



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGÍA

**Evaluación de Miostatina y Folistatina como
biomarcadores séricos del progreso de la
Distrofia Muscular Duchenne en pacientes
tratados con deflazacort.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A:

LUIS ANGEL MONTES ALMANZA

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. LUZ BERENICE LÓPEZ HERNÁNDEZ
HERNÁNDEZ**

ASESORA INTERNA: DRA. JUANA MONROY MORENO

Noviembre 2015

México, D. F.



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.

Resumen

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad muscular ligada al cromosoma x, causada por la ausencia de la proteína distrofina y expresándose como pérdida progresiva de masa muscular y su sustitución por tejido adiposo provocando finalmente la muerte de los pacientes. A pesar de que hay tratamientos actuales que mejoran la calidad y aumentan la expectativa de vida de los pacientes, como los corticoesteroides o glucocorticoides, el acceso a estas herramientas, igual que el diagnóstico molecular, se encuentra limitado por cuestiones económicas y por falta de información e incluso de capacitación especializada en médicos y profesionales de la salud. Debido a la falta de métodos no invasivos para diagnosticar la enfermedad, es importante establecer marcadores confiables y de fácil obtención como lo es suero sanguíneo. Miostatina y folistatina fueron seleccionados como posibles biomarcadores en pacientes con DMD, debido a su participación en el proceso desarrollo-degradación muscular, así como también la posible correlación en la progresión de la enfermedad con ayuda de pruebas clínicas utilizadas para su evaluación en los pacientes. La concentración de miostatina y folistatina fueron cuantificadas por medio de la prueba ELISA, utilizando 21 pacientes diagnosticados con DMD previos al tratamiento y con 3 y 6 meses posteriores al tratamiento, además de 17 controles sanos. La concentración de miostatina fue significativamente menor a los pacientes con DMD en comparación con controles sanos, mientras que las concentraciones de folistatina fueron significativamente mayor en pacientes en comparación con los controles. La concentración sérica de miostatina y folistatina no mostraron diferencias significativas en los pacientes antes del tratamiento a los 3 y 6 meses con el corticoide. 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. Con base en los resultados sugerimos que miostatina podría ser un biomarcador en la etapa temprana pero no en etapas avanzadas.

Índice

INTRODUCCIÓN.....	5
DISTORFIA MUSCULAR DUCHENNE Y FISIOPATOLOGIA	7
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	11
DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO.....	13
ESTEROIDES.....	17
DEFLAZACORT	19
BIOMARCADORES.....	22
TGF- β	23
LOS RECEPTORES DEL TGF- β	24
MIOSTATINA.....	27
ACTIVACIÓN DE MIOSTATINA	29
FOLISTATINA.....	31
JUSTIFICACIÓN	36
HIPOTESIS.....	37
OBJETIVO PRINCIPAL.....	37
OBJETIVOS PARTICULARES.....	37
MÉTODOS.....	38
Criterios inclusión-exclusión	39
EXTRACCIÓN DE ADN CTAB-DTAB (DETERGENTES CATIÓNICOS)	39
TÉCNICA CTAB/DTAB.....	40
TECNICA MLPA PARA IDENTIFICAR MUTACIONES.....	42
CUANTIFICACIÓN DE MIOSTATINA Y FOLISTATINA.....	45
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	49
RESULTADOS	50

DISCUSIÓN.....	60
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA.....	63

INTRODUCCIÓN

Las distrofias musculares son un conjunto de enfermedades caracterizadas por deterioro muscular progresivo resultado del mal funcionamiento de proteínas que conforman el complejo distrofina-glicoproteína (DGC, por sus siglas en ingles), que participan en la unión entre el citoesqueleto y la matriz extracelular, dichas uniones protegen a las células musculares del estrés mecánico durante la contracción. Coral-Vazquez, et al. (1993). Cuando se daña el sarcolema, la proteína creatina cinasa (CPK) se libera al torrente sanguíneo, como fuente de energía que se utiliza en la contracción muscular, cuando se encuentra elevada en sangre, es utilizada como indicador del daño muscular por algún proceso como la distrofia muscular. Sin embargo, existen condiciones fisiológicas como la fiebre o el esfuerzo muscular en exceso que incrementa la concentración de CPK sin una patología aparente. Cuando el sarcolema presenta alteraciones se incrementa la una mayor entrada de moléculas de calcio, lo cual degrada a las proteínas del DGC lo que resulta en la degeneración muscular progresiva y fibrosis en donde las fibras musculares son remplazadas por tejido adiposo y tejido conectivo (Cordone, et al. 1984) (Figura 1).

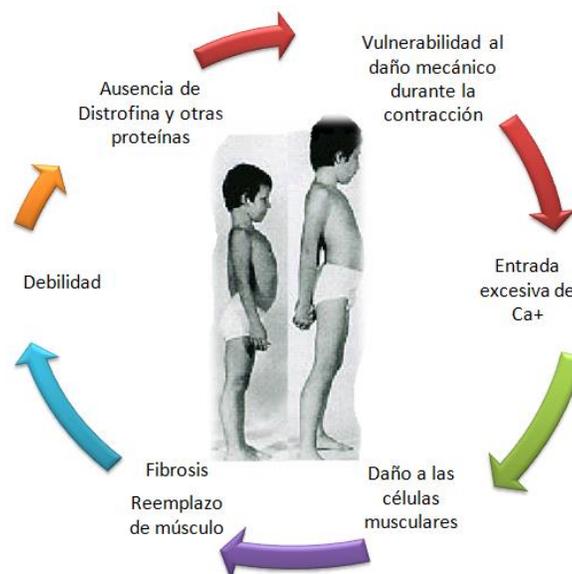


Figura 1. Proceso de desgaste muscular en la DMD (imagen de elaboración propia).

En México como en el resto de mundo, las distrofias musculares que se presentan con mayor incidencia son la de Duchenne (DMD) y Becker (BMD) denominadas distrofinopatías (figura 2) debido a que son resultado de la ausencia de distrofina, proteína estructural del músculo esquelético que brinda soporte y protección a las células musculares del daño causado durante la contracción Gomez-Diaz, et al. (2012); (Lopez-Hernandez, et al. 2009).

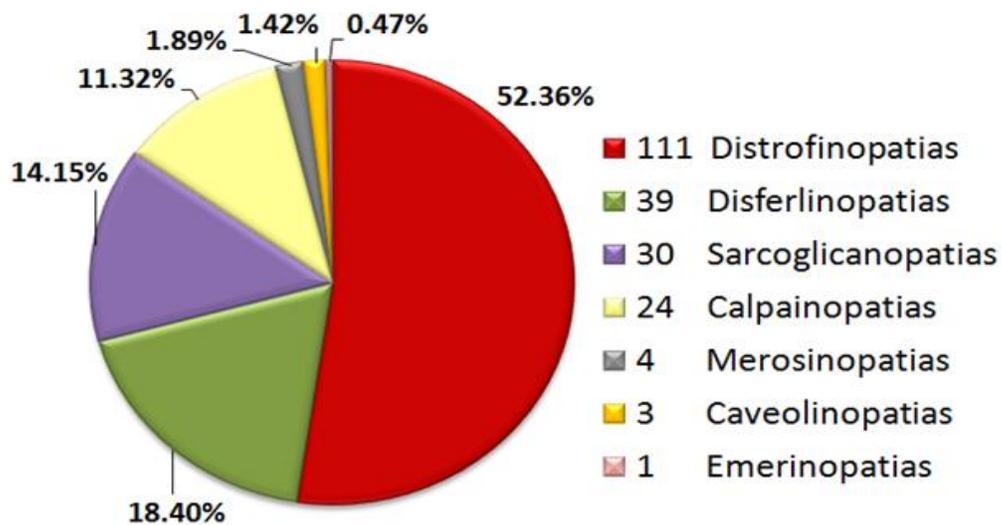


Figura 2. Distribución de la incidencia de enfermedades musculares en la población mexicana, distrofinopatías son las más frecuentes (Gomez-Diaz, et al. 2012).

Dicha enfermedad es de tipo genético ligada al cromosoma X, que presenta en mayor incidencia en niños varones (Spitali, et al. 2013).

Los pacientes con DMD muestran síntomas a muy temprana edad, empiezan a caminar después de los 18 meses de edad y presentan debilidad muscular, en general los pacientes son diagnosticados entre los 3 a 5 años de edad, tiene retraso en el desarrollo motor, fuerza muscular deteriorada, trastornos respiratorios debido a la debilidad muscular de la caja torácica y complicaciones cardíacas y entre los 8 y 12 años pierden la capacidad de caminar. Cuando la

enfermedad progresa los pacientes presentan escoliosis deformando la espalda en forma de “S” o “C” la edad promedio del fallecimiento del paciente es 18 a 19 años (Aartsma-Rus, et al. 2006a; Verma, et al. 2010).

DISTORFIA MUSCULAR DUCHENNE Y FISIOPATOLOGIA

La DMD cuya evolución es lenta y progresiva, se manifiesta afectando los músculos proximales y distales (figura 3) provocando debilidad muscular, es visible hipotrofia muscular principalmente de la cintura escapular y pélvica (Brooke, et al. 1989), y tiene una afección a 1 de cada 3.500 recién nacidos varones alrededor del mundo. Es una enfermedad resultado de mutaciones en el gen DMD o también llamado gen de la distrofina, ubicado en el locus Xp21 (Koenig, et al. 1987) (figura 3) que llevan a la interrupción del marco de lectura en la traducción de la proteína (Aartsma-Rus, et al. 2006b).

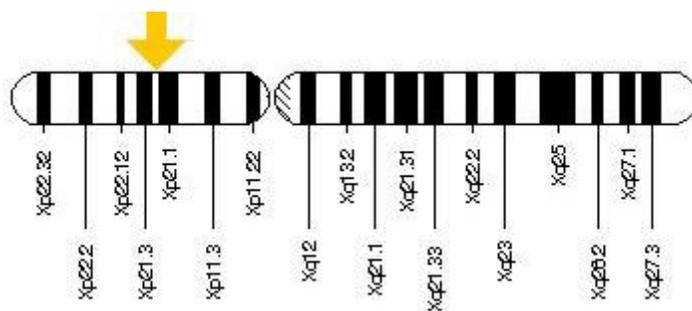


Figura 3. Ubicación del gen DMD. Localizado en el brazo corto (p) del cromosoma X, en la posición 21.2. con 79 exones (tomado de <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/DMD>).

Este gen posee 79 exones y su procesamiento para producir la proteína es complejo. Esto favorece la aparición de mutaciones espontaneas. La distrofina se expresa fundamentalmente en el músculo esquelético y cardíaco, existen isoformas que se expresan selectivamente en otros órganos como el cerebro, las células de Schwann en la retina. Esto justifica las manifestaciones no musculares asociadas a la DMD (Baumbach, et al. 1989). Esta se localiza en el sarcolema, en su cara interna, y tiene un peso molecular de 427kDa7 (figura 4).

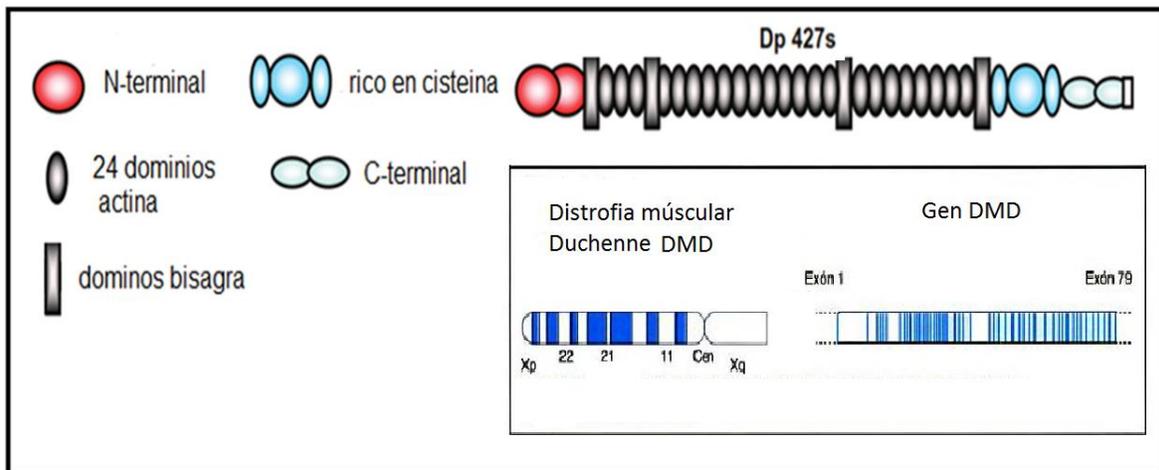


Figura 4.- Se muestra la isoforma Dp 427s con su región amino terminal, los 24 repetidos de actina, dominio bisagra, el dominio rico en cisteína y su región carboxilo terminal, de la proteína distrofina, el gen DMD formado por 79 exones localizada en el locus Xp21(Solari 2004).

Se divide en 4 dominios: el amino-terminal la une a la actina; el dominio en cilíndrico es el más amplio; el dominio rico en cisteína que contiene los sitios de anclaje al beta-distroglicano de la membrana y, por último, el dominio carboxil-terminal contacta con la distrobrevina (Ervasti and Campbell 1993; Mendell, et al. 2010). De esta forma, además de dar estabilidad y soporte estructural, la distrofina supone un enlace indirecto entre la matriz extracelular y el aparato contráctil de la fibra muscular (Manzur, et al. 2008).

Cuando el sarcolema se ve expuesta a falta de distrofina, es susceptible a daños causados por contracciones musculares (Ervasti, et al. 1990), hay un exceso de calcio, y estimula la activación de calpainas, proteasas que degradan las

proteínas contráctiles que activan otras proteasas dentro de la célula (figura 5). La proteasa termina con la muerte celular de miocitos, necrosis, inflamación y fibrosis de reemplazo. La fibra se necrosa y los intentos de regeneración muscular son insuficientes hasta que gran parte del tejido muscular normal es sustituido por tejido fibro-adiposo (Anthony, et al. 2014).

