



Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad de Medicina

Programa Único de Especialidades Médicas

Instituto Mexicano del Seguro Social

Hospital General "Dr. Gaudencio González Garza"

TÍTULO

Asociación entre las moléculas involucradas en el desgaste muscular y el estado funcional en pacientes con distrofia muscular de Duchenne/Becker

TESIS

PRESENTA

DR. LUIS LEONARDO FLORES LAGUNES

**Para obtener el título de
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA**

TUTOR DE TESIS

DRA. MARICELA RODRIGUEZ CRUZ

COTUTOR DE TESIS

DRA. EUGENIA DOLORES RUIZ CRUZ

Ciudad de México, 4 de febrero del 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

Introducción. La distrofia muscular de Duchenne y de Becker (DMD y BMD) son distrofinopatías ocasionadas por mutaciones en el gen *DMD*, ambas con un cuadro clínico caracterizado por debilidad muscular la diferencia entre ellas es la edad; de inicio, de la pérdida de deambulación y del desarrollo de deterioro multi-sistémico en aquellos órganos con expresión de las iso-formas de esta proteína conocida como distrofina. Aunque actualmente se conoce el origen genético de estos fenotipos aún es insuficiente la información con respecto a la fisiopatología, principalmente en el desgaste muscular secundario a la deficiencia de distrofina, a la presencia de apoptosis, regeneración o daño al sarcolema. Este conocimiento permitirá buscar bio-marcadores, blancos terapéuticos y medidas de tratamiento para estos pacientes.

Objetivo. Investigar la asociación entre las moléculas de desgaste muscular y el estado funcional de los pacientes con DMD o DMB.

Material y Métodos: Mediante un muestreo no probabilístico se incluyeron a todos los pacientes con diagnóstico clínico y molecular de DMD, durante el periodo de febrero del 2014 hasta septiembre del 2015, evaluando un total de 24 pacientes. Previo consentimiento de los padres o tutores se realizó toma de sangre para medición de moléculas de desgaste muscular (CK, MMP-9, FasL, FasR VEGF y FGFb) en esa misma cita se evaluó mediante las escalas de Vignos y Brookes la función muscular.

Análisis estadístico: Se analizaron variables antropométricas y de función muscular. Además, se generaron dos grupos (ambulatorios y uso de silla de ruedas) para comparación entre ambos, posteriormente se analizaron asociaciones mediante coeficientes de correlación de Pearson para aquellos datos con distribución normal y Spearman para aquellos sin normalidad entre las moléculas y el estado funcional.

Resultados: Se encontraron diferencias entre los grupos ambulatorio vs silla de ruedas en las concentraciones concentración sérica de moléculas Fas-L, FGFb, CK y la edad en años. En el análisis se encontraron correlaciones negativas con diferencias significativas (valor de $p < 0.005$), cuando se compararon la edad vs Fas-L, edad vs CK y Vignos vs CK.

Conclusión: El análisis de las moléculas de desgaste muscular en estos pacientes sugiere una relación entre el estado funcional de los pacientes y la disminución de CK, como se ha reportado previamente; y además nos permitió encontrar este mismo comportamiento con Fas-L.

1. INTRODUCCIÓN

Las distrofinopatías constituyen un espectro de miopatías primarias debilitantes, progresivas y letales que varían en su gravedad, causadas por mutaciones en el gen *DMD*. Dentro de éstas, la distrofia muscular de Duchenne (DMD), representa el fenotipo más grave, y su variante clínica la Distrofia Muscular de Becker (DMB) corresponde a una presentación tardía y un progreso generalmente lento. Ambas distrofias presentan un patrón de herencia ligado al cromosoma X, y tienen una incidencia de 1 en 3,600–6,000 y 1 en 18,450 varones nacidos vivos, respectivamente. Los individuos afectados presentan generalmente eliminaciones intragénicas o del promotor del gen *DMD*, con *locus* Xp21.2, que codifica para la proteína distrofina^{1,2}. La deficiencia de ésta proteína genera inestabilidad del sarcolema y posteriormente se desencadena inflamación crónica y degeneración del musculo esquelético⁴. Actualmente no existe un tratamiento efectivo, sin embargo, varias medidas terapéuticas e intervenciones mejoran la historia natural de la enfermedad modificando las edades respecto a la pérdida de la deambulación y la esperanza de vida¹. Algunas de éstas intervenciones incluyen rehabilitación física, vigilancia cardiológica, ortopédica y respiratoria, manejo farmacológico con esteroides, y más recientemente el manejo nutricional³.

1.2. DATOS HISTÓRICOS

La DMD fue la primera enfermedad muscular en la que se reconoció a la proteína mutada causante de la disminución en la fuerza muscular. Aunque el fenotipo fue descrito desde 1830, fue hasta 1975 que mediante microscopía electrónica se describió el defecto en la membrana muscular. Más tarde, su *locus* fue identificado mediante los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) en 1987 el gen se delimitó mediante clonación posicional⁴. Diferentes mutaciones en este gen pueden causar el fenotipo Becker, con menor afectación debido a una expresión disminuida o función parcial de distrofina; y en Duchenne con un fenotipo más grave, secundario a una ausencia total de la proteína^{4,5}.

1.3. GEN *DMD*

La distrofina está codificada por el gen *DMD*, el más grande en el genoma humano. Corresponde al 0.1 % del total del genoma y al 1.5 % del cromosoma X, sin embargo, solo el 1 % de su longitud corresponde a la región codificante, el resto son intrones. La longitud del gen *DMD* es de 2.5 Mb (megabases) y cuenta con 86 exones, con siete diferentes

promotores con sus correspondientes primeros exones para cada uno, este gen transcribe a un RNAm de 14 Kb⁵.

Se han reportado una gran variedad de mutaciones causantes de la enfermedad, las eliminaciones de uno o más exones son las más frecuentemente reportadas en un 60-70% de los pacientes. Otras mutaciones incluyen duplicaciones que pueden generar cambios en el marco de lectura y se presentan en el 5-10 % de los casos, las cuales parecen ser más frecuentes en BMD. El resto de las mutaciones que incluyen inserciones, eliminaciones de pocas bases, cambios en un solo nucleótido y mutaciones en sitio de corte y empalme representan del 25 al 35 % de los pacientes con DMD y del 10 al 20 % en aquellos con BMD^{2,5}.

