede estar de pie quieto o de forma independiente, necesita apoyo (aunque mínimo)	
2. Caminar	Camina con un patrón de marcha talón-punta del pie o pie plano.	Persistente o habitual andar de puntas, incapaz de marcha talón-punta del pie consistentemente.	Pérdida de la ambulaci3n independiente. Puede utilizar 3rtosis o camina distancias cortas con asistencia	
3. Levantarse de una silla	Mantiene los brazos cruzados. Posici3n inicial de 90 ° de caderas y rodillas, los pies en el suelo / apoyados en una caja escal3n.	Se ayuda de apoyarse en los muslos /silla /o propenso a voltearse o alterar la posici3n inicial mediante la ampliaci3n de la base.	Incapaz	
4. Pararse sobre una pierna - derecha	Capaz de permanecer de pie de forma relajada (sin fijaci3n) para un conteo de 3 segundos.	Está de pie pero ya sea momentáneamente o con flexi3n lateral del tronco o necesidad de fijaci3n, por ejemplo, muslos desdoblados u otros trucos.	Incapaz	
5. Pararse sobre una pierna - izquierda	Capaz de permanecer de pie de forma relajada (sin fijaci3n) para un conteo de 3 segundos.	Está de pie pero ya sea momentáneamente o con flexi3n lateral del tronco o necesidad de fijaci3n, por ejemplo, muslos desdoblados u otros trucos.	Incapaz	
6. Subir una caja escal3n -derecha.	Un paso de frente-ningún apoyo necesario.	Se va hacia un lado / rota el tronco / movimiento circular de la cadera o necesita apoyo.	Incapaz	
7. Subir una caja escal3n - izquierda	Un paso de frente-ningún apoyo necesario.	Se va hacia un lado / rota el tronco / movimiento circular de la cadera o necesita apoyo.	Incapaz	
8. Descender de caja escal3n - derecha	Mira hacia delante, desciende controlando el peso de la pierna. No apoyo necesario.	Ve a los lados, salta hacia abajo o necesita apoyo.	Incapaz	

9. Descender de caja escalón - izquierda	Mira hacia delante, desciende controlando el peso de la pierna. No apoyo necesario.	Ve a los lados, salta hacia abajo o necesita apoyo.	Incapaz	
10. Sentarse	Comienza en posición supina - puede usar una mano / brazo para empujarse.	Utiliza los dos brazos / empuja con las piernas o se voltea hacia el piso.	Incapaz	
11. Levantarse del suelo	No hay evidencia de maniobra de Gower's.	Muestra al menos uno de los componentes descritos en la página 2- en particular rodarse hacia el piso y / o uso de la mano (s) en las piernas.	(a) NECESITA apoyo externo de un objeto, por ejemplo una silla O (b) Incapaz	Tiempo (segundos) ---
12. Levantar la cabeza	En posición supina, la cabeza debe ser levantada en la línea media. Mueve la barbilla hacia el pecho.	La cabeza se levantó a través de flexión lateral o sin flexión del cuello.	Incapaz	
13. Pararse en los talones	Ambos pies al mismo tiempo, evidentemente coloca solamente los talones (aceptable moverse un poco para mantener el equilibrio) para un conteo de 3 segundos.	Solo levanta la parte delantera del pie o solo logra la dorsiflexión del pie.	Incapaz	
14. Saltar	Ambos pies al mismo tiempo, despegarlos del suelo simultáneamente.	Un pie tras otro (saltar) o no es totalmente claro los dos pies al mismo tiempo.	Incapaz	
15. Saltar con pierna derecha	Despega parte delantera del pie y el talón del piso.	Capaz de doblar las rodillas y levantar el talón, sin despegarse del suelo.	Incapaz	
16. Saltar con pierna izquierda	Despega parte delantera del pie y el talón del piso.	Capaz de doblar las rodillas y levantar el talón, sin despegarse del suelo.	Incapaz	
17. Correr (10m)	Ambos pies despegados del suelo (sin fase de apoyo doble durante marcha).	'Caminata Duchenne'.	Caminar	Tiempo (segundos) ---
				TOTAL= /34 puntos