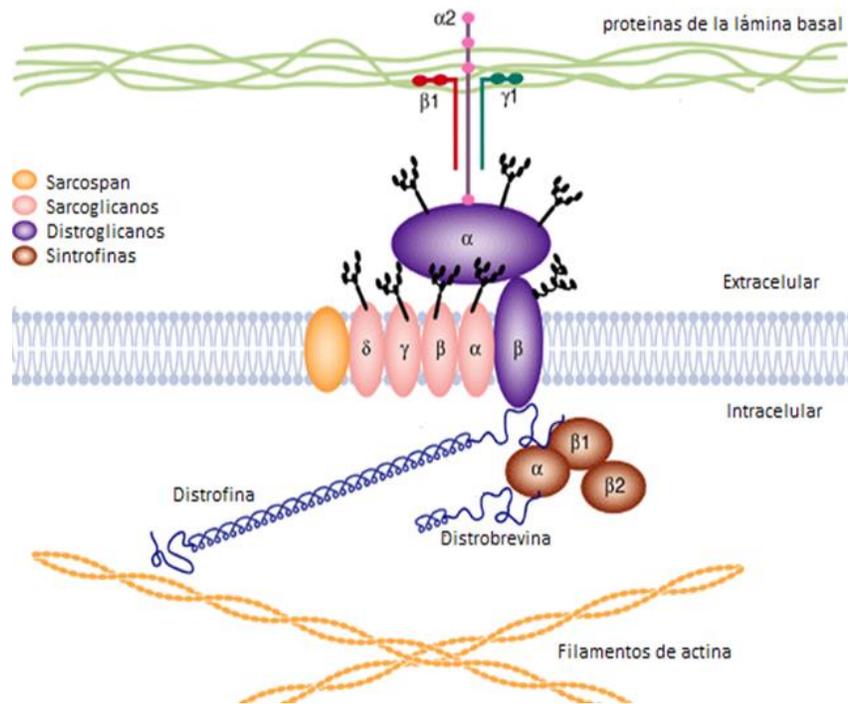


Figura 5.- Esquema del complejo Distrofina-Glicoproteínas. Se observa la proteína distrofina asociada en un extremo a la F-actina y en su otro extremo, al beta-distroglucano. De esta manera la proteína distrofina proporciona el acoplamiento mecánico entre el sarcolema y el citoesqueleto de la fibra muscular (Scheuerbrandt 2013).

Estos procesos que inducen a necrosis, regeneración e infiltración de grasa son visibles en la biopsia muscular y constituyen el patrón muscular distrófico.

Los síntomas generalmente aparecen antes de los 6 años de edad haciéndose presente la debilidad muscular, en piernas pelvis, pero también se presenta con menos gravedad en brazos, cuello y músculos torácicos (Biggar 2006). La dificultad en habilidades motoras como correr, bailar, saltar, las caídas frecuentes, la dificultad para levantarse de una posición acostado o para subir escalas, estas la progresión es rápida y la capacidad motriz se puede perder hacia los 12 años de edad y el niño tendrá que usar una silla de ruedas (Biggar, et al. 2002; Ohlendieck, et al. 1993), la debilidad en los músculos de la caja torácica complica las funciones respiratorias, desarrollando a través de los años cardiopatías, siendo factor de mortandad en los pacientes afectados con Duchenne (Soltanzadeh, et al. 2010).

Independientemente del tipo de mutación, la aparición de signos y síntomas en DMD, la alteración genética rompe el marco de lectura del ARNm que sintetiza la proteína, de manera que su síntesis se interrumpe y la proteína sintetizada es degradada. En caso de que no rompa el marco de lectura, se produce la proteína en menor cantidad o parcialmente funcional, lo que origina otro tipo de distrofinopatías de fenotipo más leve como la distrofia muscular de Becker (Hoffman, et al. 1988), dando como resultado los fenotipos distrofos y las deficiencias físicas y mecánicas.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

El fenotipo resultante en pacientes con DMD es caracterizada por pérdida en la función muscular, principalmente de músculo esquelético y cardíaco. Los músculos se ven afectados desde el nacimiento, los músculos proximales denotan como primeros indicios de la enfermedad entre los tres y cinco años de edad, se distorsiona la marcha, caídas frecuentes y dificultad para elevar los brazos, y una pseudo hipertrofia de pantorrilla debido a la sustitución de las fibras musculares por tejido conectivo y grasa. La cintura pélvica se ve afectada como primer grupo muscular, seguido por los de la cintura escapular y las pantorrillas. La maniobra de Gower's es una prueba que se aplica a los pacientes que presentan distrofias musculares mostrando las dificultades para caminar en superficies irregulares, andar lento y las altas complicaciones para incorporarse desde el suelo (Figura 6), complicando las actividades como saltar, subir escaleras, entre otras (Biggar 2006); (Coral, et al. 2010).



Figura 6. 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 (tomado de: <http://www.treat-nmd.eu/diagnosis-and-management-of-DMD>).

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-Hernandez, 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).

DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO

En el diagnóstico de los pacientes con DMD se considera tres factores que son la edad de aparición de los síntomas clínicos, la distribución de la debilidad muscular y la historia familiar. Posteriormente el médico tratante toma como referencia la evaluación de concentración sérica de CPK que es considerada hasta el momento como el principal marcador bioquímico para diagnosticar a un paciente con DMD, CPK en etapas iniciales se presenta con un aumento aproximado de 10 veces más respecto a los valores reportados como normales (10 a 120 µg/l), mientras que en la etapa final se reduce significativamente debido a la pérdida de masa muscular. En todos los casos el diagnóstico es confirmado con la detección de mutaciones en el gen DMD mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR TR) de ADN genómico para la identificación de las mutaciones y amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación MLPA (Bushby, et al. 2010); (Lopez-Hernandez, et al. 2011).

En la biopsia muscular se verifica la ausencia de proteína distrofina en músculo esquelético lo que muestra alteraciones distroficas como núcleos centrales y presencia de infiltrado fibroso evidenciando la pérdida de la forma poligonal en el corte transversal (Gomez-Diaz, et al. 2012), el fragmento de músculo es aproximadamente 1 x 0.5 cm. generalmente puede ser colectada de deltoides, bíceps braquial o vasto lateral, analizadas por inmunohistoquímica que es una técnica de identificación de moléculas directamente en el corte de biopsia y el inmunoblot donde se separan moléculas por medio de electroforesis para determinar la presencia de distrofina así como su tamaño (Gomez-Diaz, Rosas-

Vargas et al. 2012). La biopsia examina la cantidad y la composición de la proteína distrofina en el músculo (Sewry, et al. 1994). Si una persona tiene distrofia muscular Duchenne si tiene menos del 3% de la cantidad prevista de proteína. Estas pruebas son necesarias en el diagnóstico de distrofinopatías como DMD, y no ser confundida con alguna otra distrofia muscular, sirviendo de igual manera para saber que personas podrían ser portadoras.

Existe una red de investigación, seguimiento y vigilancia de distrofia muscular (MD STARnet) que 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.- Explica los criterios establecidos por la STARnet para determinar el diagnóstico en DMD en posible cuando hay indicios físicos y niveles de CPK elevados, probable cuando las condiciones de un diagnóstico probable se le suma antecedentes familiares o alteraciones en distrofina y definitivo cuando se corrobora la mutación y la ausencia de Distrofina aunado a los puntos anteriores (Mathews, et al. 2010).

Definitivo	<p>Un caso “definitivo” presentó los síntomas clínicos atribuibles a una distrofinopatías 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	-Tiene concentraciones elevadas de CK, más antecedentes familiares, o alteraciones en la distrofina, pero carece del resto de los elementos.
Posible	-Altas concentraciones de CK y ninguna información adicional.

El diagnóstico clínicos se basa en síntomas distintivos de la enfermedad, como la pérdida de reflejos, marcha de pato, caídas frecuentes la torpeza especialmente al correr, la dificultad al levantarse de una posición sentada o acostada o al subir escaleras, los cambios posturales en general, la dificultad respiratoria, debilidad pulmonar y cardiomiopatía (Soltanzadeh, et al. 2010).

Actualmente no se tiene un tratamiento específico que erradique la enfermedad; sin embargo es de gran importancia dar un manejo integral al paciente con DMD, con la finalidad de otorgarles una mejor calidad de vida (Rideau, et al. 1995), posterior al diagnóstico, se debe establecer un manejo multidisciplinario, involucrando diferentes especialidades como son: rehabilitación, ortopedia, cardiología, neurología, neumología, gastroenterología/nutrición, anestesia (en caso de eventos quirúrgicos y cuidados de emergencia) Psicología, Genética, etc. (Birnkranz, et al. 2010) Dicho manejo dependerá de la etapa de evolución en la que se encuentre cada paciente, a reserva de proporcionarle apoyo continuo a través de valoraciones médicas, educación, seguimiento familiar y asesoramiento genético.

El manejo clínico de pacientes diagnosticados con DMD, es prolongar la ambulación y dar una mejor calidad de vida. La terapia física y el estiramiento muscular diario, pueden eliminar la necesidad de liberación quirúrgica de contracturas. El uso regular de un espirómetro prolonga la función pulmonar. La función pulmonar, la presión inspiratoria negativa y la capacidad vital forzada debe ser monitoreada conforme avanza la enfermedad (Birnkranz, et al. 2010).

La escoliosis (es una condición que causa una curvatura de lado a lado en la columna vertebral, la curvatura puede tener forma de "S" o "C".) se manifiesta después de que los pacientes han estado dependientes de una silla de ruedas por al menos uno o dos años. La cirugía utilizada en el tratamiento de la escoliosis, consiste en la corrección de la columna vertebral por medio de injertos óseos, provocando al paciente mejore su postural al sentarse y en su función pulmonar.

La cardiomiopatía clínica se desarrolla en la etapa final de la enfermedad. No hay recomendaciones específicas para la cardiomiopatía distrófica, aunque se recomienda tratamiento con inhibidores de enzima convertidor de angiotensina, con o sin beta bloqueadores (Hsu and Quinlivan 2013).

Entre los distintos esfuerzos por desarrollar líneas de investigación para apoyar la DMD disminuyendo los daños propios del padecimiento, se han conformado distintos proyectos 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 así como los avances farmacológicos se encuentra la administración de glucocorticosteroides, retrasando la ambulación y la pérdida de movilidad en grupos musculares.

ESTEROIDES

Se ha demostrado que el único tratamiento farmacológico capaz de retardar la progresión en DMD son los glucocorticoides (GC), que proporcionan una mejoría inicial en la fuerza muscular y reducen la pérdida esperada de fuerza a lo largo del tiempo en varones con DMD y mejora la función en estos pacientes, como consecuencia se reduce el riesgo de presentar escoliosis, estabiliza la función pulmonar, y mejora la función cardíaca (Bushby and Griggs 2007). La mayor parte de la actividad glucocorticoidea está relacionada con la molécula de cortisol (o hidrocortisona) (Autret-Leca, et al. 2009) los GC son fármacos potentes y efectivos en la prevención y supresión de la inflamación causada por estímulos mecánicos, químicos, infecciosos e inmunológicos (Payne and Adcock 2001). El principal efecto antiinflamatorio de los GC se basa en la inhibición de la transcripción genética de numerosos genes que codifican proteínas proinflamatorias, como interleucinas (IL) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11 y 13, el factor de necrosis tumoral alfa, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), quimiocinas (IL-8, macrófagos, proteínas quimiotácticas de monocitos 1, 2, 3 y 4), moléculas de adhesión (molécula 1 de adhesión intracelular, molécula 1 de adhesión de células vasculares, E-selectina) y enzimas reguladoras de la síntesis de mediadores (óxido nítrico sintetasa inducible, ciclooxigenasa 2, fosfolipasa A2 [PLA2] citoplasmática)(Payne and Adcock 2001; Pelaia, et al. 2003). Los diferentes mecanismos moleculares (genómicos y no genómicos) a través de los cuales se

sabe que los GC pueden regular la transcripción genética se describirán ampliamente en esta revisión más adelante.

Se ha mostrado en humanos que la administración glucocorticoides aumentan la capacidad regenerativa del músculo, lo que permite sustituir el tejido dañado con nuevas miofibrillas (Verma, et al. 2010). El tratamiento con glucocorticoides es acompañado de efectos secundarios, como acné y cambios de personalidad, hirsutismo, retraso del crecimiento, sobrepeso y potencialmente osteoporosis.

Los GC empleados en el tratamiento paliativo de la DMD está la prednisona, prednisolona y deflazacort, 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).

Entre los glucocorticoides más aceptados en el tratamiento farmacológico en la DMD la prednisona con dosis diaria de 0.75mg/kg/ y el deflazacort 0.9 mg /kg (Biggar, et al. 2001), algunos estudios clínicos han mostrado que dichos fármacos prolongan la ambulación independiente (Moxley, et al. 2010).

DEFLAZACORT

El deflazacort es un GC derivado de oxazolina de la prednisolona con actividades anti-inflamatoria e inmunosupresor, por estas características el uso del fármaco retarda el deterioro muscular en pacientes con DMD, prolongando la ambulación entre 3-5 años, mejora la función de las extremidades superiores, la función pulmonar, retrasa la aparición de escoliosis (Balaban, et al. 2005; Bushby, et al. 2010; Manzur, et al. 2008) (Bushby, et al. 2010; 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 deambulación independiente, preserva la función cardíaca y respiratoria, disminuye la incidencia de escoliosis e incrementa la supervivencia.

Entre los efectos secundarios que se han descrito los pacientes con DMD son: aumento de peso, disminución de altura, hipertensión, acné, y cataratas, que en comparación con la prednisona, el deflazacort ha demostrado desarrollar efectos secundarios más sutiles como mejor conservación de la masa ósea, un menor aumento de peso, un mejor perfil de lípidos y menos intolerancia a la glucosa (Mott and Werb 2004). Bushby *et al.*, 2010 propone que en caso de que los efectos secundarios sean intolerables o muy graves la dosis sea disminuida entre 25 y 33%, alternar días, o interrupción gradual del fármaco aunque las mejoras físicas y motoras sean notorias.

EL deflazacort ejerce sus efectos mediante la unión al receptor de glucocorticoides (GR), intracitoplasmático específico (RG). El código genético del RG se encuentra en el brazo largo del cromosoma 5 (región 5q31-32), tiene una estructura genómica constituida por 9 exones y existen evidencias de 3 promotores distintos del gen11 (Leung and Bloom 2003). Aunque no está clara la razón del uso de diferentes promotores según el tipo celular, esta heterogeneidad podría estar

relacionada con diferentes formas de regulación específicas del RG según el tipo celular. Sin embargo todavía no se conocen con exactitud los aspectos más críticos de las propiedades antiinflamatorias de los GC, parece claro que los efectos inhibitorios sobre la síntesis de citocinas y quimiocinas son particularmente importantes en enfermedades inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa, GM-CSF, IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-8 y eotaxina (Payne and Adcock 2001).

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 2013).

La evidencia reportada en varios estudios sugiere que la sub-actividad de transactivación se asocia más con los efectos secundarios, mientras que la trans-represión se asocia con la eficacia clínica, debido a la actividad anti-inflamatoria (Hoffman, et al. 2012).

En 2001 se realizó un estudio para investigar si el glucocorticoide regula la expresión del gen miostatina, clonando un fragmento que contenía la región reguladora del gen humano de miostatina, se llevó a cabo en células c2 c12 que es una línea celular de mioblastos de ratón y células de musculo esquelético L6 con dexametasona, los efectos de la dexametasona se bloquearon cuando las células co-incubaron con el antagonista del receptor de glucocorticoide RU-486. Estos hallazgos sugieren que los glucocorticoides regulan al alza la expresión de miostatina mediante la inducción de la transcripción de genes, posiblemente a través de una vía mediada por el receptor de glucocorticoides. Este resultado nos sugiere que la atrofia muscular asociada a glucocorticoides podría deberse en parte a la regulación por incremento de la expresión de miostatina (Ma, et al. 2001).