1.4. PROTEÍNA DISTROFINA

La distrofina muscular es una proteína de 427 kDa que forma parte del citoesqueleto de las células musculares. Su principal función es dar estabilidad al sarcolema, al formar un sub-complejo citoplasmático que pertenece a su vez al Complejo de Proteínas Asociado a Distrofina (CPAD, conjunto de proteínas, intracelulares, trans-membranales y extracelulares que permite la comunicación del miocito con su medio externo (ver Figura 1)⁶. Este complejo se une a la matriz extracelular de colágena y hacia el interior de la célula se une al citoesqueleto a través de la actina fibrilar intra-citoplasmática, la distrofina se localiza principalmente en el sarcolema y en los costámeros, además en lugares de unión intercelular, como las uniones mio-tendinosas y la unión neuro-muscular^{4,6,7}. Su forma recuerda un bastón, y presenta 4 dominios: el amino-terminal similar a alfa-actina, el dominio central que tiene 25 triples hélices similares a espectrina (dominio de barra), otro dominio rico en cisteína, y el dominio carboxilo-terminal. La distribución de sus triples hélices en su dominio de barra, predice su actividad elástica y flexible⁶. La distrofina se une mediante su región amino-terminal a la actina filamentosa (un polímero de 24 unidades). Por otro lado, se une al distroglicano por su región rica en cisteína, y por su dominio carboxilo-terminal a la alfa-distrobrevina y al CPAD⁴.

Por lo tanto, la ausencia de distrofina en el micro-ambiente muscular genera inestabilidad en el complejo y en la membrana celular, además resulta en la disminución de otras proteínas, lo que inicia el proceso inflamatorio con períodos consecutivos de degeneración y regeneración. Los mecanismos de regeneración incluyen la disminución en la cantidad de células satélite (células madre miogénicas localizadas por debajo de la membrana basal de las fibras musculares) y la secreción de factores de crecimiento⁸. Así, en el análisis histopatológico del músculo se encuentran de forma característica fibras

musculares pequeñas de regeneración, con núcleos centrales e infiltración de tejido graso y aumento del tejido conectivo ^{4,8,9}.

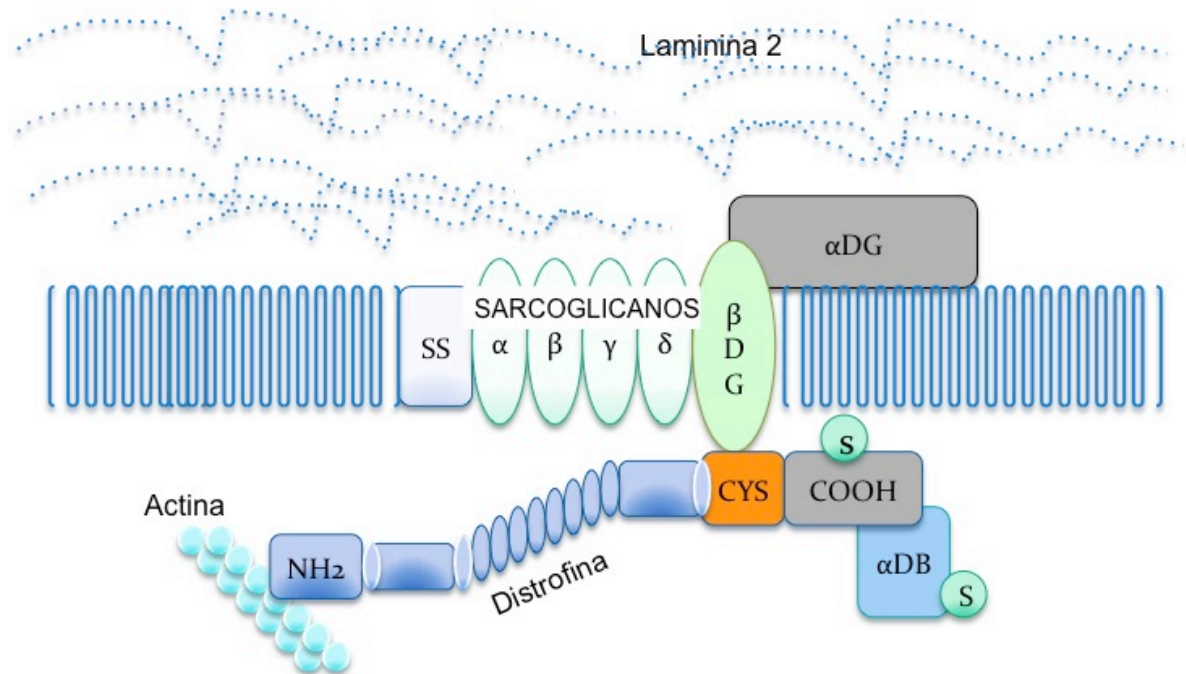


Figura 1. Complejo de proteínas asociadas a Distrofina. Sub-complejo de proteínas intra-citoplásmico.

1.5. FISIOPATOLOGÍA: DESGASTE MUSCULAR Y REPARACIÓN ANORMAL.

En el tejido muscular sano, los mecanismos de reparación resuelven la mayoría del daño agudo, sin embargo, esto no sucede en la distrofia muscular de Duchenne-Becker⁹ puesto que el daño muscular persiste, y los mecanismos de regeneración llegan a ser insuficientes para la reparación, modificando así la arquitectura habitual del músculo. Se han descrito 4 fases conocidas como **degeneración** muscular, dentro de la cual se incluyen la *necrosis* y la *apoptosis*, además ocurre la **inflamación**, la **regeneración** y finalmente la **fibrosis** muscular^{9,10,11}. Estas fases se han dilucidado principalmente en el ratón *mdx*, un modelo animal generado mediante un codón de paro en el exón 23, que no permite la expresión de las isoformas completas de la distrofina pero si de algunas de menor longitud¹³. Sin embargo, varios experimentos han confirmado la correspondencia de ciertas fases de esta enfermedad en el humano.

La **degeneración** muscular en este modelo animal inicia desde el periodo embrionario interrumpiendo la adecuada miogénesis debido a la expresión deficiente de caveolina-3

(una proteína muscular importante durante el desarrollo muscular), apoptosis de los mioblastos y defectos en la regeneración; donde además se propone una miogénesis secundaria y por lo tanto modificada¹⁴.

Existen diferentes teorías y mecanismos propuestos para la **pérdida** o **degeneración muscular** los cuales por sí solos no explican de manera general la pérdida de células musculares, este proceso fisiopatológico también es llamado **desgaste muscular** y ocurre como un fenómeno común de las diferentes distrofias musculares, particularmente en las distrofinopatías. La ausencia o deficiencia en estas proteínas resulta en cambios secundarios como inestabilidad de la membrana muscular (sarcolema), desregulación de la entrada de calcio, necrosis y apoptosis de las fibras musculares, estrés oxidativo, respuesta inflamatoria, ruptura de la matriz extra-celular y fibrosis¹⁵.

Las células musculares adultas son células diferenciadas y sincitiales, en éstas como en otras células se desencadena la **apoptosis** como un mecanismo fisiológico de regulación. La apoptosis es un proceso celular individual de muerte, regulado por la activación de genes específicos, y morfológicamente caracterizada por condensación nuclear y citoplasmática, fragmentación de la célula en “cuerpos apoptóticos”, los cuales son engullidos posteriormente por los fagocitos y por lo tanto, el proceso de inflamación secundario es menos exacerbado. Los cambios en las células son consecuencia de la activación de endonucleasas intra-nucleares y proteasas citoplasmáticas, depende entonces de la activación de caspasas que a su vez requieren energía, la transcripción de genes específicos y la traducción de proteínas. Debido a que requiere energía celular los niveles de ATP son condicionantes para el inicio ya sea de necrosis o de apoptosis^{16,17,18}. Aunque la apoptosis parece tener un papel fisiológico importante durante el desgaste muscular, su participación en el desarrollo de la fisiopatología actualmente es controversial.