Pruebas cronometradas

Las pruebas cronometradas en la realización de ciertas tareas motoras son utilizadas como medida de evaluación clínica en las visitas clínicas rutinarias (Bushby *et al.*, 2010)

El tiempo para realizar la tarea es medido en segundos con cronómetro. Una tarea es considerada fallida cuando el sujeto fue incapaz de completarla dentro de un límite de 120 segundos.

- Ponerse de pie desde una posición recostada (maniobra de Gower's).
- Subir 4 escalones (comenzando y terminando de pie, con los brazos a los lados).
- Correr o caminar 10 metros.
- Ponerse de pie desde una posición sentada en una silla (la altura de la silla debe permitir que los pies toquen el suelo)
- Ponerse una playera (sentado en una silla)

Por otra parte, está el test de marcha de los 6 minutos, en la que se le pide al paciente caminar durante 6 minutos y se mide la cantidad de metros recorridos durante ese tiempo. Es utilizada para evaluar la progresión de la enfermedad en pacientes ambulatorios con DMD.

Glosario

AP-1	Proteína activadora 1
CK	Creatina cinasa
CTAB	Bromuro cetiltrimetilamonio
DMB	Distrofia muscular de Becker
DMD	Distrofia muscular Duchenne
DTAB	Bromuro dodeciltrimetilamonio
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas
GR	Receptor de glucocorticoides
GRE	Elementos de respuesta a glucocorticoides
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IL-1 β	Interleucina 1 beta
MDSTARnet	Red de investigación, seguimiento y vigilancia de distrofia muscular
MEC	Matriz extracelular
MMP9	Metaloproteasa de matriz 9
MMP2	Metaloproteasa de matriz 2
nGRE	Elementos de respuesta a glucocorticoides negativos
NSAA	Evaluación ambulatoria estrella del norte
PCR RT	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
Mdx	Ratón con deficiencia de distrofina
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
RIQ	Rango intercuartilico
TBE	Buffer tris-borato-ácido etilendiaminotetraacético
TE	Tris-ácido clorhídrico con EDTA
TIMP1	Inhibidor tisular de metaloproteasas 1
TMB	Tetrametilbencidina
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa

Bibliografía

Aartsma-Rus, A., Van Deutekom, J.C., Fokkema, I.F., Van Ommen, G.J., Den Dunnen, J.T., 2006. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle & nerve* 34, 135-144.

Allen, R.E., Sheehan, S.M., Taylor, R.G., Kendall, T.L., Rice, G.M., 1995. Hepatocyte growth factor activates quiescent skeletal muscle satellite cells in vitro. *Journal of cellular physiology* 165, 307-312.

Biggar, W.D., 2006. Duchenne muscular dystrophy. *Pediatrics in review / American Academy of Pediatrics* 27, 83-88.

Birkedal-Hansen, H., 1995. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Current opinion in cell biology* 7, 728-735.

Bonnema, D.D., Webb, C.S., Pennington, W.R., Stroud, R.E., Leonardi, A.E., Clark, L.L., McClure, C.D., Finklea, L., Spinale, F.G., Zile, M.R., 2007. Effects of age on plasma matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs). *Journal of cardiac failure* 13, 530-540.

Bushby, K., Finkel, R., Birnkrant, D.J., Case, L.E., Clemens, P.R., Cripe, L., Kaul, A., Kinnett, K., McDonald, C., Pandya, S., Poysky, J., Shapiro, F., Tomezsko, J., Constantin, C., 2010. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *The Lancet. Neurology* 9, 77-93.

Carmeli, E., Moas, M., Reznick, A.Z., Coleman, R., 2004. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle & nerve* 29, 191-197.