Otro estudio de expresión génica mostró que genes implicados en la inhibición de TGF- β se encontraban modificados tras el tratamiento con glucocorticoides (Lit, et al. 2009), por lo que se plantea que miostatina también podría ser modificado, ya que el mecanismo de una interacción miostatina-glucocorticoide es desconocido.

BIOMARCADORES

Biomarcador o marcador biológico es aquel parámetro medible y cuantificable utilizada como indicador de un estado fisiológico, dichos parámetros se tienen que cuantificar y ser evaluadas como un indicador de un proceso biológico normal, estado patogénico o de respuesta a un tratamiento farmacológico. 2007); (2010; Kristic, et al. 2013).

Las distrofias musculares son enfermedades hereditarias caracterizadas por la debilidad muscular progresiva y pérdida del tejido muscular. Afectan a 1 de cada 600 personas. Constituyen alrededor de 30 patologías distinguibles por los patrones de distribución corporal, tipo de herencia, evolución, pronóstico, síndromes asociados y, principalmente, determinadas por el gen mutado responsable de la enfermedad. Es necesario identificar la distrofia porque, además de su diferente evolución, cada una de estas enfermedades responde de manera distinta a los tratamientos. Conocer el gen y las mutaciones permiten diseñar estrategias para corregir o sobrellevar la enfermedad.

En pacientes con DMD el único biomarcador utilizado es la CPK, siendo esta una de las pruebas no invasivas en los individuos con la patología, sin embargo, este biomarcador no es específico de la enfermedad por tal motivo puede generar falsos positivos. De tal manera que el tener un biomarcador utilizado en el diagnóstico de DMD permitirá conocer el pronóstico adecuado, preparar a la familia para implementar estrategias que optimicen la calidad de vida de los pacientes, con seguimiento fisioterapéutico y cirugías correctivas necesarias en diferentes etapas del desarrollo de la enfermedad.

TGF- β

Los factores de crecimiento son señales bioquímicas capaces de modificar las respuestas de las células del organismo. Están involucrados en el control del crecimiento y diferenciación celular. Muchos de estos factores se encuentran en la sangre y especialmente en las plaquetas (Dias, et al. 2009). Los Factores de crecimiento son péptidos, es decir, secuencias cortas de aminoácidos, que transmiten señales entre las células modulando su actividad. Dentro de los factores de crecimiento se encuentran los factores de crecimiento beta (TGF- β).

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es un grupo muy grande de proteínas multifuncionales donde incluye, activinas y a la proteína morfogénica de hueso (BMP) (Koinuma, et al. 2005). Los miembros de la familia del TGF- β regulan diferentes funciones celulares como proliferación, apoptosis, diferenciación, migración, y tienen un papel clave en el desarrollo del organismo. Se han descrito en mamíferos; TGF- β 1, 2 y 3, que son codificados por 3 genes independientes, el TGF- β 1 es el más finamente regulado, en casos como respuesta al estrés, daño tisular o en enfermedades inducidas por oncogenes y transactivadores virales (Huang, et al. 2011).

El TGF- β está implicado en varias patologías humanas, incluyendo desórdenes autoinmunes y vasculares, así como enfermedades fibróticas y cáncer. La activación del receptor del TGF- β propicia su fosforilación en residuos de serina/treonina y dispara la fosforilación de proteínas efectoras intracelulares (smad), que una vez activas se translocan al núcleo para inducir la transcripción de genes blanco, y así regular procesos y funciones celulares (Harrison, et al. 2004). Se están desarrollando novedosas estrategias terapéuticas encaminadas a corregir las alteraciones presentes en patologías que involucran al TGF- β como actor principal (Koinuma, et al. 2005).

Los factores de crecimiento más comunes en plasma y suero son TGF- β 1 y TGF- β 2, que son mediadores locales cuyas principales actividades son estimular la quimiotaxis y la mitosis de células osteoprogenitoras. También actúan sobre los osteoclastos inhibiendo la resorción ósea, actúan también sobre los fibroblastos, células endoteliales, etc. Asimismo, promueve la formación de matriz extracelular, posee pocos efectos en la migración de los fibroblastos, inhibe la proliferación de células epiteliales.

LOS RECEPTORES DEL TGF- β

Los receptores para los ligandos de la familia del TGF- β son transmembranales. Las señales de las tres isoformas del TGF- β son mediados por receptores funcionales de tipo I, que son los TGF- β RI con un peso molecular de 53 a 65 kDa, y el tipo II, TGF- β RII con un peso molecular de 83 a 110 kDa. Los receptores tipo I reciben otros nombres, uno de los cuales es quinasa tipo de receptor de activina (*activin receptor-like kinase*, ALK) (Takeda, et al. 2004). Existen algunas diferencias entre los receptores tipo I y II que se basan en la conservación de los dominios con actividad de quinasa y la presencia de un dominio serina/treonina que se encuentra anclado a la membrana en el receptor tipo I y el cual es crítico para su activación (Agarwal, et al. 2015).

Respecto a la cooperación entre TGF- β RI y TGF- β RII, existe una dependencia funcional entre ambos; el receptor TGF- β RI requiere de TGF- β RII para unirse al ligando, mientras que TGF- β RII requiere de TGF- β RI para la señalización funcional. En presencia del TGF- β , TGF- β RI y TGF- β RII tienen la habilidad para interactuar uno con otro y formar un complejo tetramérico a través del cual se transducen las señales (de longh, et al. 2004) Las regiones intracelulares de

ambos receptores tienen funciones distintas y ambas son necesarias para la transducción de señales (Stewart, et al. 2010). Las regiones transmembranal y extracelular son requeridas por TGF- β RI y TGF- β RII para la activación dependiente del ligando. La unión del TGF- β estabiliza el complejo y genera respuestas fisiológicas adecuadas en una forma dependiente del ligando. La expresión anormal de TGF- β RI y TGF- β RII puede contribuir a la formación de complejos activos, produciendo una señalización independiente del ligando y, en consecuencia, respuestas celulares inapropiadas (Agarwal et al., 2015).

También están los receptores tipo III, TGF- β RIII de peso molecular 250 a 310 kDa, también llamado betaglicano, y la endogлина. Se consideran “co-receptores” del TGF- β , ya que aunque no son requeridos para la generación de su señal, son capaces de modularla al controlar la interacción del TGF- β con los receptores funcionales (Stewart, Guan, & Yang, 2010). El betaglicano tiene un gran dominio extracelular y un dominio de señalización intracelular corto y puede estar anclado a la membrana o ser secretado en forma soluble; se puede unir a todas las isoformas del TGF- β , y juega un papel selectivo al facilitar la interacción del TGF- β 2 con el TGF- β RII (Agarwal et al., 2015), ya que TGF- β 2 tiene menos afinidad por el TGF- β RII que TGF- β 1 o TGF- β 3 (figura 7). La endogлина es similar a los betaglicanos y se une a los TGF- β 1 y TGF- β 3 (Stewart, Guan, & Yang, 2010). Los efectos de las isoformas del TGF- β están asociados a su disponibilidad, a la combinación de los tipos de receptores y a la vía de señalización intracelular que inducen.

En ausencia de ligando, los receptores tipo I y II existen como homodímeros en la superficie celular. Los complejos del receptor son heterotetraméricos y consisten en dos receptores tipo II a los cuales se une el ligando, y dos receptores tipo I, que transmiten la señal de transducción (Stewart, Guan, & Yang, 2010). El

ensamblaje del complejo heteromérico es iniciado por la unión del ligando y estabilizado por las interacciones entre los dominios citoplásmicos de los receptores tipo I y II.

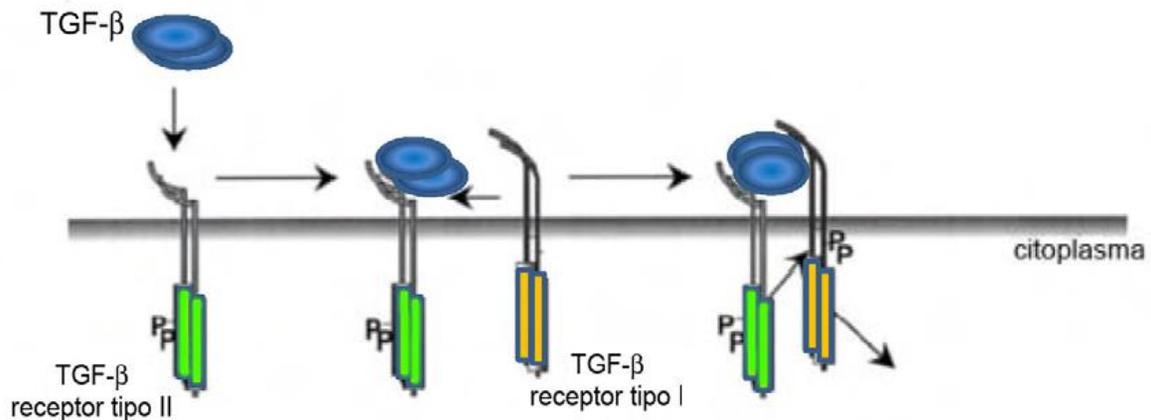


Figura 7. Activación de los receptores de TGF- β . El ligando se une inicialmente al Receptor II (RII) de TGF- β . Esto puede ser reconocido el Receptor I (RI), que es reclutado al complejo. Posteriormente, el RII-quinasa activo fosforila y activa el RI de TGF- β , que propagará la señal. Imagen adaptada de (Brand and Schneider 1996).

Sus efectos sobre la MEC se manifiestan en diferentes formas incluyendo un incremento en la expresión de proteínas de la MEC, la supresión de la expresión de proteasas degradadoras de la matriz, la inducción de la expresión de inhibidores de proteasas (TIMPs) y la regulación de la expresión de integrinas que actúan como receptores de diversos componentes de la MEC (Roelen, et al. 1994). Estas funciones son muy importantes resultan en un aumento en la acumulación de la MEC y en la interacción de las células con la matriz.

MIOSTATINA

El gen asociado a miostatina está constituido por tres exones y dos intrones ubicado en el cromosoma 2 en el locus q32.1 con 7,033 bases. La proteína que codifica pertenece a la superfamilia de los TGF β 's (factor transformante de crecimiento) el cual actúa como regulador extracelular negativo de crecimiento muscular (Lee and McPherron 1999). Se ha reportado en estudios anteriores, que mutaciones inducen la expresión de la proteína, son responsables de un crecimiento muscular exagerado (Grobet, et al. 1997).

La miostatina se expresada en músculo esquelético en desarrollo y adulto; regula la proliferación de mioblastos y es un potente regulador negativo de la masa muscular esquelética (Eisenbarth 1987). Miostatina es sintetizado como en 376 aminoácidos, la pre-proteína que consiste en un péptido de 24 aminoácidos, un pro-péptido de 243 aminoácidos, y una proteína madura de 109 aminoácidos (McPherron 2010). La pre-proteína se escinde por proteasas de la familia bmp-1 para separar 35-40 kDa del pro-péptido y formar la proteína madura de 12 kDa. Esta escisión da como resultado un complejo latente que contiene un puente disulfuro, formando un dímero en la proteína madura, y dos pro-péptidos asociados de forma no covalente (McPherron 2010; McPherron, et al. 2013).

La miostatina madura se conserva en un 100% en humanos, ratón y rata (Lee and McPherron 1999). Mstn activa puede ser inhibida mediante su asociación con folistatina, FLRG, decorina o GSP-1 por compartir receptores activina serina/treonina quinasa (Yue and Mulder 2001). También se puede unir a la pre-proteína BP3 de la familia TGF β latente, en la matriz extracelular e impedir la escisión proteolítica del pro-péptido de GDF8. La eliminación genética de GDF-8, así como la administración in vivo o sobreexpresión del pro-péptido aumentar la fibra del músculo esquelético hipertrofia pero no proliferación (Matsakas, et al. 2009). Miostatina activa se une al receptor de activina tipo II o Activina RIIB que luego se asocia con los receptores de tipo I o activina RIB / ALK-4 o TGF- β RI /

ALK-5 para inducir la señalización y regula el crecimiento muscular (figura 8) (Matsakas, et al. 2009; Matsakas and Patel 2009). Dicha señalización intracelular provoca cambios en la expresión génica, que inhiben el crecimiento muscular mediante bloqueo en diferentes fases del ciclo celular del músculo esquelético y células satélites. No necesariamente el aumento de GDF-8 total en suero representa un aumento de los valores de GDF-8 activa o madura, ni el aumento de GDF-8 activa significa un aumento en la actividad tisular.

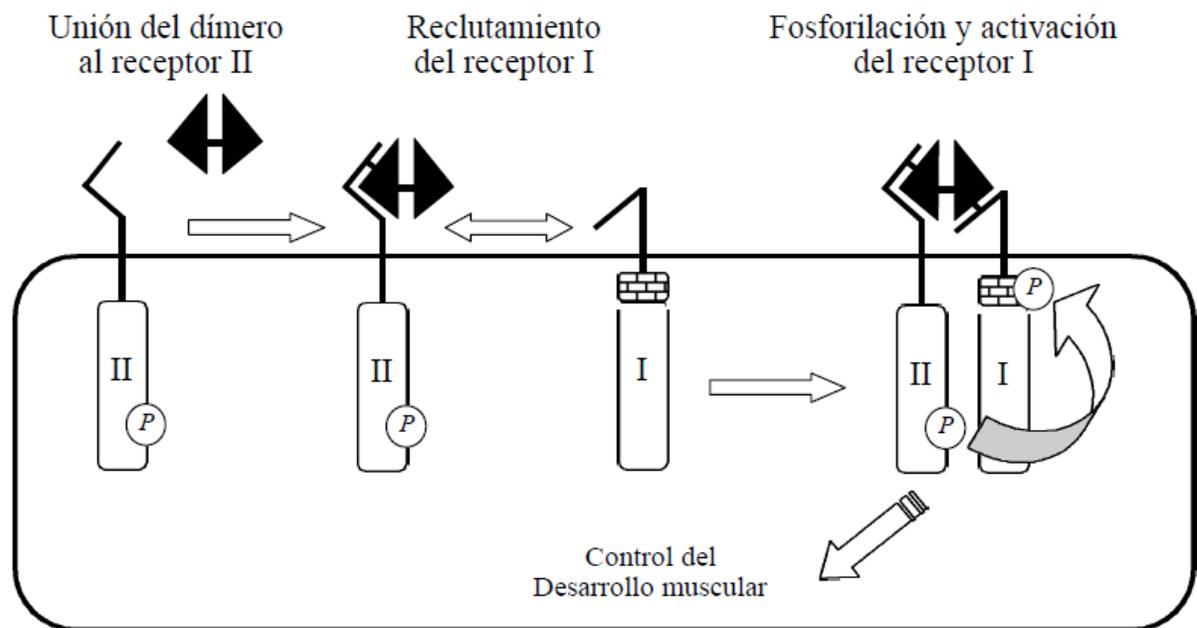


Figura 8.-Mecanismo de acción del dímero de miostatina donde se une a receptores tipo II fosforilandose activando la via de proteínas de acción Smads que regulan el crecimiento muscular (Rebbapragada, et al. 2003).