Existen dos formas de iniciar la apoptosis, a través de la vía intrínseca o de la vía extrínseca, ésta última tiene como característica estar mediada por la interacción de receptores¹⁶, los cuales forman parte de la super-familia de receptores TNF, mediante la unión a su dominio de 80 aminoácidos llamado “dominio de muerte”. Los ligandos de estos receptores incluyen a; TNF-alfa, APO3L, APO2L y FasL (TNFSF6), este último induce apoptosis *in vitro* en células musculares, y su expresión génica se encuentra aumentada en linfocitos de pacientes con DMD comparada con sujetos sanos. Así mismo las fibras musculares presentan los receptores para este ligando (**Fas-R, receptor de ligando de Fas**)²⁰. El **ligando de Fas (Fas-L**, también llamado APO-1 o CD95) es una molécula con actividad citotóxica, mediante su interacción por su “dominio de muerte”

compartido con el receptor TNF1 (principalmente expresado en la superficie de células T citotóxicas) para iniciar la muerte celular por apoptosis¹⁶.

Por otro lado, la vía intrínseca se distingue por responder a un estímulo (negativo o positivo de acuerdo a su participación en la respuesta intracelular) que no involucra receptores inicialmente para producir una señal intracelular y una serie de eventos moleculares en la mitocondria, requiere la participación de la familia de proteínas Bcl-2, éstas a su vez regulan la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Entre las moléculas se encuentran: Bax, Bcl-10, Bak, entre otras, y en contraposición a éstas se encuentran las anti-apoptóticas como Bcl-2, Bcl-X, Bcl-XL, Bcl, que detienen la respuesta apoptótica; además de otras más descritas actualmente¹⁶.

Por otro lado, la **necrosis** también se ha propuesto como mecanismo de pérdida de fibras musculares deficientes en distrofina. Esta propuesta se basa en los cambios histopatológicos característicos posteriores al proceso degenerativo, incrementando el volumen del lumen del retículo endoplásmico, su morfología mitocondrial aberrante, e inflamación local y sistémica^{8,19,21}. Varias condiciones celulares promueven la necrosis, entre las cuales se encuentra: la desregulación de entrada de calcio a la célula (teoría de la ruptura de membrana y de alteraciones de canales de calcio), la acción de moléculas inflamatorias y el incremento de especies reactivas de oxígeno¹⁷. Ambos procesos (apoptosis y necrosis) tienen como vía común la trimerización del receptor de Fas. También se ha documentado que dichos procesos pueden coexistir en el mismo tejido como sucede en el infarto al miocardio y en contraste a lo esperado, algunos estímulos con sustancias mio-tóxicas, causan necrosis en lugar de la esperada activación de la apoptosis¹⁸.

1.5.1. APOPTOSIS Y NECROSIS COMO MECANISMOS DE DESGASTE MUSCULAR EN DMD/BMD.

Existe evidencia de que la **apoptosis** es una de las maneras en que el músculo deficiente en distrofina se pierde tanto en el modelo de ratón *mdx*, como en el humano con DMD^{18,22}.

Los estudios iniciales en los que se evaluó la apoptosis utilizaban marcadores directos en la biopsia de músculo que indicaban los cambios que ocurren en el micro-ambiente muscular. Entre estos estudios destacan los siguientes:

Algunos estudios compararon la formación de núcleos pro-apoptóticos entre pacientes con DMD y controles sanos, los resultados observados indicaron una mayor presencia de estos núcleos en el primer grupo^{18,19}. Sin embargo, otro estudio no coincide con estos

resultados, encontrando una mayor fragmentación de DNA (evaluación indirecta del proceso activo de apoptosis) en pacientes sanos o con denervación que en aquellos con distrofia miotónica, distrofinopatía o enfermedad inflamatoria muscular. En el mismo estudio, los autores indican que en las biopsias musculares, encontraron diferentes células mononucleares intersticiales con datos de apoptosis en los pacientes con distrofinopatía, pero no así en el interior de las células musculares. Además encontraron fragmentación de DNA en los mio-núcleos de pacientes sin miopatía (denominados normales) concluyendo que se trata de un fenómeno propio del recambio celular normal. Sin embargo, no se menciona en que etapa funcional se encontraban los pacientes o cual era su edad al momento del estudio²³.

Otros estudios que evalúan la apoptosis, específicamente la vía intrínseca como mecanismo de desgaste molecular son los siguientes:

Un estudio realizado en ratones *mdx*, demostró el aumento en la expresión proteica y génica de **Bax**, en conjunto con caspasas 3 y 9 en tejido muscular a la semana 3 y 4 de vida de estos ratones comparados con ratones sanos²⁴. Estos resultados demuestran que la apoptosis es un fenómeno inicial en la degeneración muscular.

En los estudios con seres humanos destaca la medición proteica y la expresión génica de **Bcl-2** (molécula con actividad anti-apoptótica) en biopsia de músculo de pacientes sanos, de pacientes con Polimiositis (enfermedad inflamatoria del músculo esquelético) y un tercer grupo con diagnóstico clínico y molecular de DMD. Los hallazgos demostraron una disminución significativa de Bcl-2 en las biopsias de pacientes con enfermedad muscular (DMD y polimiositis) comparado con sujetos sanos. Un dato importante en este estudio es que **Fas-R** no se encontró expresado en individuos sanos, pero si en las fibras musculares de los pacientes con DMD analizados, con predominio en las fibras musculares tipo 2²⁵.

En un ensayo clínico previo, se estudiaron biopsias de músculo de pacientes con DMD, controles sanos y otras enfermedades neuro-musculares adquiridas se evaluó la expresión de Bcl-2 y Fas-R, encontrando que estas moléculas solo se expresan en las miopatías y en las células inflamatorias pero no en los controles, además de generar disminución del tamaño de las fibras. Los resultados sugieren que Bcl-2 protege a las fibras musculares y a las células inflamatorias a pesar de expresar conjuntamente Fas-R²⁶. En contraparte, otros estudios realizados en el modelo *mdx* han demostrado que ni la inhibición experimental de ARC (Represor de la Apoptosis con Dominio de Reclutamiento de Caspasas, una molécula represora de apoptosis únicamente expresada en células de músculo esquelético y cardiaco) o de Bcl-2 disminuyen el desgaste muscular¹⁷. Estos

estudios dejan la interrogante sobre la participación de la vía extrínseca en la degeneración muscular puesto que la pérdida de células musculares no es totalmente explicada por el daño mecánico o por la vía intrínseca. Así que, es necesario complementar el estudio de este fenómeno importante en la fisiopatología del músculo deficiente en distrofina. En adición a estos estudios, existe evidencia en ratones *mdx* de que la apoptosis precede a la necrosis y que disminuye posteriormente. La apoptosis se ha observado desde las 2 semanas de vida en el ratón, encontrando cambios en los núcleos con presencia de DNA fragmentado desde las 4 semanas de vida. Además se observaron mitocondrias condensadas, retículo endoplásmico fragmentado y núcleo con condensación de cromatina similar a la apoptosis²⁷.