Coffa, J., van de Wiel, M.A., Diosdado, B., Carvalho, B., Schouten, J., Meijer, G.A., 2008. MLPAnalyzer: data analysis tool for reliable automated normalization of MLPA fragment data. *Cellular oncology : the official journal of the International Society for Cellular Oncology* 30, 323-335.

Coral, V., Ruano, C., Gomez, D., Fernández, V., Bahena, M., 2010. Distrofias musculares en México: un enfoque clínico, bioquímico y molecular. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas* 15.

Chen, X., Li, Y., 2009. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis. *Cell adhesion & migration* 3, 337-341.

Chin, J.R., Werb, Z., 1997. Matrix metalloproteinases regulate morphogenesis, migration and remodeling of epithelium, tongue skeletal muscle and cartilage in the mandibular arch. *Development* 124, 1519-1530.

Ergul, Y., Ekici, B., Nisli, K., Tatli, B., Binboga, F., Acar, G., Ozmen, M., Omeroglu, R.E., 2012. Evaluation of the North Star Ambulatory Assessment scale and cardiac abnormalities in ambulant boys with Duchenne muscular dystrophy. *Journal of paediatrics and child health* 48, 610-616.

Fukushima, K., Nakamura, A., Ueda, H., Yuasa, K., Yoshida, K., Takeda, S., Ikeda, S., 2007. Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CXMDJ). *BMC musculoskeletal disorders* 8, 54.

Gomez-Diaz, B., Rosas-Vargas, H., Roque-Ramirez, B., Meza-Espinoza, P., Ruano-Calderon, L.A., Fernandez-Valverde, F., Escalante-Bautista, D., Escobar-Cedillo, R.E., Sanchez-Chapul, L., Vargas-Canas, S., Lopez-Hernandez, L.B., Bahena-Martinez, E., Luna-Angulo, A.B., Canto, P., Coral-Vazquez, R.M., 2012. Immunodetection analysis of muscular dystrophies in Mexico. *Muscle & nerve* 45, 338-345.

Gosselin, L.E., Williams, J.E., Personius, K., Farkas, G.A., 2007. A comparison of factors associated with collagen metabolism in different skeletal muscles from dystrophic (mdx) mice: impact of pirfenidone. *Muscle & nerve* 35, 208-216.

Hoffman, E.P., Reeves, E., Damsker, J., Nagaraju, K., McCall, J.M., Connor, E.M., Bushby, K., 2012. Novel approaches to corticosteroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America* 23, 821-828.

Kherif, S., Lafuma, C., Dehaupas, M., Lachkar, S., Fournier, J.G., Verdiere-Sahuque, M., Fardeau, M., Alameddine, H.S., 1999. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Developmental biology* 205, 158-170.

Li, H., Mittal, A., Makonchuk, D.Y., Bhatnagar, S., Kumar, A., 2009. Matrix metalloproteinase-9 inhibition ameliorates pathogenesis and improves skeletal muscle regeneration in muscular dystrophy. *Human molecular genetics* 18, 2584-2598.

Lopez-Hernandez, L.B., Ayala-Madrigal, M.L., van Heusden, D., Estrada-Mena, F.J., Canto, P., Sandoval-Ramirez, L., Gomez-Diaz, B., Coral-Vazquez, R.M., 2011. [Improvements in the diagnosis of dystrophinopathies: what have we learnt in these last 20 years?]. *Revista de neurologia* 52, 239-249.

Lopez-Hernandez, L.B., Vazquez-Cardenas, N.A., Luna-Padron, E., 2009. [Duchenne muscular dystrophy: current aspects and perspectives on treatment]. *Revista de neurologia* 49, 369-375.

Lue, Y.J., Su, C.Y., Yang, R.C., Su, W.L., Lu, Y.M., Lin, R.F., Chen, S.S., 2006. Development and validation of a muscular dystrophy-specific functional rating scale. *Clinical rehabilitation* 20, 804-817.