ACTIVACIÓN DE MIOSTATINA

Para ejercer su actividad biológica el péptido maduro de miostatina debe unirse a receptores específicos, denominados receptores de activina tipo II (ActRIIA, ActRIIB) (Zwaagstra, et al. 2008) pertenecientes al grupo de los receptores con actividad serina/treonina quinasa. Estos receptores en ausencia de ligando homodimerizan en la superficie celular y en presencia de dímeros de miostatina activa ocurre una transfosforilación mediada por su actividad serina/treonina quinasa, esta señal se traduce en fosforil (Josso and di Clemente 1997) acciones de proteínas Smad (R-Smads) que actúan como mediadores intracelulares. Se ha establecido que las Smad2/3 están involucradas en la vía de señalización de mstn. Estas proteínas después de activarse por fosforilación en su región C-terminal forman un complejo heteromérico con co-Smad4 y, a su vez, éste interactúa con co-activadores o co-represores permitiendo la activación o inhibición de la transcripción de genes músculo específicos (Hernandez-Canaveral, et al. 2004). La formación de los complejos Smad- coSmad son inhibidos por Smad7 y Smurf1 (Ebisawa, et al. 2001; Fukuchi, et al. 2001). Cuando no se lleva a cabo esta interacción entre el dímero de miostatina se produce el crecimiento muscular se descompensa y aparece el fenotipo hipertrófico (figura 9).

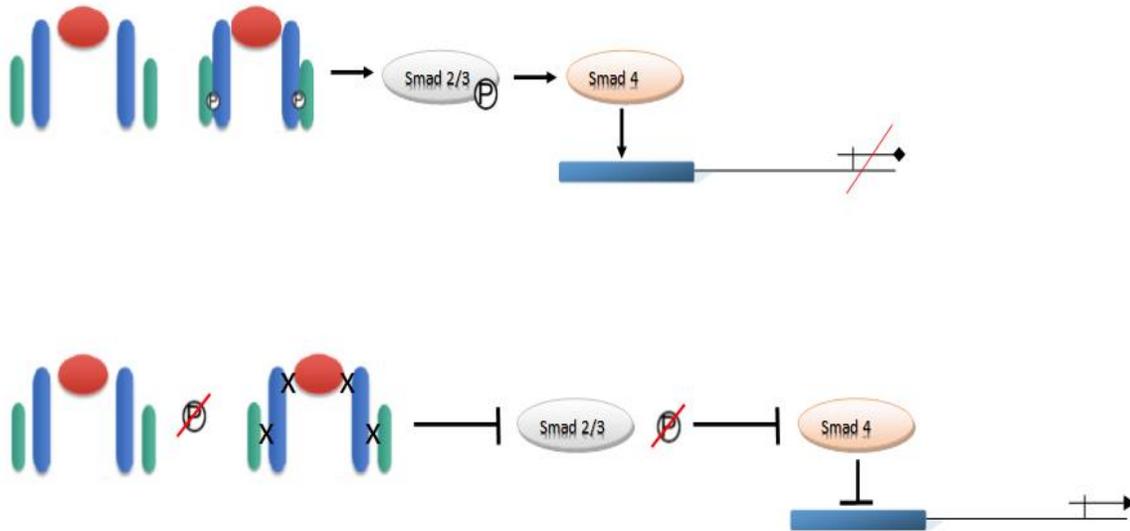


Figura 9.-En miostatina activa: se une a sus receptores I y II, lo que permite que el receptor tipo II fosforile al receptor tipo I en una serie de residuos de serina y de treonina. Una vez fosforilado, el receptor tipo I activa su dominio cinasa, lo que le permite fosforilar a unas proteínas intracelulares denominadas smads reguladas por receptores. Una vez fosforiladas, las R-smads forman un heterodímero con smad-4 y se trasladan al núcleo, donde regularán la transcripción de genes diana. En la señalización de abajo, se muestra una miostatina no activa, lo que produce que la señalización encargada de la regulación negativa muscular, no se lleve a cabo. Imagen modificada de (Rios, et al. 2002).

(Zhu, et al. 2000) realizó un estudio de expresión de miostatina, trabajaron con un modelo de ratón llamado mdx, es un ratón distrófico con una mutación puntual en el gen DMD expresado en un cambio de glutamina por treonina provocando un codón de paro que afecta la síntesis de distrofina (Lee, et al. 2015); obteniendo un aumento significativo de la regeneración muscular. En esta misma línea, Bogdanovich et. al. Bloquearon la miostatina endógena en ratones mdx durante tres meses, obteniendo un aumento significativo de la masa muscular y de la fuerza absoluta, además de una reducción significativa de la degeneración muscular. El bloqueo de miostatina proporciona una nueva vía farmacológica para el tratamiento en DMD, así como de igual forma sustenta nuestro trabajo y reafirma la hipótesis de poder ser biomarcador en el desarrollo de la enfermedad. El único antecedente para miostatina en DMD realizado en humanos fue realizado por Awano et al. 2008 donde se realizaron las cuantificaciones séricas por medio

de inmunoensayo ligado a enzimas, donde no encuentran diferencias significativas, pero siendo mayores los valores en controles con respecto en pacientes.

FOLISTATINA

La Folistatina (FS) o proteína de unión a activina se identificó primero como una sustancia inhibidora de la hormona estimulante del folículo (es decir, estructuralmente distintos de la inhibina), está presente en el líquido folicular ovárica (Phillips and de Kretser 1998). Es una glicoproteína que se expresa en casi todos los tejidos de los animales superiores, su función principal es la unión y la bio-neutralización de miembros de la superfamilia de TGF (Wankell, et al. 2001), existe una amplia distribución de FS en los tejidos adultos. No se limita únicamente a las personas involucradas en la reproducción. FS ha sido detectado en la hipófisis, la placenta, ovario, testículos, próstata, glándulas suprarrenales, tiroides, cerebro, médula ósea, hueso endocondral, páncreas, hígado, riñón, y vasos sanguíneos (es decir, células endoteliales y células de músculo liso).

Se ha demostrado que es una proteína reguladora multifuncional ejerciendo la mayoría de sus efectos a través de la neutralización de la activina. FS es una proteína de unión monomérica que regula la actividad de activina mediante la formación de un complejo inactivo (Akita, et al. 2013). El gen de FS se encuentra en el brazo largo del cromosoma humano 5 (5q11.2), teniendo un 98% de identidad entre folistatina humana y folistatina ratón el gen de la FS se compone de seis exones, cada molécula de folistatina tiene tres dominios similares, conocidos como dominios de folistatina (FSD), variando individualmente en el nivel de aminoácidos, pero que tienen las mismas características estructurales (figura 10). Algunas otras proteínas que no están estrechamente relacionados con folistatina también tienen FSD en su estructura. Antes del primer dominio folistatina, hay otro dominio conocido como dominio 'N-terminal' (ND) (Phillips and de Kretser 1998). El gen folistatina sufre lo que se conoce como un evento "splicing alternativo", donde algunos FSD son formados por seis exones y algunos

se hacen con sólo cinco, lo que resulta en una proteína más corta. Estas dos formas principales de folistatina son conocidos por el número de aminoácidos que tienen, y se conocen comúnmente como FS315 y FS288 (Lerch, et al. 2007).



Figura 10. La estructura básica de la folistatina se compone de un dominio 'N-terminal' (ND), seguido por tres dominios folistatina (FSD1, FSD2 y FSD3). A través de las dos formas principales de folistatina se folistatina 288 y folistatina 315, este último contiene el exón 6. Una secuencia de unión a la heparina (HBS) se encuentra dentro de FSD1 (Rodino-Klapac, et al. 2009).

Cuando una molécula de folistatina se reúne una molécula de activina, esto resulta en un acontecimiento de unión casi irreversible que impide que la activina de la unión a sus receptores específicos y causando la activación de genes. La molécula de activina es un dímero que comprende dos subunidades β (A y B) idénticos o similares. Se requieren dos moléculas de folistatina para neutralizar totalmente una molécula de activina (figura 11) FS une a las subunidades comunes β A y β B de la activina y la inhibina. Por lo tanto, la activina tiene dos sitios de unión para FS (es decir, un dímero activina y FS dos monómeros componen el complejo activina-FS), mientras que la inhibina tiene sólo uno (Lee, et al. 2015; Rodino-Klapac, et al. 2009).

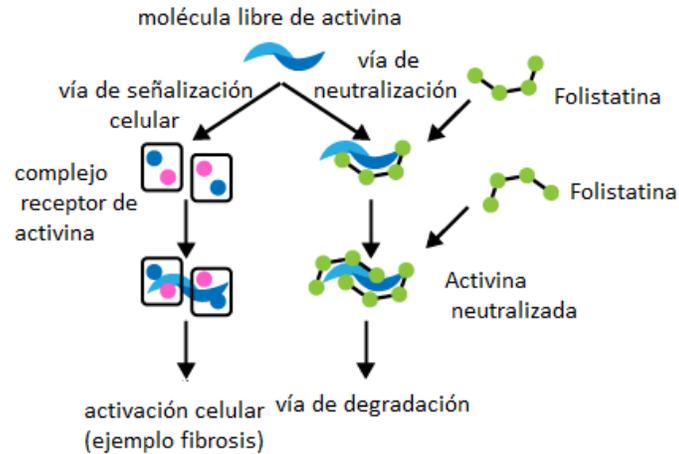


Figura 11. Moléculas de activina libres son capaces de unirse a sus receptores celulares e iniciar acontecimientos celulares tales como la inflamación y la fibrosis. En la vía de neutralización, se unen dos moléculas de folistatina a la activina con alta afinidad y prevenir activina de la unión a sus receptores.

Además de activina, folistatina también se une con menor afinidad a algunos otros miembros de la superfamilia $TGF\beta$, incluyendo BMPs 2, 4, 5, 6, 7, 11 y 15, la GDF8 y GDF9. Folistatina no se une a $TGF\beta 1$ o $TGF\beta 2$, pero se puede unir a $TGF\beta 3$. La propiedad anti-caquexia de folistatina conferida a través de la neutralización de la miostatina potencialmente ofrece beneficios terapéuticos significativos a los pacientes que sufren de pérdida de masa muscular enfermedades crónicas que se acompañan (Kimura, et al. 2010).

Uno de los mecanismo que impide miostatina regule el crecimiento y diferenciación muscular, es mediante folistatina, que se une a miostatina y da lugar a la formación de un complejo inactivo (Phillips and de Kretser 1998; Shimasaki, et al. 1988). Dado que la miostatina comparte su pareja de receptores de activina, FS competiría por los mismos receptores que miostatina (receptores de activina tipo I y II) evitando de tal forma que miostatina cumpla con su función de regulador negativo del crecimiento muscular (figura 12). Estos sistemas de control son tan eficaces que son incluso capaces de evitar que la miostatina actúe de forma sistémica cuando se sobreexpresa de forma específica en células musculares (Reisz-Porszasz, et al. 2003).

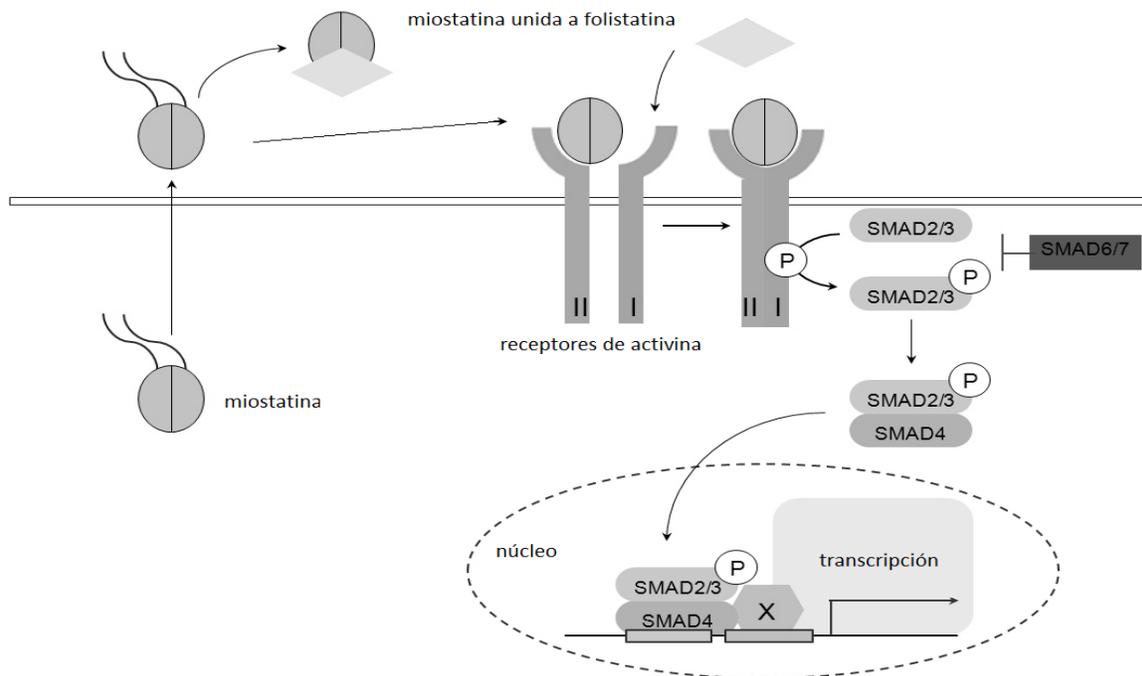


Figura 12.- Miostatina como un homodimero se secreta en los miocitos y está en forma inactiva cuando está unida a folistatina. Miostatina en su forma activa interactúa con el receptor de activina tipo II (ActRII) en la superficie de los miocitos. Esta interacción ligando-receptor recluta receptores tipo I receptor y tipo II trans-fosforila receptor de tipo I, que a su vez fosforila a las SMADs reguladoras, como SMAD 2 o 3. SMADs reguladoras fosforilados son reconocidos por y asociados con los co-mediadores SMADs, como SMAD4, y trasladadas en el núcleo para interactuar con el promotor del gen diana cis -elementos y para regular la expresión de genes de la miostatina específico. Estos complejos de Smad se asocian a menudo con otros factores de transcripción y co-factores, tales como la proteína activadora 1 (AP1), representado como X en el esquema. Como resultado, la regulación de expresión de genes específicos asociados a miogénesis, como MyoD y myogenin (Kollias, et al. 2006).

Sin embargo, pese a que la FS circula en plasma, no se ha reportado la identificación de miostatina circulante unida a FS (Hill, et al. 2002), se plantea que FS actúa directamente en el músculo, y regular la accesibilidad de la miostatina a su receptor. De esta forma, las moléculas de FS formarían una "barrera" que impide el paso de moléculas de miostatina activa a la circulación.