En este sentido, otro estudio realizado en dos grupos de ratones (*mdx* y control), reportó un incremento en la expresión de genes control y de crecimiento celular, así como pro-apoptóticos como: ubiquitina, c-myc y Bax desde la 3^a, 5^a y 7^a semanas de edad, respectivamente, estos hallazgos se encontraron en ambos grupos, indicando su participación en la fase “activa” de la enfermedad en el modelo *mdx*²⁸. Estos cambios generados en las células musculares también se han descrito como **estrés intracelular mediado por la mitocondria**, un fenómeno similar a apoptosis en el modelo *mdx* que puede suceder durante la necrosis de la fibra muscular, donde las principales moléculas efectoras son: Caspasa-12, relacionada a la vía del estrés del retículo endoplásmico, Bax, Caspasa-9 y Caspasa-3 (vía estrés de la mitocondria), como se demostró en el músculo masetero de los ratones *mdx*²⁴. En otro estudio se encontró un aumento en la concentración tisular de Caspasa-12 a las 2 a 3 semanas post-nacimiento y Bax aumentó a las 3 semanas post-nacimiento, y la Caspasa-9 y 3, a las 3-4 semanas, esto cuando la regeneración y la necrosis eran mayores (confirmado por pérdida de la morfología celular y cambios morfológicos similares a necrosis en los tejidos analizados). Estos resultados sugieren que el estrés ocasionado por estas moléculas efectoras se lleva a cabo en el Retículo Endoplásmico y esto mantiene la morfología de la célula, en ausencia de distrofina²⁹.

En conclusión, existen diferentes resultados que se contraponen en cuanto a la presencia de características morfológicas en estudios de biopsia, sin embargo al ser el miocito una célula de arquitectura compleja y que forma un sincitio, es poco probable que exista un fenómeno de apoptosis idéntico al descrito en modelos celulares conocidos.

La **inflamación** es un proceso dinámico, donde participan diferentes células especializadas, moléculas y citocinas para contener el estímulo dañino a los tejidos²¹. En la etapa posnatal, tanto en el modelo de ratón *mdx* como en el ser humano, en el músculo

posterior al estrés mecánico por la contracción muscular, en las fibras musculares se producen lesiones microscópicas, también denominadas lesiones delta, que en términos generales modifican la homeostasis del calcio, principalmente generando un mayor influjo de calcio intraplasmático que activa proteasas como la calpaína; la cual inicia la necrosis muscular con un proceso también conocido como auto-digestión^{9,10,21}.

Posteriormente, las fibras musculares son infiltradas por macrófagos, de tipo pro-inflamatorio (M1) y anti-inflamatorio (M2), éstas son las principales células inflamatorias que se encuentran en las fibras musculares de los pacientes con DMD, aunque también se pueden encontrar linfocitos T, y B y células dendríticas en menor cantidad¹².

Otra molécula importante, previamente mencionada es la calpaína, la cual es responsable de hasta un 60% de necrosis muscular, en el resto de la necrosis están involucradas citocinas inflamatorias que participan activamente en este proceso^{13,15}, entre las que se incluyen el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), la interleucina 1 β , 6 y 17 (IL-1 β , IL-6 e IL-17, respectivamente) e interferón gamma (IFN γ)^{8,10,15}. La Interleucina tipo 1 β , es secretada por los macrófagos que infiltran al músculo inflamado por lo que su actividad es claramente pro-inflamatoria. Por otro lado, la IL-6 es producida por linfocitos T cooperadores tipo 2, por lo que también tiene actividad anti-inflamatoria, sin embargo, no tan marcada como la de IL-10, que activa a los macrófagos M2 (anti-inflamatorios) que estos a su vez promueven la angiogénesis, la reparación y la remodelación muscular¹².

Estos cambios que desencadenan la **inflamación** son muy complejos y se sabe que inician con el influjo de calcio y la liberación de la enzima fosfolipasa A2, responsable de la ruptura de fosfolípidos de membrana y la liberación de ácido araquidónico para formar eicosanoides que inician el proceso inflamatorio y la respuesta nociceptiva^{9,30}.

De las citocinas que están elevadas, se encuentra principalmente el factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF-alfa), alcanzando niveles en suero hasta de 1,000 veces por encima de los niveles observados en los individuos sanos¹¹ y con incremento en su mRNA en linfocitos de sangre periférica en pacientes con DMD³¹. Esta citocina puede aumentar inclusive en situaciones de trauma mínimo al músculo³⁰ y sus efectos van desde la quimiotaxis de mioblastos hasta la mitogénesis de células satélite, además de su capacidad de iniciar la cascada inflamatoria de otras citocinas^{8,10,11,32}; también induce proteólisis y por lo tanto se considera responsable de la pérdida muscular en los procesos inflamatorios. El TNF-alfa es un importante indicador de inflamación muscular, pues sólo se encuentra presente en el músculo posterior al trauma¹¹, y la concentración en plasma también es significativamente mayor en pacientes con DMD comparados con individuos sanos⁸. Esta citocina es producida principalmente por células inflamatorias como linfocitos

T “helper” o “cooperadores” 1 entre otras células que migran al sincitio muscular, también son producidas por el mismo músculo¹⁰.

La **regeneración** muscular es un evento muy importante y complejo para el mantenimiento del músculo, y éste es llevado a cabo por las células satélite, las cuales son células madre (stem cells, SC) quiescentes, que pueden proliferar y diferenciarse a células musculares en respuesta al trauma produciendo el **Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor)**, favoreciendo la angiogénesis y la supervivencia de ellas mismas^{9,10}. Este proceso inicia de 7 a 10 días posterior al daño muscular en modelos animales con lesión aguda, tras recibir la señal de diferenciación mediante factores de crecimiento como el **Factor de Crecimiento de Fibroblastos primario (basic-Fibroblast Growth Factor, bFGF)**, el Factor de Crecimiento Insulinoide-1 (Insulin like Growth Factor, IGF-1), los Factores de Crecimiento de Hepatocitos y Nervios (*Hepatocyte Growth Factor* y *Nerve Growth Factor*, HGF y NGF, respectivamente)¹⁰.

En caso de que el proceso de regeneración muscular no se realice de manera eficiente se activa la **fibrosis**, que consiste en la acumulación excesiva de componentes de la matriz extracelular, principalmente colágeno^{9,10} y posteriormente su degradación por un grupo de enzimas con actividad de proteasas.