Ma, H.P., Li, W., Liu, X.M., 2014. Matrix metalloproteinase 9 is involved in airway inflammation in cough variant asthma. *Experimental and therapeutic medicine* 8, 1197-1200.

Mann, C.J., Perdiguero, E., Kharraz, Y., Aguilar, S., Pessina, P., Serrano, A.L., Munoz-Canoves, P., 2011. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skeletal muscle* 1, 21.

Manzur, A.Y., Kuntzer, T., Pike, M., Swan, A., 2008. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *The Cochrane database of systematic reviews*, CD003725.

Martin, C., Hiller, M., Spitali, P., Oonk, S., Dalebout, H., 2014. Fibronectin is a serum biomarker for Duchenne muscular dystrophy. *Proteomics* 8, 269-278.

Mathews, K.D., Cunniff, C., Kantamneni, J.R., Ciafaloni, E., Miller, T., Matthews, D., Cwik, V., Druschel, C., Miller, L., Meaney, F.J., Sladky, J., Romitti, P.A., 2010. Muscular Dystrophy Surveillance Tracking and Research Network (MD STARnet): case definition in surveillance for childhood-onset Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Journal of child neurology* 25, 1098-1102.

Mauro, A., 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 9, 493-495.

Mauviel, A., 1993. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *Journal of cellular biochemistry* 53, 288-295.

Mazzone, E.S., Pane, M., Sormani, M.P., Scalise, R., Berardinelli, A., Messina, S., Torrente, Y., D'Amico, A., Doglio, L., Viggiano, E., D'Ambrosio, P., Cavallaro, F., Frosini, S., Bello, L., Bonfiglio, S., De Sanctis, R., Rolle, E., Bianco, F., Magri, F., Rossi, F., Vasco, G., Vita, G., Motta, M.C., Donati, M.A., Sacchini, M., Mongini, T., Pini, A., Battini, R., Pegoraro, E., Previtali, S., Napolitano, S., Bruno, C., Politano, L., Comi, G.P., Bertini, E., Mercuri, E., 2013. 24 month longitudinal data in ambulant boys with Duchenne muscular dystrophy. *PloS one* 8, e52512.

McAdam, L.C., Mayo, A.L., Alman, B.A., Biggar, W.D., 2012. The Canadian experience with long-term deflazacort treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology / edited by the Gaetano Conte Academy for the study of striated muscle diseases* 31, 16-20.

McDonald, C.M., Henricson, E.K., Abresch, R.T., Florence, J.M., Eagle, M., Gappmaier, E., Glanzman, A.M., Spiegel, R., Barth, J., Elfring, G., Reha, A., Peltz, S., 2013. The 6-minute walk test and other endpoints in Duchenne muscular dystrophy: longitudinal natural history observations over 48 weeks from a multicenter study. *Muscle & nerve* 48, 343-356.

Montañez, R., Bermúdez, C., Coral, V., Arenas, D., Peñaloza, L., Romo, Y., Martínez, A., Rendon, A., 2009. La distrofia muscular de Duchenne: aspectos clínicos y moleculares., in: Editores, D.R. (Ed.), *En Neurobiología de los Trastornos Neuropsiquiátricos más Prevalentes en México.*, pp. 296-338.

Mott, J.D., Werb, Z., 2004. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Current opinion in cell biology* 16, 558-564.

Moxley, R.T., 3rd, Pandya, S., Ciafaloni, E., Fox, D.J., Campbell, K., 2010. Change in natural history of Duchenne muscular dystrophy with long-term corticosteroid treatment: implications for management. *Journal of child neurology* 25, 1116-1129.

Pérez, L., Prieto, S., 2006. *Protocolos de Endocrinología. Trastornos de la pubertad.* BOL PEDIATR 46, 265-272.