Kota et al. (2009) mostraron en el mono macaco la introducción de genes que codifica a la expresión de la folistatina resulta en el incremento del tamaño de los músculos y de la fuerza en las piernas y dichos resultados llevaron a los autores a sugerir que la mejoría en la fuerza muscular.

JUSTIFICACIÓN

La DMD es una enfermedad, progresiva y discapacitante de origen hereditario. Las intervenciones médicas más relevantes que han contribuido a la mejoría en el estado de salud de los pacientes con DMD es el tratamiento con corticoesteroides. En pacientes con DMD el tratamiento con glucocorticoides como el deflazacort responden con un aumento en el periodo ambulatorio entre 3 y 5 años y promueve la estabilización de la función muscular, sin embargo, los mecanismos de acción por los cuales el uso de esteroides mejora la función muscular aún son desconocidos. Hasta el momento la única proteína utilizada como biomarcador en el diagnóstico de DMD es CPK, sin embargo, esta presenta inespecificidad debido a los múltiples factores que contribuyen a modificar su secreción por la célula muscular como la actividad física. Por esta razón es necesario explorar la viabilidad de proteínas como la miostatina y folistatina como métodos no invasivos en el seguimiento del desarrollo de la enfermedad en los pacientes con DMD.

HIPOTESIS

Dado que el deflazacort es un inmunosupresor y retarda el deterioro muscular en pacientes con DMD, tomando en cuenta que la miostatina ejerce un efecto inhibitorio en la regulación del crecimiento muscular, entonces: el tratamiento con deflazacort a pacientes con DMD provocará disminución de la secreción sérica de miostatina e incrementará la de folistatina lo que se reflejará en la mejoría en los pacientes.

OBJETIVO PRINCIPAL

Analizar el efecto de la administración del deflazacort a pacientes diagnosticados CON DMD sobre la concentración de miostatina y folistatina post tratamiento.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar la presencia de la mutación en el gen de la DMD para poder establecer un diagnóstico definitivo.

Cuantificar la concentración de la miostatina y folistatina en el suero de pacientes con DMD antes y después del tratamiento con deflazacort.

MÉTODOS

El estudio a realizado es un estudio observacional descriptivo longitudinal, donde se incluyeron 23 pacientes tratados con deflazacort con una edad media de 9.9 años de edad, provenientes de instituciones de la Asociación de Distrofia Muscular de Occidente (ADMO) y la Sociedad Mexicana de Distrofia Muscular A.C. (SMDM A.C) siguiendo los criterios de MD STARnet, y 17 controles sanos con una edad media de 9.5 años de edad, provenientes del banco de sangre.

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 20 pacientes ya habían sido diagnosticados previamente con DMD de acuerdo a los criterios de la red MD STARnet.

El médico responsable conformo la historia clínica y la genealogía, además se analizaron los resultados de los exámenes de laboratorio para la clasificación del tipo de distrofia muscular al que correspondió a cada paciente de acuerdo con los criterios clínicos MD STARnet basados en la edad de aparición de síntomas, resultados de CPK, Inmunotinción y biopsia muscular cuando fue necesario (Mathews, et al. 2010) con deflazacort de acuerdo a las guías medicas establecidas por los pediatras y médicos especialistas provenientes de las mismas instituciones (ADMO y SMDM) .

Criterios inclusión-exclusión

Entre los pacientes que se incluyeron fueron aquellos con documentación con características clínicas de distrofinopatía, resultados de los procedimientos de análisis clínicos como inmunofluorescencia de la biopsia muscular o MLPA con resultados en un diagnóstico definitivo de DMD y que hayan firmado la carta de consentimiento informado según la Declaración de Helsinki.

Se excluyeron aquellos pacientes con alguna otra distrofia muscular, pacientes con diagnóstico definitivo con DMD pero que no siguieron el tratamiento con deflazacort y aquellos que no firmaron el consentimiento informado.

EXTRACCIÓN DE ADN CTAB-DTAB (DETERGENTES CATIÓNICOS)

Se obtuvo una muestra de sangre periférica de pacientes con DMD, y el ADN sanguíneo fue extraído por la técnica DTAB/CTAB (Gustincich, et al. 1991), la extracción de ADN consta de una etapa de lisis celular, donde se rompen las estructuras que confinan el citoplasma y liberar al medio su contenido y una etapa de purificación, que implica remover de la solución final la mayoría de elementos que pueden afectar en los distintos análisis moleculares como podrían ser un exceso de sal, impidiendo una lectura idónea en los equipos a utilizar en los procesos de PCR-TR y el secuenciador de electroforesis capilar.

TÉCNICA CTAB/DTAB

Se captaron las muestras de sangre (5-10ml) en tubos con anticoagulante EDTA, se centrifugo a 2000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos separando por gradiente de densidad los leucocitos.

En un tubo eppendorf de 1.5 ml se agregó 600µl de DTAB al 8% (sigma, NaCl 1.5M, EDTA 50mM, Tris 100mM pH 8.7). En otro tubo eppendorf de 1.5ml 100µl de CTAB. Se colocó 300µl de la muestra sanguínea tomando el paquete leucocitario y fue agregado en el tubo eppendorf con DTAB, se mezcla y calienta entre 65 a 68 °C durante 5 minutos. Inmediatamente se adicionan 550µl de cloroformo, agitación manual durante 5 minutos y centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos. Se rescata la parte acuosa superior (sin tomar partículas de la fase proteínica) depositándolo en el tubo eppendorf con los 100 µl de CTAB, y añadir 750µl de agua estéril. Se mezcló suavemente hasta que quedar homogéneo, reposa a temperatura ambiente durante 10 minutos, y posteriormente se centrifuga a 10000 rpm durante 5 minutos.

Se descartó el sobrenadante y el precipitado. Resuspende con 200µl de NaCl 1.2M y añade 850µl de etanol al 100% frio, mezclar y deja precipitar durante 10 minutos a -20°C. Posteriormente se centrifugo a 10000 rpm durante 5 minutos. Descartar sobrenadante y conservar el precipitado, agregar 500µl de etanol al 70%. Centrifugar durante 5 minutos a 10000 rpm. Se decanta el sobrenadante y solo se conserva el precipitado, se puso al vacío a temperatura ambiente para que el etanol se evapore y quede libre de alguna sustancia que pueda interferir con la calidad. Una vez secado el ADN, se agrega 100µl de TE o H₂O estéril, se dejó calentar a 65°C durante 30 minutos para reconstituir el ADN y se homogeniza.

Posterior a la extracción de ADN se verificó la integridad del mismo, esto se realiza mediante la separación por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% utilizando 2 µl de ADN sanguíneo con 3 µl de azul de bromofenol que nos da la fluorescencia de la muestra la cual es visible a través de bromuro de etidio.

El NanoDrop-1000 de la marca Thermo scientific (figura 13) es un espectrofotómetro de espectro total (220-750 nm) que mide concentraciones en 0.5-2µl de muestra con exactitud y reproducibilidad. El equipo es de gran ayuda para medir la concentración de ácidos nucleico en volúmenes pequeños (como los obtenidos de las extracciones de pacientes con DMD) además de poseer la característica de determinar sales y pureza del ADN.



Figura 13.- Espectrofotómetro NanoDrop-1000 utilizado para medir las concentraciones de ácido nucleico

EL ADN se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop-1000 (figura 14) (Thermo scientific) para conocer la concentración y preparar diluciones a 100ng/µL y 10 ng/µL.

TECNICA MLPA PARA IDENTIFICAR MUTACIONES.

La MLPA (*Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplificación*) es una técnica descrita por Schouten JP et al. (2002). Es un procedimiento de cuantificación relativa basado en reacción de PCR y electroforesis capilar permitiendo la detección de deleciones o inserciones que afectan a uno o varios exones, de hasta 50 secuencias de ADN en una única reacción o incluso secuencias que difieren en un solo nucleótido (figura 14).

Teniendo diluciones de ADN de los pacientes a 100 ng/MI, se procesó por medio de: MLPA con la que se pretende detectar las deleciones o duplicaciones en los de diferentes exones del gen DMD.

Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del proveedor (MCR-Holland) en dos reacciones, P034 para la mitad de los exones, y P035 para la otra mitad en el gen DMD. Después de preparar las reacciones de las muestras se analizaron por electroforesis capilar, por medio del análisis de fragmentos.

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 (figura 15).

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. Para la electroforesis capilar, SE incubaron 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 amplicones producto de esta reacción pueden ser cuantificados por la intensidad de la fluorescencia en un equipo de electroforesis capilar, y el análisis de resultados con la ayuda de softwares especiales se determina que exones hacen falta o cuáles de ellos están duplicados. Cuando el exón está presente, el amplicón del fragmento produce energía fluorescente, por lo tanto, una señal nula de fluorescencia indica cuales son los exones que están ausentes, así como un incremento en ella representa las duplicaciones exónicas.

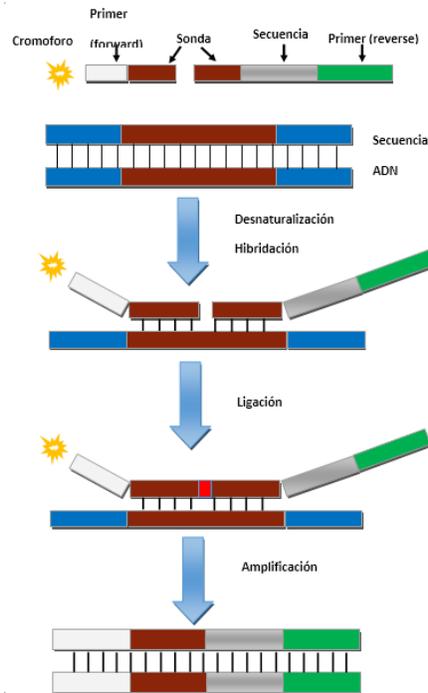


Figura 14.- Reacción de MLPA. Desnaturalización e hibridación: cada par de sondas se une específicamente a cada exón. Ligación: Las sondas son unidas entre si por una enzima termoestable (ligasa). Amplificación: Se lleva a cabo una reacción de PCR para amplificar los fragmentos de ADN.

CUANTIFICACIÓN DE MIOSTATINA Y FOLISTATINA

INMUNOENSAYO LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

La técnica ELISA se fundamenta en la premisa de que luego de acoplar antígenos solubles o anticuerpos a una matriz sólida insoluble, éstos retienen la actividad inmunológica y en que estas biomoléculas también pueden unirse a una enzima, reteniendo el conjugado resultante, tanto la actividad enzimática como inmunológica.

Los kits utilizados fueron provenientes de la marca R&D Systems, el inmunoensayo de fase sólida para las proteínas miostatina y folistatina humana es capaz de determinar los niveles en sobrenadantes de cultivo de células, homogeneizados de tejido, suero y plasma. Para miostatina el kit contiene un recombinante de GDF-8 y los anticuerpos NS0-expresados contra el factor recombinante y para folistatina el recombinante Sf-21 expresado en folistatina y anticuerpos producidos contra el factor recombinante. Los resultados muestran curvas lineales que son paralelas a las curvas de calibración obtenidas con los patrones del kit Quantikine. Estos nos que se pueden utilizar para determinar los valores de masa relativas para miostatina y folistatina humana natural.

Este ELISA es de tipo sándwich cuantitativo. Un anticuerpo monoclonal específico para Miostatina y folistatina humana ha sido pre-revestido sobre una microplaca de 96 pozos. Patrones y muestras se pipetea en los pocillos y cualquier presente de miostatina y Folistatina se une a su anticuerpo y es inmovilizado. Después de lavar cualquier sustancia no específica unida, se añade un anticuerpo monoclonal específico para cada proteína a los pocillos. Posterior a un lavado para eliminar cualquier reactivo de anticuerpo-enzima no unido, se añade una solución de sustrato a los pocillos y se desarrolla el color en proporción a la cantidad de proteína atado en el paso inicial. El desarrollo del color se detiene y se mide la intensidad del color.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

R&D Systems recomienda que cada muestra estándar y control se lleve a cabo por duplicado añadiendo 50 µl de Diluyente de ensayo a cada pozo para miostatina y 100 µl para folistatina por pozo.

Antes de comenzar el ensayo, el kit para la proteína miostatina tiene la particularidad de una fase de activación de la muestra, esta requiere de N NaOH/0.5 M HEPES añadiendo 50 µl a cada pocillo que contenga muestra, dándonos un factor de dilución de 1:4.

Añadir 50 µl de estándar, control y muestra por pocillo para miostatina, 100 µl para folistatina, se cubre con la cinta adhesiva suministrada, posteriormente se Incuba durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador de microplaca orbital horizontal, fijado en 500 ± 50 rpm. Para el caso de folistatina la incubación será durante 3 horas a temperatura ambiente.

Los lavados para cada pocillo, se realizaron mediante una pizeta agregando aproximadamente 400 µl por pozo, repitiendo el proceso tres veces para un total de cuatro lavados. La eliminación completa del líquido en cada paso es esencial para una óptima detección. Después del último lavado, eliminar los restos del lavado por decantación, seguido de un secado de la placa contra toallas de papel limpias, repitiendo los pasos durante 4 tiempos.

Se Añade 200 µl de conjugado para cada proteína a cada pocillo y cubrir con una nueva tira adhesiva. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente en el agitador, y repetir la aspiración / lavado anteriormente mencionado.

8. Añadir 200 µl de solución de sustrato a cada pocillo. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegiendo de la luz (figura 15).

9. Añadir 50 µl de solución de parada a cada pocillo. El color en los pocillos debe cambiar de azul a amarillo. Si el color de los pozos es de color verde o el cambio

de color no aparece uniforme, golpear suavemente la placa para asegurar una buena mezcla.



Figura 15.- en la parte izquierda se observa la reacción con el sustrato que contiene peróxido de hidrogeno observándose una coloración azul, a la derecha la placa cuando se ha añadido la solución de paro reacción provocada por peroxidasa, para su análisis en el equipo.

Se Determina la densidad óptica de cada pocillo en 30 minutos, utilizando un Lector de microplacas para absorbancia / ELISA iMark ajustado a 450 nm, si la corrección de la longitud de onda está disponible, se recomienda ajustar los filtros a 540 nm o 570 nm. Si la corrección no está disponible en el equipo, restar las lecturas a 540 nm o 570 nm a partir de las lecturas de la 450 nm, esta resta corregirá las imperfecciones ópticas en la placa. El kit indica que si las lecturas realizadas directamente a 450 nm sin corrección puede ser mayor y menos preciso.

Para analizar los datos de forma adecuada se promedian los resultados con su repetición de estándar, control y muestra se le resta el promedio de la densidad óptica estándar cero (D.O.), el software propio del equipo, crea una curva estándar (figura 16) con los datos ya ajustados, trazando en el eje y la absorbancia media de cada estándar, y en el eje x la concentración, linealizando la curva en la cual se

puedan extrapolar la media de las absorbancias de cada muestra y de esta manera obtener la concentración.