En resumen, en el músculo lesionado se desencadenan varios mecanismos para su reparación, en la cual están involucradas células inflamatorias (macrófagos M1 y M2, neutrófilos, linfocitos, monocitos), moléculas pro-inflamatorias como TNF-alfa, IL-1 e IL-6, y anti-inflamatorias como IL-10, proteasas de matriz extracelular e intracelular como la MMP-9 y calpaína. También participan moléculas de regeneración (VEGF, FGFb) y moléculas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas (Bax, Bcl-2, Fas-R, FasL) entre otras¹⁷, que indican de forma indirecta la fase de daño en la que se encuentra el músculo. Sin embargo, como se mencionó estas fases no se encuentran bien delimitadas en los pacientes con DMD, actualmente solo se ha podido demostrar que existe temporalidad de su inicio y terminación en el ratón *mdx*. En la actualidad debido a que el abordaje clínico de las distrofinopatías evita el uso de la biopsia muscular como método de diagnóstico, resulta de particular utilidad encontrar bio-marcadores séricos para el diagnóstico y seguimiento.

1.6. CUADRO CLÍNICO Y EVALUACION DE LA FUNCIÓN MUSCULAR

La gran mayoría de los pacientes es diagnosticado alrededor de los 3 a 5 años presentando alguno o varios de los siguientes síntomas y signos: retraso en la

deambulaci3n, caídas frecuentes, dificultad para correr o subir escaleras y retraso en los hitos del desarrollo (lenguaje y caminata), asociado a una pseudo-hipertrofia de gastrocnemios¹. Éstos datos clínicos son el resultado de la pérdida de fuerza y funcionalidad del músculo. El progreso de la enfermedad puede ser evaluada de forma clínica, mediante los siguientes parámetros: **Fuerza muscular**, la cual puede ser valorada durante la exploraci3n física mediante escalas estandarizadas como la escala modificada del *Medical Research Council* (MRC)^{33,34}, esta escala valora de manera cualitativa la fuerza mediante la observaci3n de la contracci3n muscular por el evaluador, que va desde ausencia de contracci3n muscular (0) hasta una contracci3n "normal" (5). Recientemente se ha expandido hasta 11 puntos para aumentar su sensibilidad^{35,36}. Otra escala utilizada es la Escala de Capacidad Motora (MAS, motor ability scale) de 40 puntos. Ambas escalas requieren entrenamiento y est3n sometidas a sesgos inter-operador^{33,34}. Tambi3n existen mediciones cuantitativas como el uso de dinam3metros isocin3ticos, cuerdas de fuerza y dinam3metros de mano³⁵, en los que se evalua la fuerza muscular basado en una escala numérica y mediante un registro mecánico o electr3nico. No obstante, es importante considerar que algunas variables como la arquitectura de la fibra muscular, edad, longitud y tamaño del músculo en la contracci3n, la velocidad de la contracci3n, asi como el estado de ánimo y el estado cognitivo pueden influenciar en las mediciones, adem3s de las variables del equipo como la calibraci3n y el tipo de dinamometro³⁷.

En cuanto a la **funcionalidad**, ésta puede ser evaluada mediante las escalas de Brookes, Vignos, la escala de capacidad motora (MAS) Hammersmith^{1,4,35} y el Sistema de Clasificaci3n de la Funci3n Motora Gruesa. Aunque esta ultima fue diseñaada originalmente para la clasificaci3n funcional de niños con parálisis cerebral³⁶ y tambi3n se ha utilizado para la evaluaci3n de niños con DMD/BMD³⁷. Las primeras dos escalas permiten evaluar la funci3n muscular con mayor facilidad, son pruebas m3s sencillas de reproducirse y se han utilizado en varios ensayos clínicos de funci3n muscular^{34,35,36}. Sin embargo, una desventaja importante es que estas escalas son menos sensibles conforme el paciente pierde la ambulaci3n, principalmente la escala de Vignos que mide la funcionalidad de miembros pélvicos³⁸.

En cuanto a la periodicidad de las evaluaciones, no existe un tiempo establecido o validado, algunos estudios describen intervalos entre 3 y 6 meses, pero éstos parecen obedecer a cuestiones logísticas m3s que a resultados clínicos^{34,35,36,37}, la recomendaci3n generalizada es evaluar al menos por 6 meses a los pacientes³⁷.

1.7. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico generalmente inicia con la sospecha clínica en un paciente masculino con disminución en la fuerza muscular y otros datos clínicos mencionados previamente, que invitan al clínico a realizar estudios de laboratorio. En estos pacientes se encuentran cifras elevadas en la concentración sérica de creatinfosfocinasa (CK), y de las enzimas aspartato aminotransferasa y/o alanino aminotransferasa¹.

El diagnóstico se confirma mediante el estudio molecular o la biopsia muscular, en el primero se evidencia la presencia de mutaciones de pérdida de función⁴¹ y en el segundo mediante técnicas de inmunotinción se puede observar la ausencia o disminución de la proteína distrofina en las fibras musculares. Aunque el uso de diferentes métodos para el diagnóstico depende de su disponibilidad y la experiencia de quien lo realice, siempre será necesario confirmar el diagnóstico mediante el estudio molecular^{1,41,42,43}. Esto es debido a que actualmente se encuentran en fase experimental varios ensayos clínicos como tratamiento basados en el mecanismo molecular que causo la distrofinopatía. Por lo tanto, los tratamientos son específicos para mutaciones causantes del fenotipo⁴⁴. Si el resultado de un estudio molecular es negativo no se puede descartar el diagnóstico ya que ninguna prueba actualmente ofrece una sensibilidad del 100 por ciento.

1.8. BIOMARCADORES DE ENFERMEDAD

Actualmente existen diferentes estudios que analizan de manera directa o indirecta el desarrollo de la distrofia tipo Duchenne, especialmente de cómo se modifican algunas moléculas relacionadas a su fisiopatología con la intención de identificar cuáles de éstas nos indican la gravedad de la enfermedad. Además con la intención de investigar si un medicamento mejora o no la función muscular. De manera que es necesario buscar biomarcadores denominados sub-rogados, que informen de la actividad biológica de los fármacos o las medidas terapéuticas utilizadas. A continuación se describe la importancia clínica de dos moléculas seleccionadas en este estudio⁴⁵.

La CK y la MMP-9 son ejemplos de bio-marcadores de la enfermedad que actualmente se utilizan para vigilancia clínica en diferentes protocolos. La CK es una enzima medida de forma rutinaria en el diagnóstico de la DMD, la cual disminuye entre 8 al 18 % por año con el progreso de la enfermedad y con la edad, con importante variabilidad en el mismo individuo. La CK refleja la falta de integridad del sarcolema, necrosis y es un parámetro intrínseco del músculo, su gran variabilidad intra e interindividual y disminución paulatina acorde a la edad hace difícil de interpretar su comportamiento después de un tratamiento médico o farmacológico⁴⁵.