Proano-Perez, F., Benitez-Ortiz, W., Desmecht, D., Coral, M., Ortiz, J., Ron, L., Portaels, F., Rigouts, L., Linden, A., 2011. Post-mortem examination and laboratory-based analysis for the diagnosis of bovine tuberculosis among dairy cattle in Ecuador. *Preventive veterinary medicine* 101, 65-72.

Robertson, T.A., Maley, M.A., Grounds, M.D., Papadimitriou, J.M., 1993. The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. *Experimental cell research* 207, 321-331.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., 1989. *Gel electroforesis of DNA. Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, capítulo 6.

Shah, S., Vanclay, F., Cooper, B., 1989. Improving the sensitivity of the Barthel Index for stroke rehabilitation. *Journal of clinical epidemiology* 42, 703-709.

Scheuerbrandt, G., 2013. Research approaches for a Therapy of Duchenne Muscular Dystrophy. Part 1: Exon Skipping, Parent Project Muscular Dystrophy; TREAT-NMD, pp. 1-23.

Tatsumi, R., Anderson, J.E., Nevoret, C.J., Halevy, O., Allen, R.E., 1998. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Developmental biology* 194, 114-128.

Tidball, J.G., 2005. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 288, R345-353.

Vazquez-Cardenas, N.A., Ibarra-Hernandez, F., Lopez-Hernandez, L.B., Escobar-Cedillo, R.E., Ruano-Calderon, L.A., Gomez-Diaz, B., Garcia-Calderon, N., Carriedo-Davila, M.F., Rojas-Hurtado, L.G., Luna-Padron, E., Coral-Vazquez, R.M., 2013. [Diagnosis and treatment with steroids for patients with Duchenne muscular dystrophy: experience and recommendations for Mexico. *Administracion del Patrimonio de la Beneficencia Publica. Asociacion de Distrofia Muscular de Occidente*]. *Revista de neurologia* 57, 455-462.

Vázquez, C., Ibarra, H., López, H., Escobar, C., Ruano, C., Gómez, D., García, C., Carriedo-Davila, M.F., Rojas, H., Luna, P., Coral, V., 2013. Diagnóstico y tratamiento con esteroides de pacientes con distrofia muscular de Duchenne: experiencia y recomendaciones para México. *Revista de neurologia* 10, 455-462.

Visse, R., Nagase, H., 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research* 92, 827-839.

Vu, T.H., Werb, Z., 2000. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes & development* 14, 2123-2133.

Wu, Z.S., Wu, Q., Yang, J.H., Wang, H.Q., Ding, X.D., Yang, F., Xu, X.C., 2008. Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 122, 2050-2056.

Yamada, H., Saito, F., Fukuta-Ohi, H., Zhong, D., Hase, A., Arai, K., Okuyama, A., Maekawa, R., Shimizu, T., Matsumura, K., 2001. Processing of beta-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. *Human molecular genetics* 10, 1563-1569.

Zatz, M., Rapaport, D., Vainzof, M., Passos-Bueno, M.R., Bortolini, E.R., Pavanello Rde, C., Peres, C.A., 1991. Serum creatine-kinase (CK) and pyruvate-kinase (PK) activities in Duchenne (DMD) as compared with Becker (BMD) muscular dystrophy. *Journal of the neurological sciences* 102, 190-196.

Zhang, Q., Joshi, S.K., Lovett, D.H., Zhang, B., Bodine, S., Kim, H., Liu, X., 2014. Matrix metalloproteinase-2 plays a critical role in overload induced skeletal muscle hypertrophy. *Muscles, ligaments and tendons journal* 4, 362-370.

Zhong, D., Saito, F., Saito, Y., Nakamura, A., Shimizu, T., Matsumura, K., 2006. Characterization of the protease activity that cleaves the extracellular domain of beta-dystroglycan. *Biochemical and biophysical research communications* 345, 867-871.

Zimowska, M., Brzoska, E., Swierczynska, M., Streminska, W., Moraczewski, J., 2008. Distinct patterns of MMP9 and MMP2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration in vivo. *The International journal of developmental biology* 52, 307-314.