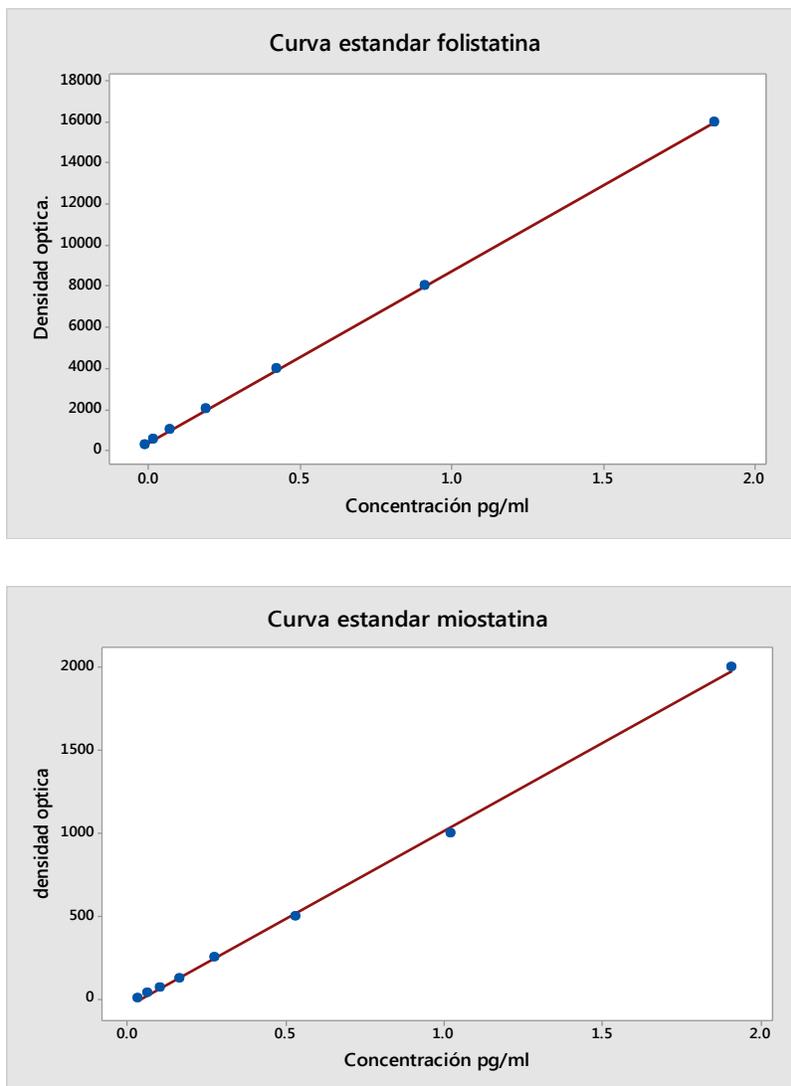


Figura 16.- Curva estándar para miostatina y folistatina, con un coeficiente de correlación de $r = 0.996$ y 0.998 .

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de la concentración de ELISA para miostatina y folistatina se analizaron por medio del test de normalidad basado en la prueba Shapiro-Wilk posterior a este se realizó la comparación de medias mediante una prueba de t de Student o U de Mann-Whitney dependiendo de su comportamiento, antes y después del tratamiento según fuera el caso. En todos los casos se considerarán como significativas aquellas diferencias en las cuales la probabilidad sea igual o menor a 0.05. Se evaluaron las posibles correlaciones de las evaluaciones de las proteínas y con los datos clínicos de los pacientes por medio de 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 datos no paramétricos, como la edad, pruebas cronometradas y funcionales como la caminata de los seis minutos, el tiempo que tardan los pacientes en ponerse una camiseta, levantarse de una silla, subir escaleras, caminar 10 m, signo de Gowers y otras pruebas específicas como North Star Ambulatory Assessment (NSAA), Vignos, Barthel, en los pacientes con DMD, además 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 los niveles de las diferentes proteínas, así como para las escalas funcionales y las pruebas cronometradas. 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. Los análisis se realizarán utilizando el paquete estadístico SPSS versión 21.

RESULTADOS

IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES

Posterior al análisis de MLPA para los tres pacientes que se tuvo que necesitaban corroborar el diagnóstico definitivo para DMD, se muestran los resultados obtenidos posteriores la electroforesis capilar, analizados por el software *GeneMarker V 2.1* mostrando electroferogramas para comparar la altura o el área de los picos que representan la fluorescencia derivada de la reacción de PCR con respecto a un control sano para observar las duplicaciones o deleciones o mediante la relación de picos, donde valores arriba de 1.5 se consideran como duplicaciones y menores a 0.5 se consideran deleción (figura 17, 18 y 19).

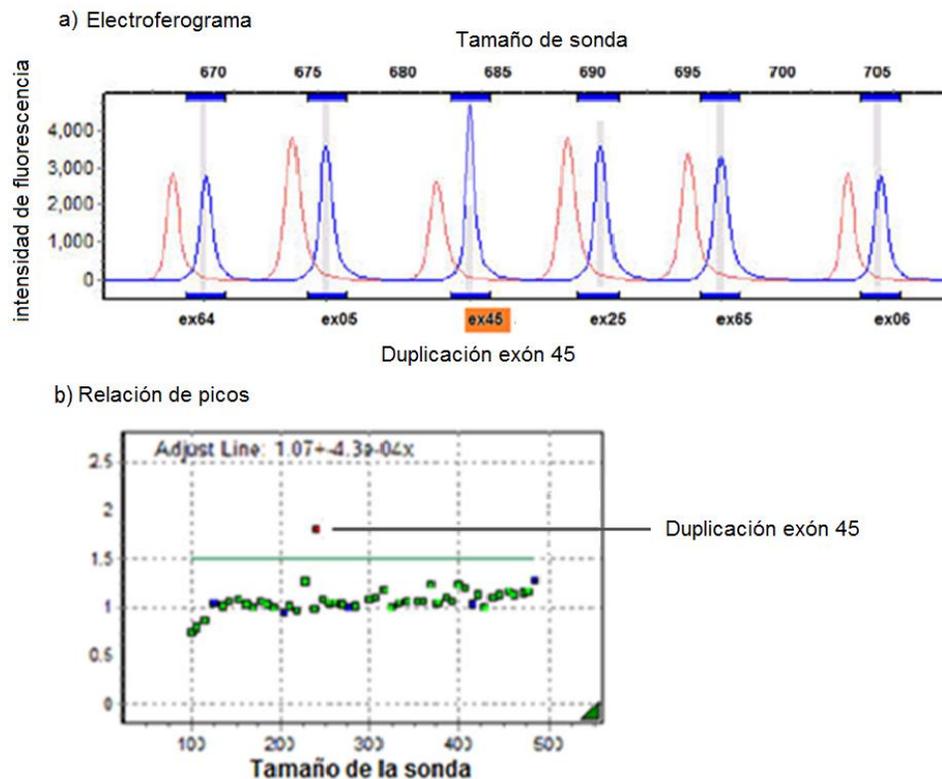


Figura 17. Duplicación del exón 45 determinada por medio de la técnica MLPA. a) Se muestra en el electroferograma, las curvas de la muestra control (rojo) y el paciente (azul), el paciente tiene una

intensidad de fluorescencia de casi el doble al pico control lo que indica la duplicación de ese exón.
 b) En la relación de picos se observa que el punto rojo tiene un valor mayor a 1.5, correspondiente al mismo exón corroborando la duplicación.

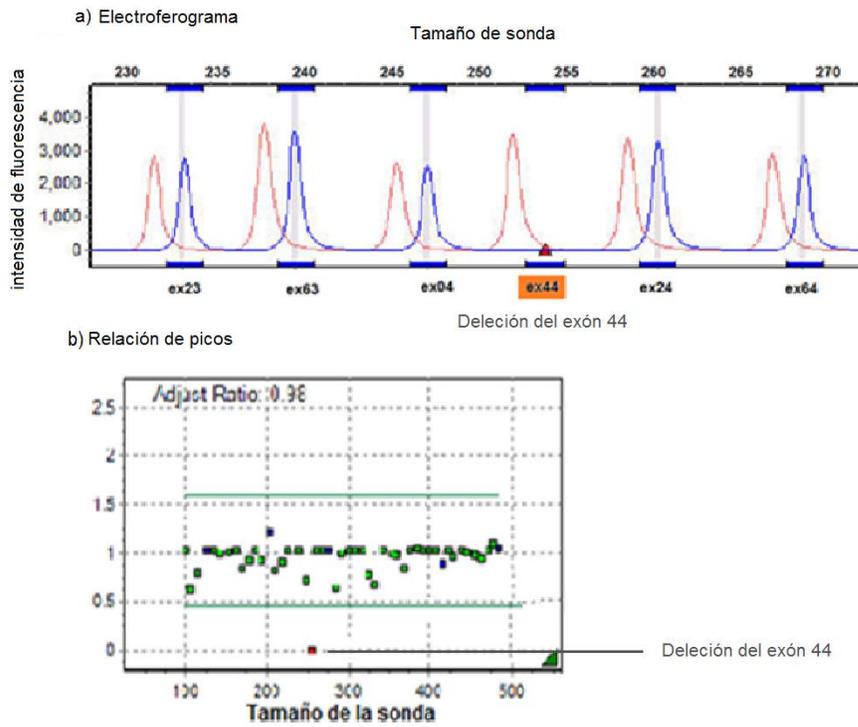


Figura 18.- Delección del exón 44 determinada por medio de la técnica MLPA. a) Se muestra en el electroferograma que falta un pico en color azul (paciente) con respecto al pico en color rojo (control). En la relación de picos se observa que el punto rojo tiene un valor menor a 0.5, correspondiente al mismo exón corroborando delección.

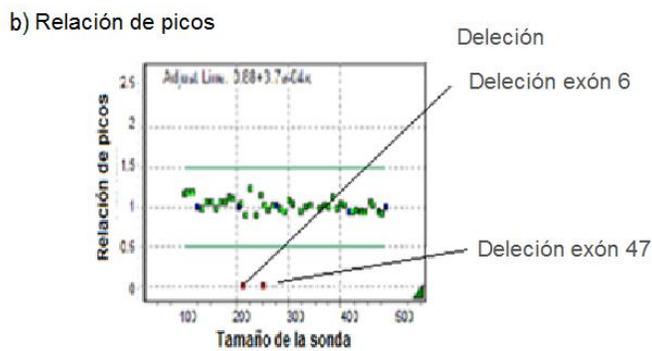
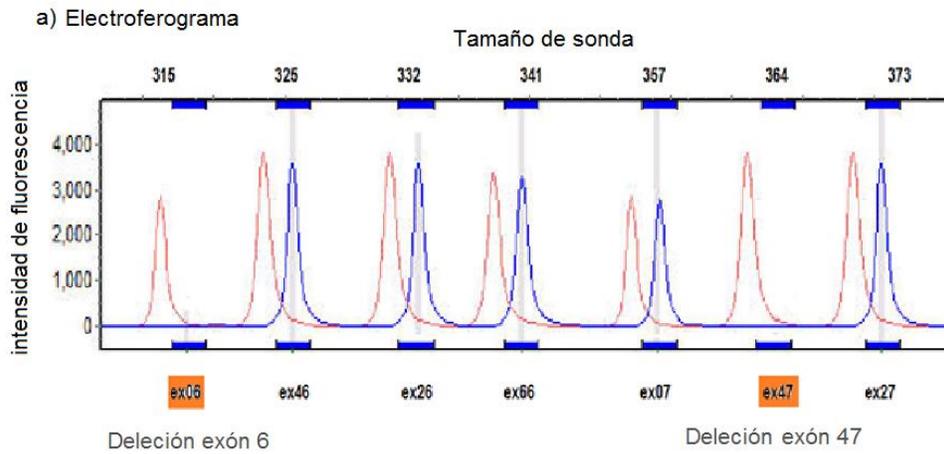


Figura 19.- Delección del exón 6 y 44 determinada por medio de la técnica MLPA. a) Se muestra en el electroferograma que faltan dos picos en color azul (paciente) con respecto a los picos en color rojo (control). En la relación de picos se observa que los dos puntos en rojo tienen un valor menor a 0.5, correspondiente al mismo exón corroborando delección.

PROTEÍNAS EN SUERO

Se realizaron los ELISAS para folistatina en suero y compararon las medias de pacientes con DMD con respecto a controles, se observó un comportamiento no normal, mostrando un aumento en pacientes con DMD (media de 1.1916 ng/ml) con respecto a los controles sanos (media de 0.894 ng/ml) sin mostrar diferencia significativa con una $p < 0.05$ (figura 20) y la correlación entre edad y folistatina sin mostrar diferencias con una $p = 0.458$.

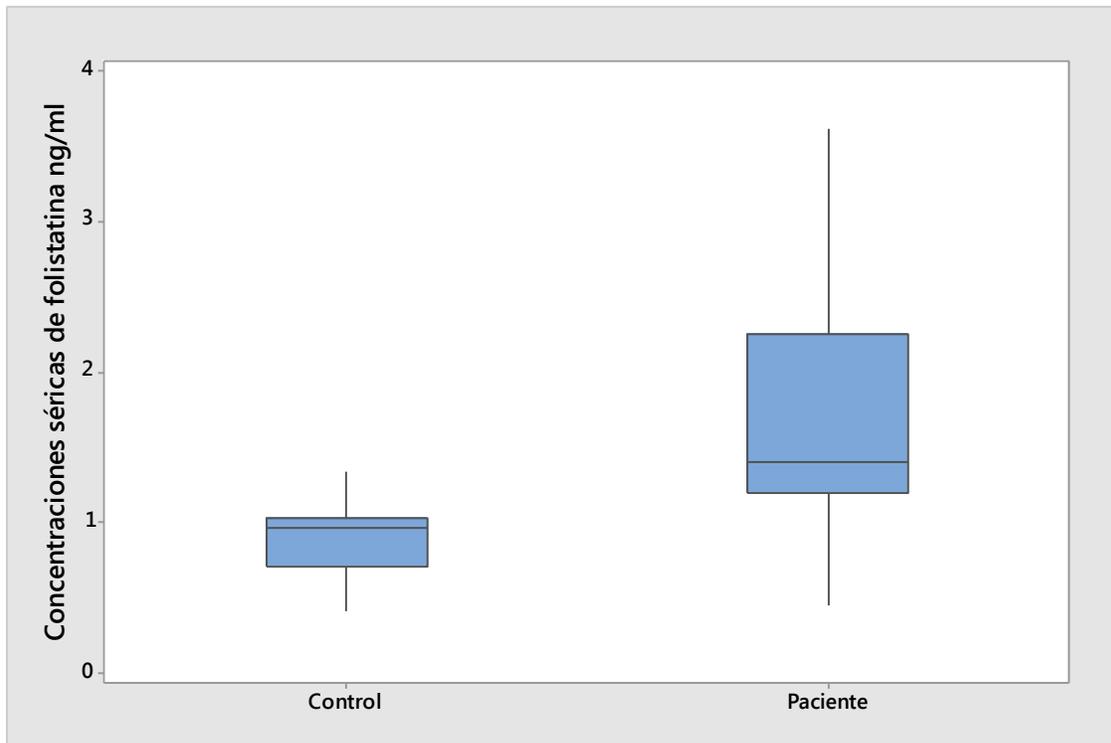


Figura 20.-Diagrama de caja y bigote de los niveles séricos de folistatina entre controles y pacientes con DMD, representado lo bigotes los valores máximos y mínimos, las medias de las concentraciones séricas se indican mediante la línea que corta la caja por la mitad; donde existen una diferencia significativamente mayor en los pacientes con DMD co cronometradas con respecto a los controles y una $p < 0.05$.