Durante la degeneración también participan otras moléculas como la metaloproteinasas 9 de matriz (**MMP-9**) también conocida como gelatinasa B, una molécula encargada de la remodelación y degeneración de la matriz extracelular al degradar a la colagéna tipo IV, V, VII y X y fibronectina⁴⁶, esta molécula se identificó a través de estudios de expresión génica (concentración elevada de mRNA) en el músculo deficiente de distrofina⁴⁷. La función de esta enzima es la degradación de la matriz extracelular y la remodelación de los tejidos, así que la sobre-expresión de su gen debe de ser regulado por la necesidad de reparar un daño tisular y la posterior formación de fibrosis⁴⁶. Esta molécula se encuentra incrementada en su expresión génica en ratones deficientes de distrofina (*mdx*, modelo murino de la DMD), por lo que su inhibición en este modelo animal mejora el daño, disminuye la degeneración y la fibrosis muscular⁴⁷. Además, la concentración sérica tiene relación directa con la progresión de la enfermedad en pacientes con DMD⁴⁶.

Por otro lado, la **MMP-9**, se ha propuesto como un bio-marcador validado para vigilar el progreso de la enfermedad y respuesta a terapias. Esta propuesta se basa en la evidencia reportada en diferentes estudios, uno de ellos realizado en aproximadamente 300 pacientes y otro estudio longitudinal en 60 pacientes con diagnóstico de DMD⁴⁸, en estos estudios se demostró el aumento de sus niveles séricos en comparación con sujetos sanos, además de que los niveles se incrementan con el progreso de la enfermedad como se comprobó en un estudio en donde se realizaron mediciones seriadas durante 5 años. Sin embargo, se requieren más estudios clínicos que permitan validar a la MMP-9 como un bio-marcador de respuesta a terapia⁴⁶. No obstante, no existen estudios a nuestro conocimiento que evalúen la concentración de esta molécula y su relación con la función muscular.

1.9. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO ACTUAL Y TERAPIAS EN DESARROLLO

Actualmente no existe una cura para las distrofinopatías, sin embargo, muchos esfuerzos en investigación clínica y básica apuntan a un objetivo en común, el cual es detener el proceso inflamatorio desencadenado por la inestabilidad del sarcolema⁴⁴. Otros ensayos clínicos tienen como finalidad modificar la expresión de la proteína distrofina, mediante el arreglo en el marco de lectura del RNAm “saltando” exones⁴⁹.

Así, conociendo de manera más específica la cascada de procesos moleculares es posible diseñar protocolos clínicos para la búsqueda de agentes anti-inflamatorios como moléculas antagonistas o con efecto anti-inflamatorio⁵⁰.

El manejo farmacológico estándar que se utiliza en la actualidad, consiste en el uso de anti-inflamatorios esteroideos, inicialmente prednisona y más recientemente el

deflazacort, un derivado oxazolona de la prednisolona; y del cual los beneficios clínicos más importantes se destacan a continuación: aumentan el tiempo de pérdida de la ambulación, disminución del desarrollo de escoliosis y mantenimiento de la capacidad vital pulmonar. Sin embargo, algunas consecuencias clínicas son perjudiciales como disminución en la densidad mineral ósea, ganancia de peso y el desarrollo de cataratas⁵⁰. Otras alternativas de manejo de acuerdo a la fisiopatología de la enfermedad son los agonistas beta 2 adrenérgicos que son inductores de la calpastatina, una molécula inhibidora de la calpaína; sin embargo, los efectos cardiovasculares de estos agentes limitan su uso en varios pacientes⁵¹.

También se ha propuesto el uso de anticuerpos anti-TNF-alfa, que inhiben su actividad en procesos inflamatorios, sin embargo, esta molécula es necesaria para el proceso de regeneración por lo que su actividad sería en detrimento en la fuerza muscular²⁹.

La inhibición de la vía de la ciclo-oxigenasa en su isoforma tipo 2 (COX-2), ha demostrado el mismo inconveniente con el tratamiento previamente descrito, ya que interfiere con la regeneración de los miotúbulos, pues disminuye la regeneración del músculo lesionado y aumenta el tiempo de recuperación¹⁵, presumiblemente por una disminución en la infiltración de mioblastos en modelo de ratón *knock-out* para COX-2⁵².

2. JUSTIFICACIÓN

La Distrofia Muscular de Duchenne-Becker (DMD/BMD) es un trastorno letal de origen genético más frecuente en la niñez, aunque existen grandes esfuerzos en investigación básica y clínica, actualmente no se cuenta con un tratamiento eficaz, por lo que las medidas actuales de manejo representan principalmente acciones de vigilancia, detección temprana y prevención. Estas medidas requieren el compromiso de grupos multidisciplinarios que abarcan y no solo se limitan a las principales áreas de comorbilidad y mortalidad relacionadas a esta afección neuromuscular.

La mayoría de los estudios clínicos evalúan la fuerza y función muscular mediante escalas o parámetros bio-físicos, los cuales si bien arrojan diferencias entre los grupos evaluados, requieren entrenamiento de los evaluadores o en ocasiones de equipos costosos.

Los marcadores evaluados son proteínas involucradas en el desgaste muscular que han sido reportadas principalmente en el modelo de ratón deficiente en distrofina *mdx* y sus modificaciones en concentraciones séricas que reflejan el estado del músculo, corresponden a proteínas del sistema Fas y su ligando, una proteína de degradación de matriz extra-celular así como factores de regeneración muscular. Estas moléculas son accesibles ya que se cuantifican en sangre periférica y evitan el uso de la biopsia muscular. Actualmente no están contempladas en el protocolo de diagnóstico clínico en estos pacientes, y que solo reporta el estado de la zona muscular evaluada.

Debido a esto resulta útil el uso de bio-marcadores, relacionados directamente a la fisiopatología, específicamente marcadores de desgaste muscular que nos permitan evaluar los tratamientos y su respuesta con relación a mediciones objetivas y con un rango considerable de confiabilidad.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe alguna asociación entre la función muscular en pacientes con Distrofia Muscular de Duchenne/Becker y las moléculas de desgaste muscular?

4. HIPÓTESIS

La función muscular muestra una relación directa con las moléculas de desgaste muscular en paciente con Distrofia muscular de Duchenne/Becker sin tratamiento farmacológico.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe asociación entre la función muscular y las moléculas de desgaste muscular en pacientes con distrofia muscular de Duchenne/Becker.

5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar la asociación entre la concentración sérica de las moléculas de degeneración Fas-R, Fas-L, MMP-9, CK con el estado funcional en pacientes con DMD/BMD.

Identificar si existe asociación entre la concentración sérica de las moléculas de regeneración VEGF y FGFb con el estado funcional en pacientes con DMD/BMD.

6. METODOLOGIA

6.1. TIPO DE ESTUDIO

Estudio observacional, descriptivo y transversal.

6.2. LUGAR DE ESTUDIO

La valoración clínica y la determinación de las moléculas se realizaron en la Unidad de Investigación Médica en Nutrición, ubicada en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social (CMNSXXI-IMSS).

6.3. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se incluyeron pacientes con diagnóstico clínico de la DMD o BMD, que acudieron al Servicio de Electrodiagnóstico y Distrofia Muscular de Instituto Nacional de Rehabilitación, y a los Departamentos de Genética Médica del Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund” del Centro Médico Nacional Siglo XXI; Hospital General “Dr. Gaudencio González Garza” de Centro Médico Nacional “La Raza”, IMSS y el CRIT Centro de Rehabilitación Infantil Teletón Hidalgo.

El proyecto se registró ante la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS con número de Registro 2012-785-006.

6.4. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO

Inclusión:

1. Pacientes diagnosticados clínicamente con DMD o DMB.
2. Pacientes con diagnóstico molecular de DMD o DMB.
3. Entre 3 y 18 años de edad.
4. Consentimiento del paciente y padres o tutores, firmando la carta de autorización para participar en el estudio.

Exclusión:

1. Consumo de corticoesteroides.
2. Que decidan abandonar el estudio

Eliminación:

1. Retiro del consentimiento informado.

6.5. TIPO DE MUESTREO:

Por conveniencia, se incluyeron pacientes diagnosticados entre el periodo febrero del 2014 a septiembre del 2015.

6.6. DEFINICION DE VARIABLES

VARIABLES INDEPENDIENTES

Función muscular

Se realizaron pruebas cuantitativas mediante la escala de Brookes y de Vignos para valorar el estado funcional en relación a las extremidades superiores e inferiores, respectivamente (ver ANEXO).

VARIABLES DEPENDIENTES

Marcadores de degeneración muscular

Apoptosis: Las moléculas del receptor de Fas soluble (Fas-R) y del receptor de ligando de Fas (Fas-L) se midieron mediante ELISA. Variables cuantitativas expresadas en picogramos por mililitro (pg/mL).

Indicadores de degeneración muscular: La metaloproteinasa de matriz extracelular (MMP-9) se midió mediante ELISA y es una variable cuantitativa expresada en nanogramos por mililitro (ng/mL) y la Cinasa de fosfocreatina (CK), se expresa en Unidades Internacionales por litro (UI/L) y se midió mediante inmuno-ensayo quimioluminiscente.

Marcadores de regeneración muscular

Estos marcadores incluyeron al Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) y el Factor de Crecimiento de Fibroblastos Primario (FGFb), ambos son variables cuantitativas. Las unidades utilizadas para ambos factores son en picogramos por mililitro (pg/mL).

6.7. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

PROCEDIMIENTOS

A los pacientes con diagnóstico clínico de DMD/BMD se les invitó a participar en el estudio, primeramente a los padres o tutores y a los pacientes se les explicaron los fundamentos, procedimientos y beneficios del estudio que proporciona su participación, el derecho de confiabilidad y de abandonarlo cuando así lo desearan. Posteriormente se les realizó el estudio molecular confirmatorio de la distrofia (ver Técnicas de medición).

Además, se informó de una manera verbal utilizando un lenguaje comprensible para los padres sobre los parámetros analizados en los niños. Si los padres o tutores aceptaron que su hijo participara en el estudio, entonces se les pidió que asistieran con el paciente en ayuno a la Unidad de Investigación Médica en Nutrición, ubicada en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, y en su primera cita se les solicitó que firmaran la carta de consentimiento.

El día de la cita se registró la edad, peso, talla y se tomó una muestra de sangre en ayuno mediante venopunción y se recibió en tubos vacutainer sin anticoagulante, posteriormente se centrifugó a 3,000 g (4,728 RPM) durante 20 minutos, para separar el suero, el cual se almacena a -70°C para cuantificar posteriormente las moléculas de degeneración (receptor Fas soluble, Fas-L, MMP-9 y CK) y de regeneración muscular (VEGF y FGFb). Además, el día de la cita se evaluó la función muscular de acuerdo a las escalas de Brookes y Vignos (ver ANEXO).

Finalmente se realizaron las mediciones antropométricas.

6.8. TÉCNICAS DE MEDICIÓN

6.8.1. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Para la confirmación mediante diagnóstico molecular se tomó una muestra de sangre periférica mediante veno-punción directa, posterior a la invitación al proyecto.

Se realizó la extracción de DNA genómico, a partir de leucocitos de sangre periférica utilizando el kit PCR Multiplex for human DMD/DMB set 1 + set 2, de la marca Maxim

Biotech. El cual amplifica los exones 8 (360 pb), 17 (416 pb), 19 (459 pb), 44 (268 pb), 45 (547 pb), 48 (506 pb), 12 (331 pb), 51 (388 pb) y 4 (196 pb) del set 1 y los exones: 3 (410 pb), 6 (202 pb), 13 (238 pb), 43 (357 pb), 47 (181 pb), 50 (271 pb), 52 (113 pb), 60 (139 pb) y el promotor específico de músculo (535 pb) del gen de distrofina.

Se agregan en cada tubo ependorff, los siguientes reactivos en siguiente orden: MPCR Buffer Mixture, MPCR primers, Polimerasa de DNA (5 U/ μ l), DNA genómico del paciente, y agua. La amplificación de PCR se realizó en termociclador (Biometra, Alemania).

Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 2% para ser observados como bandas de acuerdo a su peso molecular, comparados con el marcador de peso molecular y un control de DNA de un sujeto sano.

6.8.2. VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS

La talla se midió con un estadímetro de pared y el peso se registró mediante báscula Tanita en aquellos pacientes que pudieran mantenerse en pie. Los pacientes confinados a silla de ruedas, fueron pesados en una silla-báscula marca Seca y en decúbito supino se les midió la longitud.

6.8.3. DETERMINACIÓN DE LOS MARCADORES DE DEGENERACIÓN MUSCULAR.

Las moléculas de Fas-R soluble, Fas-L y MMP-9 se midieron mediante la técnica de ELISA con los kits comerciales de R&D Systems, Inc. La CK se cuantificó mediante ensayo inmunométrico quimioluminiscente.

6.8.4. DETERMINACIÓN DE LOS MARCADORES DE REGENERACIÓN MUSCULAR.

Los factores de Crecimiento Endotelial (VEGF) y de Fibroblastos Primario (FGFb) se cuantificaron utilizando la técnica de ELISA mediante los kits comerciales de R&D Systems, Inc. Las moléculas analizadas por la técnica de ELISA se analizaron de la siguiente forma: sobre una micro-placa de 96 pocillos se agregaron 100 μ L del diluyente de ensayo, posteriormente se añadieron el control, y las muestras de suero, la placa se cubrió con una película de sellado y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Se

aspiró el sobrenadante de los pozos (que contienen el anticuerpo monoclonal adherido a la superficie interna del pozo) y se realizaron de 3 a 4 lavados, para después añadir 200 μ L de conjugado (anticuerpo policlonal conjugado con la enzima peroxidasa), sellar con película e incubar por 2 horas a temperatura ambiente, y repetir las aspiración del contenido y el lavado en 4 ocasiones. Posteriormente se agregaron 300 μ L de solución de sustratos A y B (A contiene peróxido de hidrógeno y B tetrametilbenzidina un cromógeno estabilizado), para incubar por 30 minutos protegido de la luz. Después se agregaron 50 μ L de solución de detención a cada pozo, y finalmente medir la absorbancia a 450 nm. En la figura 2 se muestran los pasos del ensayo, se observa el anticuerpo al que se une el antígeno o proteína a evaluar (mostrado como un ovalo azul) y la unión de un segundo anticuerpo, al cual se puede unir un tercer anticuerpo secundario específico conjugado con una enzima, para posteriormente agregarse el sustrato de la enzima. Los datos de absorbancia se ingresaron al software MasterPlex 2010 (MiraiBio Group, Hitachi Solutios America), el cual convierte las lecturas de absorbancia seleccionando la ecuación óptima y algoritmo para cuantificar los resultados. En la Tabla 1 se resumen los rangos de ensayo, la especificidad, reactividad cruzada y la interferencia de las moléculas evaluadas mediante ELISA.