Se realizaron los ELISAS para miostatina en suero y compararon las medias de pacientes con DMD con a con controles, se observó un comportamiento no normal, mostrando un decremento en pacientes con DMD (media de 1.331 ng/ml) con respecto a los controles sanos (media de 2.87 ng/ml) siendo diferente estadísticamente con una $p= 0.001$ (figura 21) y la correlación entre edad y folistatina con diferencia estadística con una $p=0.001$.

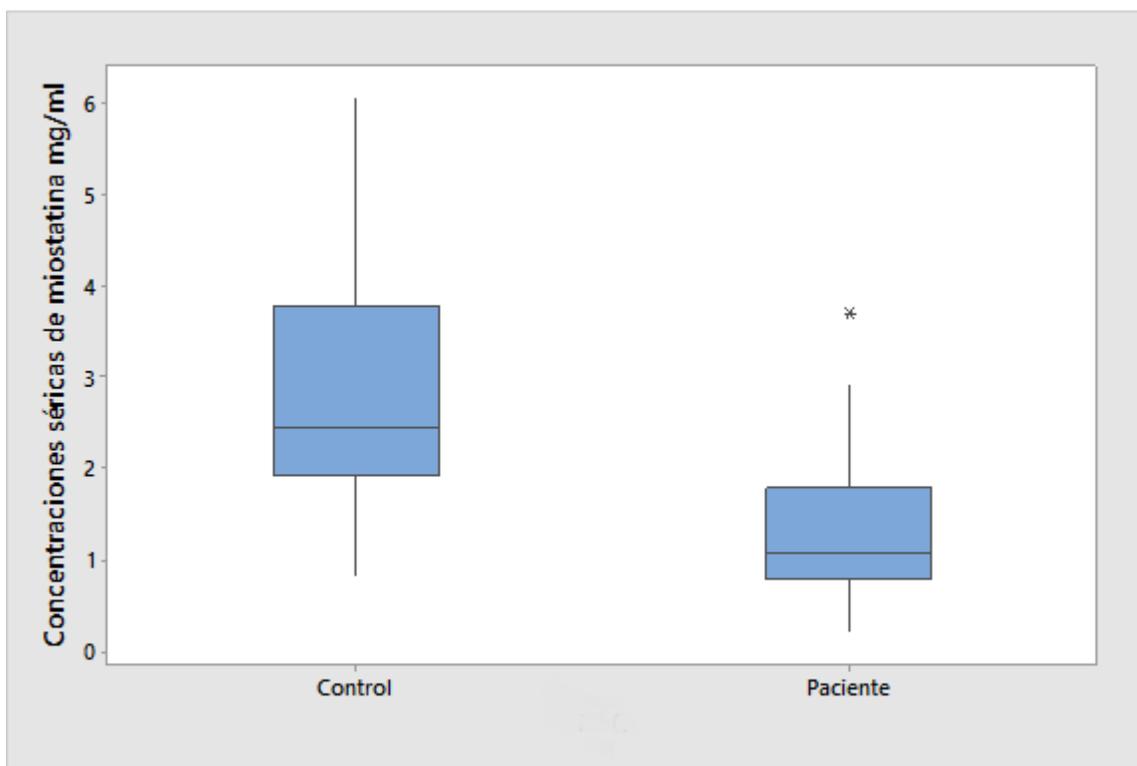


Figura 21.-Diagrama de caja y bigote de los niveles miostatina en controles y pacientes con DMD, representado lo bigotes los valores máximos y mínimos, las medias de las concentraciones séricas se indican mediante la línea que corta la caja por la mitad; donde existe una diferencia significativamente menor en los pacientes con respecto a los controles con una $p < 0.01$

El análisis de correlación para las edades entre pacientes con DMD (con una edad media de 9.6 años con rangos entre 5 y 13 años) y controles sanos (con una edad media de 9.5 años con rangos entre 5 y 11 años) no mostro diferencias significativas con una $p=0.774$.

PACIENTES DE SEGUIMIENTO

Prueba de muestras relacionadas para los grupos de seguimiento tratados con deflazacort, de primera y segunda toma, para los niños ambulantes entre primera (media de 1.298 ng/ml) y segunda toma (media de 1.299 ng/ml) de miostatina, con una $n=16$ no mostro diferencias significativas con una $p=0.97$. También para los 6 niños que contaban con las 3 tomas se llevó a cabo un análisis de varianza para muestras repetidas en ambas proteínas sin mostrar diferencias entre sí (tabla 1).

Tabla 1.- Análisis de varianza. Se muestran las concentraciones medias de miostatina de las 3 tomas comparadas sin ser diferentes estadísticamente en ningún caso con $p > 0.05$.

Toma de la muestra		Medias estimadas de las concentraciones de miostatina de pacientes ambulantes
1	Antes del tratamiento	0.856 ng/ml
2	3 meses con tratamiento	1.229 ng/ml
3	6 meses con tratamiento	1.220 ng/ml
Toma miostatina	Diferencia de medias	Valor de p
1 2	0.373	$p=0.183$
1 3	0.364	$p=0.263$
2 3	0.009	$p=0.956$

Prueba de muestras relacionadas para los grupos de seguimiento tratados con deflazacort, de primera y segunda toma, para los niños ambulantes entre primera (media de 0.55 ng/ml) y segunda toma (media de 0.87 ng/ml) de folistatina, con una n=16 no mostro diferencias significativas con una p=0.186. También para los 6 niños que contaban con las 3 tomas se llevó a cabo un análisis de varianza para muestras repetidas en ambas proteínas sin mostrar diferencias entre sí (tabla 2).

Tabla 2.- Análisis de varianza. Se muestran las concentraciones medias de folistatina de las 3 tomas comparadas sin ser diferentes estadísticamente en ningún caso con $p > 0.05$.

Toma de la muestra		Medias estimadas de las concentraciones de folistatina de pacientes ambulantes
1	Antes del tratamiento	1.353 ng/ml
2	3 meses con tratamiento	1.368 ng/ml
3	6 meses con tratamiento	1.593 ng/ml
Toma folis-	Diferencia de medias	Valor de p
1 2	0.015	p=0.970
1 3	0.24	p=0.753
2 3	0.0225	p=0.573

ESCALAS FUNCIONALES Y CRONOMETRADAS

Para las escalas funcionales y las pruebas cronometradas las tablas 3 y 4 muestran el resultado del análisis de muestras relacionadas, sin observar diferencias significativas antes del tratamiento y a 3 meses de tratamiento con deflazacort.

Tabla 3.-comparacion de las escalas funcionales antes y después del tratamiento con deflazacort.

	funcional				
	ibarthel	Brookesup	brookeinf	vignos	NSAS
mediana*	90	1	3	3	9
mediana**	95	1	2	2	12
Wilcoxon	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05
N	15	19	19	19	8

Mediana puntajes antes del tratamiento. Mediana** puntajes 3 meses después del tratamiento (Índice de Barthel/ IBarthel, Brooke para miembros superiores/BrookeSup, Brooke miembros inferiores/Brookeinf, Vignos para miembros inferiores/Vignos y NortStar/NSAS).*

Tabla 4.-comparacion de las pruebas cronometradas antes y después del tratamiento con deflazacort.

	cronometradas						
	gowers	subesc	levsilla	Camiseta	Co10m	Cam10m	6minC
mediana*	13	14.5	3	20	1.1	0.7	280.55
mediana**	6.5	6	2	17	1.2	1	340.85
Wilcoxon	P=0.059	P>0.05	p=.034	P=0.128	P>0.05	P>0.05	P>0.05
N	10	10	12	13	10	10	12

Mediana puntajes antes del tratamiento. Mediana** puntajes 3 meses después del tratamiento (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).*

El análisis de varianza para medias repetidas antes del tratamiento, a 3 meses y seis meses de tratamiento, para el índice de Barthel, la prueba de Brooke para miembros superiores y la prueba de Vignos para miembros inferiores, para las escalas funcionales. Mientras que en las pruebas cronometradas se tomaron la maniobra de Gower's, subir 4 escalones, y ponerse una camiseta. 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).

Tabla 5. Comparación de las escalas funcionales y pruebas cronometradas de 6 pacientes, antes, así como a tres y seis meses de tratamiento con deflazacort.

	Escalas de funcionalidad.			Pruebas cronometradas.		
	lBarthel	BrookeSup	Vignos	Gowers	Escalones	Camiseta
Toma 1	85	1.6	2.8	11.5	5.6	18.42
	(65-95)	(1 - 3)	(2 - 5)	(1 - 32)	(5- 7)	(11 - 24)
Toma 2	80	1.6	3.6	6.5	5.5	14.83
	(50 -95)	(1 - 2)	(2 - 7)	(5 - 8)	(5 - 6)	(6 - 22)
Toma 3	78.33	1.6	4.2	7.5	4.5	14.83
	(50-95)	(1 - 3)	(1 - 9)	(4 - 11)	(4 - 5)	(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 EN RELACIÓN CON LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE MIOSTATINA Y FOLISTATINA.

Se realizó la correlación con ayuda de las pruebas Spearman y Pearson antes, 3 y 6 meses después del tratamiento sin existir una correlación entre miostatina y folistatina en función con las escalas funcionales y las pruebas cronometradas el carácter – dice que por falta de datos no se puede realizar la prueba estadística correspondiente (tablas 8 y 9).

Tabla 6.- correlación entre las proteínas y las escalas funcionales.

toma	proteína	ibarthel	brookesup	brookeinf	vignos	NSAS
antes del tratamiento	miostatina	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
	folistatina	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
3 meses del tratamiento	miostatina	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
	folistatina	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
6 meses del tratamiento	miostatina	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
	folistatina	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05

Tabla 7.- correlación entre las proteínas y las escalas funcionales.

toma	proteína	gowers	SubEsc	LevSilla	Camiseta	Correr 10 m	Cam 10m	6minC
antes del tratamiento	miostatina	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
	folistatina	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
3 meses del tratamiento	miostatina	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
	folistatina	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
6 meses del tratamiento	miostatina	-	-	-	-	-	-	p>0.05
	folistatina	-	-	-	-	-	-	p>0.05

DISCUSIÓN

Miostatina y folistatina, fueron elegidos como potenciales biomarcadores en DMD por su relación con la regeneración muscular; Yin-HsiuChien en 2013 ha reportado un aumento significativo en las concentraciones séricas de miostatina, relacionándolo fuertemente con la regeneración muscular en enfermedad de Pompe, que tiene afección en los tejidos musculares. Nishiyama et. al. En 2007 mostro que el bloqueo de miostatina en ratones mdx, aumentaba el grosor de las fibras muscular y reducía la fibrosis, dando como resultado una mejora funcional en los modelos mdx. Con base en lo antecedentes, se examinó la hipótesis en este estudio que posterior al tratamiento provocaría una disminución en la secreción sérica de miostatina, y a su vez incrementará la de su antagonista folistatina, reflejando una mejoría en los pacientes.

Posterior a nuestro análisis y resultados en seres humanos, nos arroja que los niveles folistatina tienen una mayor expresión en pacientes con DMD con respecto los sujetos sanos, pero sin mostrar diferencia estadística con un $p < 0.05$; en 2009 se evaluó la expresión de folistatina en ratones mdx en comparación con una cepa B10, donde se observó un incremento significativamente mayor en ratones mdx con respecto a ratones B10 (Abe, et al. 2009), lo que concuerda con nuestros resultados. Para miostatina las concentraciones séricas se encuentran elevados en controles con respecto a los pacientes con DMD en poco más del doble con una diferencia significativa de $p = 0.001$, aunque en reportes ya mencionados muestran una correlación inversa a la obtenida en nuestro estudio o proponen una terapia de bloque de miostatina (Chien, et al. 2013; Nishiyama, et al. 2007).

Un estudio donde bloquearon miostatina endógena en ratón mdx, mostro que miostatina en suero no modifica el fenotipo distrófico, a pesar de que el bloqueo ha demostrado mejoras en el fenotipo de mdx (Bogdanovich, et al. 2002; Magee, et al. 2006). Klingeret.al; midió la miostatina que se hace reaccionar con un

anticuerpo monoclonal que reconoce el predominio de miostatina, a diferencia de nuestro estudio, donde el kit de la marca R&D System para miostatina humana, trabaja en la forma activa del dímero contraste a lo que reporto Awano et. Al. Donde realizó un estudio en 41 pacientes con DMD, seguidos en el hospital de la Universidad de Kobe con una media de 8.3 años, y evalúan el bloqueo de miostatina como terapia en DMD, el grupo cuantifica la proteína miostatina en su forma inactiva, por medio de la técnica de ELISA, pudiendo ser este factor a considerar en los resultados de nuestro estudio. Las comparaciones entre las tomas no mostraron diferencias, esto quizá sea debido a que miostatina es generada en musculo esquelético y en función de la progresión el musculo sigue degradándose por eso es complicado observar una mejoría en las concentraciones, debió a que la degradación del musculo aun no es tan grave.

En las pruebas funcionales realizadas, se notaba en las puntuaciones pequeñas mejoras clínicas, sin embargo, ningún análisis mostro diferencias, En contra parte se analizaron las escalas funcionales antes y después del tratamiento, donde hubo discrepancias, y no se observó ninguna diferencia significativa con una $P > 0.05$ en las pruebas cronometradas, se observó una disminución del tiempo que les lleva realizar las distintas actividades sin ser significativo, el número de individuo por prueba es distinto ya que no se contaba con esos datos, o no era posible para los individuos realizar dicha prueba. Es normal seguir viendo disminución en este tipo de pruebas, así como no ver diferencias grandes, pues el tratamiento retarda un poco los síntomas, no los evita.

Lo último que se hizo se hizo fue la comparación entre los niveles séricos de miostatina y folistatina de seis pacientes, ya que solo de estos seis se contaba con la información más completa, después de 3 meses y 6 meses del tratamiento, lo que no arrojo ninguna diferencia significativa entre ellas, contrario a lo que se esperaba, esto quizá debido a que no encontramos trabajos donde se hayan realizado una relación miostatina con la edad, se plantea que la pérdida constante de musculo, y tomando en cuenta que un niño con DMD perdería funcionalidad motriz alrededor de los 12 años (Matsumura, et al. 1993), la cantidad de musculo

incluso con el tratamiento, sigue disminuyendo con la edad, y por eso encontramos diferencias tan marcadas con respecto a los controles en miostatina, lo que no necesariamente nos indicaría que la proteína está realizando la función de inhibir el crecimiento muscular (Cox, et al. 1993; Klingler, et al. 2012). Estas variación mostradas en nuestro estudio podría ser resultado de una pequeño tamaño de muestra, además de tomar en cuenta que la cantidad de tejido adiposo y conectivo es mayor procedente de miofibras vulnerables, necrosis de las células musculares y procesos inflamatorios presentes en la DMD (Cox, et al. 1993; Klingler, et al. 2012). Estos procesos van aumentados conforme sigue el desarrollo de la enfermedad y no hay una forma de determinar qué porcentaje en realidad sigue representando el musculo.

CONCLUSIONES

La proteína miostatina podría ser usada como una biomarcador en la DMD, ya que al parecer muestra diferencias significativas, pero solo como un biomarcador en etapas tempranas de la enfermedad ya que con el paso del tiempo el musculo sigue degradándose y miostatina no se expresa en las mismas cantidades, por otro lado, folistatina no se puede proponer como un biomarcador sérico ya que al no ser una proteína especifica de musculo sería muy complicado llegar a un diagnostico confiable.

BIBLIOGRAFÍA

2007 Biomarker Editorial: The Many Lives of the Biomarker. *Drug Information Journal* 41(5):551-553.

2010 Bioinformatics and biomarker discovery; "omic" data analysis for personalized medicine. *Sci-Tech News* 64(3):94-94.
Aartsma-Rus, A., et al.

2006a Therapeutic modulation of DMD splicing by blocking exonic splicing enhancer sites with antisense oligonucleotides. *Ann N Y Acad Sci* 1082:74-6.
Aartsma-Rus, A., et al.

2006b 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(2):135-44.
Abe, S., et al.

2009 Expression of myostatin and follistatin in Mdx mice, an animal model for muscular dystrophy. *Zoolog Sci* 26(5):315-20.
Agarwal, S., et al.

2015 BMP signaling mediated by constitutively active Activin type 1 receptor (ACVR1) results in ectopic bone formation localized to distal extremity joints. *Dev Biol* 400(2):202-9.
Akita, Y., et al.

2013 Myostatin inhibits proliferation of human urethral rhabdosphincter satellite cells. *Int J Urol* 20(5):522-9.
Anthony, K., et al.

2014 Biochemical characterization of patients with in-frame or out-of-frame DMD deletions pertinent to exon 44 or 45 skipping. *JAMA Neurol* 71(1):32-40.
Autret-Leca, E., et al.

2009 [Glucocorticoide therapy in premature infants: French practices in 2006]. *Arch Pediatr* 16(7):999-1004.
Balaban, B., et al.

2005 Corticosteroid treatment and functional improvement in Duchenne muscular dystrophy: long-term effect. *Am J Phys Med Rehabil* 84(11):843-50.
Baumbach, L. L., et al.

1989 Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurology* 39(4):465-74.
Biggar, W. D.

2006 Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Rev* 27(3):83-8.
Biggar, W. D., et al.

- 2001 Deflazacort treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr* 138(1):45-50.
Biggar, W. D., et al.
- 2002 Duchenne muscular dystrophy: current knowledge, treatment, and future prospects. *Clin Orthop Relat Res* (401):88-106.
Birnkrant, D. J., et al.
- 2010 The respiratory management of patients with duchenne muscular dystrophy: a DMD care considerations working group specialty article. *Pediatr Pulmonol* 45(8):739-48.
Bogdanovich, S., et al.
- 2002 Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 420(6914):418-21.
Brand, T., and M. D. Schneider
- 1996 Transforming growth factor-beta signal transduction. *Circ Res* 78(2):173-9.
Brooke, M. H., et al.
- 1989 Duchenne muscular dystrophy: patterns of clinical progression and effects of supportive therapy. *Neurology* 39(4):475-81.
Bushby, K., et al.
- 2010 Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol* 9(1):77-93.
Bushby, K., and R. Griggs
- 2007 145th ENMC International Workshop: planning for an International Trial of Steroid Dosage Regimes in DMD (FOR DMD), 22-24th October 2006, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 17(5):423-8.
Coral-Vazquez, R., et al.
- 1993 Analysis of dystrophin gene deletions in patients from the Mexican population with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Arch Med Res* 24(1):1-6.
Coral, V, et al.
- 2010 Distrofias musculares en México: un enfoque clínico, bioquímico y molecular. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas* 15(3).
Cordone, G., et al.
- 1984 [Critical evaluation of changes of serum CK after exertion in the identification of carriers of Duchenne's muscular dystrophy]. *Pediatr Med Chir* 6(6):819-22.
Cox, G. A., et al.
- 1993 Overexpression of dystrophin in transgenic mdx mice eliminates dystrophic symptoms without toxicity. *Nature* 364(6439):725-9.
Chien, Y. H., et al.

- 2013 Myostatin and insulin-like growth factor I: potential therapeutic biomarkers for pompe disease. *PLoS One* 8(8):e71900.
de longh, R. U., et al.
- 2004 BMP and activin receptor expression in lens development. *Mol Vis* 10:566-76.
Dias, V. L., et al.
- 2009 Analysis of activin/TGFB-signaling modulators within the normal and dysfunctional adult human testis reveals evidence of altered signaling capacity in a subset of seminomas. *Reproduction* 138(5):801-11.
Ebisawa, T., et al.
- 2001 Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* 276(16):12477-80.
Eisenbarth, G. S.
- 1987 Immunology of endocrine diseases edited by Alan M. McGregor, MTP Press, 1986. pound32.50 (xi + 202 pages) ISBN 0 85200 963 1. *Immunol Today* 8(5):160.
Ervasti, J. M., and K. P. Campbell
- 1993 Dystrophin and the membrane skeleton. *Curr Opin Cell Biol* 5(1):82-7.
Ervasti, J. M., et al.
- 1990 Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 345(6273):315-9.
Fukuchi, M., et al.
- 2001 Ligand-dependent degradation of Smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins. *Mol Biol Cell* 12(5):1431-43.
Gomez-Diaz, B., et al.
- 2012 Immunodetection analysis of muscular dystrophies in Mexico. *Muscle Nerve* 45(3):338-45.
Grobet, L., et al.
- 1997 A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet* 17(1):71-4.
Gustincich, S., et al.
- 1991 A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques* 11(3):298-300, 302.
Harrison, C. A., et al.
- 2004 Modulation of activin and BMP signaling. *Mol Cell Endocrinol* 225(1-2):19-24.
Hernandez-Canaveral, I., et al.
- 2004 Amplified expression of dominant-negative transforming growth factor-beta type II receptor inhibits collagen type I production via reduced Smad-3 activity. *J Gastroenterol Hepatol* 19(4):380-7.

Hill, J. J., et al.

2002 The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem* 277(43):40735-41.

Hoffman, E. P., et al.

1988 Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 318(21):1363-8.

Hoffman, E. P., et al.

2012 Novel approaches to corticosteroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 23(4):821-8.

Hsu, J. D., and R. Quinlivan

2013 Scoliosis in Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Neuromuscul Disord* 23(8):611-7.

Huang, T., et al.

2011 TGF-beta signalling is mediated by two autonomously functioning TbetaRI:TbetaRII pairs. *EMBO J* 30(7):1263-76.

Josso, N., and N. di Clemente

1997 Serine/threonine kinase receptors and ligands. *Curr Opin Genet Dev* 7(3):371-7.

Kimura, F., et al.

2010 The follistatin-288 isoform alone is sufficient for survival but not for normal fertility in mice. *Endocrinology* 151(3):1310-9.

Klingler, W., et al.

2012 The role of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol* 31(3):184-95.

Koenig, M., et al.

1987 Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50(3):509-17.

Koinuma, D., T. Imamura, and K. Miyazono

2005 [TGF-beta family (TGF-beta, activin, BMP)]. *Nihon Rinsho* 63 Suppl 4:215-9.

Kollias, H. D., et al.

2006 Smad7 promotes and enhances skeletal muscle differentiation. *Mol Cell Biol* 26(16):6248-60.

Kristic, J., et al.

2013 Glycans Are a Novel Biomarker of Chronological and Biological Ages. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*.

Lee, S. J., and A. C. McPherron

- 1999 Myostatin and the control of skeletal muscle mass. *Curr Opin Genet Dev* 9(5):604-7.
Lee, Y. S., et al.
- 2015 Muscle hypertrophy induced by myostatin inhibition accelerates degeneration in dysferlinopathy. *Hum Mol Genet*.
Lerch, T. F., et al.
- 2007 Structural and biophysical coupling of heparin and activin binding to follistatin isoform functions. *J Biol Chem* 282(21):15930-9.
Leung, D. Y., and J. W. Bloom
- 2003 Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 111(1):3-22; quiz 23.
Lit, L., et al.
- 2009 Corticosteroid effects on blood gene expression in Duchenne muscular dystrophy. *Pharmacogenomics J* 9(6):411-8.
Lopez-Hernandez, L. B., et al.
- 2011 [Improvements in the diagnosis of dystrophinopathies: what have we learnt in these last 20 years?]. *Rev Neurol* 52(4):239-49.
Lopez-Hernandez, L. B., N. A. Vazquez-Cardenas, and E. Luna-Padron
- 2009 [Duchenne muscular dystrophy: current aspects and perspectives on treatment]. *Rev Neurol* 49(7):369-75.
Ma, K., et al.
- 2001 Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281(6):E1128-36.
Magee, T. R., et al.
- 2006 Myostatin short interfering hairpin RNA gene transfer increases skeletal muscle mass. *J Gene Med* 8(9):1171-81.
Manzur, A. Y., M. Kinali, and F. Muntoni
- 2008 Update on the management of Duchenne muscular dystrophy. *Arch Dis Child* 93(11):986-90.
Mathews, K. D., et al.
- 2010 Muscular Dystrophy Surveillance Tracking and Research Network (MD STARnet): case definition in surveillance for childhood-onset Duchenne/Becker muscular dystrophy. *J Child Neurol* 25(9):1098-102.
Matsakas, A., et al.
- 2009 Molecular, cellular and physiological investigation of myostatin propeptide-mediated muscle growth in adult mice. *Neuromuscul Disord* 19(7):489-99.
Matsakas, A., and K. Patel
- 2009 Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli. *Histol Histopathol* 24(5):611-29.
Matsumura, K., et al.

- 1993 The role of the dystrophin-glycoprotein complex in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 3(5-6):533-5.
Mazzone, E. S., et al.
- 2013 24 month longitudinal data in ambulant boys with Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 8(1):e52512.
McAdam, L. C., et al.
- 2012 The Canadian experience with long-term deflazacort treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol* 31(1):16-20.
McPherron, A. C.
- 2010 Metabolic Functions of Myostatin and Gdf11. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem* 10(4):217-231.
McPherron, A. C., et al.
- 2013 Increasing muscle mass to improve metabolism. *Adipocyte* 2(2):92-8.
Mendell, J. R., et al.
- 2010 Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 363(15):1429-37.
Mott, J. D., and Z. Werb
- 2004 Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 16(5):558-64.
Moxley, R. T., 3rd, et al.
- 2010 Change in natural history of Duchenne muscular dystrophy with long-term corticosteroid treatment: implications for management. *J Child Neurol* 25(9):1116-29.
Nishiyama, A., et al.
- 2007 Two novel missense mutations in the myostatin gene identified in Japanese patients with Duchenne muscular dystrophy. *BMC Med Genet* 8:19.
Ohlendieck, K., et al.
- 1993 Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma. *Neurology* 43(4):795-800.
Payne, D. N., and I. M. Adcock
- 2001 Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Paediatr Respir Rev* 2(2):145-50.
Pelaia, G., et al.
- 2003 Molecular mechanisms of corticosteroid actions in chronic inflammatory airway diseases. *Life Sci* 72(14):1549-61.
Phillips, D. J., and D. M. de Kretser
- 1998 Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Front Neuroendocrinol* 19(4):287-322.
Rebbapragada, A., et al.

- 2003 Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol Cell Biol* 23(20):7230-42.
Reisz-Porszasz, S., et al.
- 2003 Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(4):E876-88.
Rideau, Y., et al.
- 1995 Treatment of respiratory insufficiency in Duchenne's muscular dystrophy: nasal ventilation in the initial stages. *Monaldi Arch Chest Dis* 50(3):235-8.
Rios, R., et al.
- 2002 Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 282(5):C993-9.
Rodino-Klapac, L. R., et al.
- 2009 Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease. *Muscle Nerve* 39(3):283-96.
Roelen, B. A., et al.
- 1994 Expression of TGF-beta s and their receptors during implantation and organogenesis of the mouse embryo. *Dev Biol* 166(2):716-28.
Scheuerbrandt, G
- 2013 Research approaches for a Therapy of Duchenne Muscular Dystrophy. Part 1: Exon Skipping.
Sewry, C. A., et al.
- 1994 Deficiency of the 50 kDa dystrophin-associated glycoprotein and abnormal expression of utrophin in two south Asian cousins with variable expression of severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 4(2):121-9.
Shimasaki, S., et al.
- 1988 Primary structure of the human follistatin precursor and its genomic organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(12):4218-22.
Solari, Alberto Juan
- 2004 Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina.
Soltanzadeh, P., et al.
- 2010 Clinical and genetic characterization of manifesting carriers of DMD mutations. *Neuromuscul Disord* 20(8):499-504.
Spitali, P., et al.
- 2013 DMD transcript imbalance determines dystrophin levels. *FASEB J* 27(12):4909-16.
Stewart, A., H. Guan, and K. Yang
- 2010 BMP-3 promotes mesenchymal stem cell proliferation through the TGF-beta/activin signaling pathway. *J Cell Physiol* 223(3):658-66.
Takeda, M., et al.

- 2004 Characterization of the bone morphogenetic protein (BMP) system in human pulmonary arterial smooth muscle cells isolated from a sporadic case of primary pulmonary hypertension: roles of BMP type IB receptor (activin receptor-like kinase-6) in the mitotic action. *Endocrinology* 145(9):4344-54.
Verma, S., Y. Anziska, and J. Cracco
- 2010 Review of Duchenne muscular dystrophy (DMD) for the pediatricians in the community. *Clin Pediatr (Phila)* 49(11):1011-7.
Wankell, M., et al.
- 2001 The activin binding proteins follistatin and follistatin-related protein are differentially regulated in vitro and during cutaneous wound repair. *J Endocrinol* 171(3):385-95.
Yue, J., and K. M. Mulder
- 2001 Transforming growth factor-beta signal transduction in epithelial cells. *Pharmacol Ther* 91(1):1-34.
Zhu, X., et al.
- 2000 Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. *FEBS Lett* 474(1):71-5.
Zwaagstra, J. C., et al.
- 2008 Analysis of the contribution of receptor subdomains to the cooperative binding and internalization of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I and type II receptors. *Exp Cell Res* 314(14):2553-68.