Tabla 1. Descripción de rangos de ensayo, especificidad, reactividad cruzada e interferencia de las moléculas evaluadas mediante ensayo de ELISA.

Molécula	Rango de ensayo	Especificidad	Reactividad cruzada	Interferencia
Fas-L	15.60-1,000 pg/mL	Ligando de Fas humano natural o recombinante	< 0.5% con moléculas relacionadas disponibles. < 50% para especies similares evaluadas.	No
Fas-R	31.20 - 2,000 pg/mL	sFas humano natural y recombinante	< 0.5% con moléculas relacionadas disponibles. < 50% para especies similares evaluadas.	No
MMP-9	0.312 - 20 ng/mL	Pro-MMP-9 natural y recombinante de humano de 92 kDa y MMP-9 activado de 82 kDa.	< 0.5% con moléculas evaluadas. < 50% para especies similares evaluadas.	1 o más moléculas.
VEGF	31.20 - 2,000 pg/mL	VEGF humano natural y recombinante.	< 0.5% con moléculas evaluadas.	1 o más moléculas evaluadas
FGFb	10.00 - 640 pg/mL	FGF primario natural y recombinante humano.	< 0.5% con moléculas evaluadas.	No observada con moléculas relacionadas.

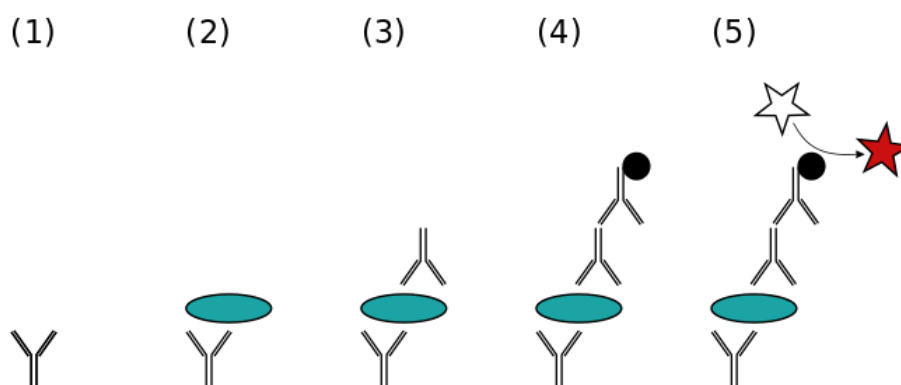


Figura 2. Representación esquemática del ensayo de inmunoanálisis ELISA (Enzyme linked Immuno Sorbent Assay, Ensayo de Inmuno Adsorción Ligado a Enzima).

6.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron analizados con el programa estadístico de SPSS Statistics 20.0 y con el programa Microsoft Excel 2010.

Se registraron datos antropométricos, clínicos y moleculares sobre desgaste muscular en pacientes sin tratamiento farmacológico.

Se hicieron dos grupos Ambulatorio y No-Ambulatorio

Se realizó una Prueba de normalidad Shapiro-Wilk (muestra < 50) para determinar el tipo de distribución de los datos.

Para las comparaciones entre 2 grupos se analizó mediante prueba T para muestras independientes para aquellos con distribución normal y para los datos sin distribución de normalidad se utilizó prueba U de Mann-Whitney

En cuanto a las asociaciones entre moléculas y escalas se realizó coeficiente de correlaciones de Pearson para aquellos datos con distribución normal y Spearman para aquellos sin normalidad en su distribución.

6.10. ASPECTOS BIOÉTICOS

De acuerdo a las características experimentales se considera como una investigación de riesgo mínimo.

Este protocolo fue diseñado en base a los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, establecidos por la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (publicada en el diario oficial de la Federación el 7 de febrero de 1984) y dando cumplimiento a los artículos 13 y 14, del Título segundo y de acuerdo al artículo 17 de la misma ley. Además, el responsable de este proyecto declara que se respetaron estrictamente los principios contenidos en el Código de Nuremberg, en la 18ª Asamblea Médica Mundial de Helsinki, enmendados por la 29ª Asamblea Médica Mundial de Tokio, la 48ª Asamblea General de Edimburgo, Escocia en octubre del 2000, el informe Belmont y el Código de Reglamentos Federales de los Estados Unidos de América.

6.11. RECURSOS, FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD

Recursos técnicos.

Estadimetro SECA

Báscula/silla para pacientes con estado no-ambulatorio marca Tanita.

Báscula de pie, para aquellos que mantienen la habilidad de mantenerse de pie marca SECA.

Espectrofotómetro para la lectura de las micro-placas, marca VELAB.

Micro-placas de 96 pocillos para ELISA de R&D Systems, Inc.

Estuches comerciales para ELISA de R&D Systems, Inc.

Laptop, Toshiba, con software Windows, Microsoft office 2010, SPSS statistics 20.0.

Hojas impresas para el registro de concentraciones séricas de moléculas, y estado funcional.

Apoyo técnico.

Químico Farmaco-Biólogo en apoyo para la técnica de ELISA y quimioluminiscencia.

Equipo multi-disciplinario, Nutriólogos, Biólogos y Médico.

7. RESULTADOS

Se evaluaron un total de 24 pacientes, al momento del estudio seis de ellos utilizaban silla de ruedas como auxiliar de movilidad y 18 pacientes ambulatorios, todos los paciente tenían diagnóstico confirmado de DMD por medio de estudio molecular, inmunotransferencia tipo Western-Blott o Inmuno-fluorescencia por biopsia muscular

7.1. RESULTADOS DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Se realizó el diagnóstico molecular en 19 pacientes mediante la técnica de PCR multiplex con el kit comercial de Maxim Biotech Inc, PCR Multiplex for human DMD /DMB set 1 + set 2, la frecuencia de eliminación de exones se presenta en la figura 3, es similar a la reportada en la literatura con respecto a las mutaciones por eliminación, siendo los exones del 43 al 52 los que se eliminan con mayor frecuencia. En los 5 pacientes restantes se confirmó el diagnóstico por biopsia de músculo gastrocnemio y técnica de inmunotransferencia de *Western Blott*, confirmándose la ausencia o disminución de la expresión de la distrofina.

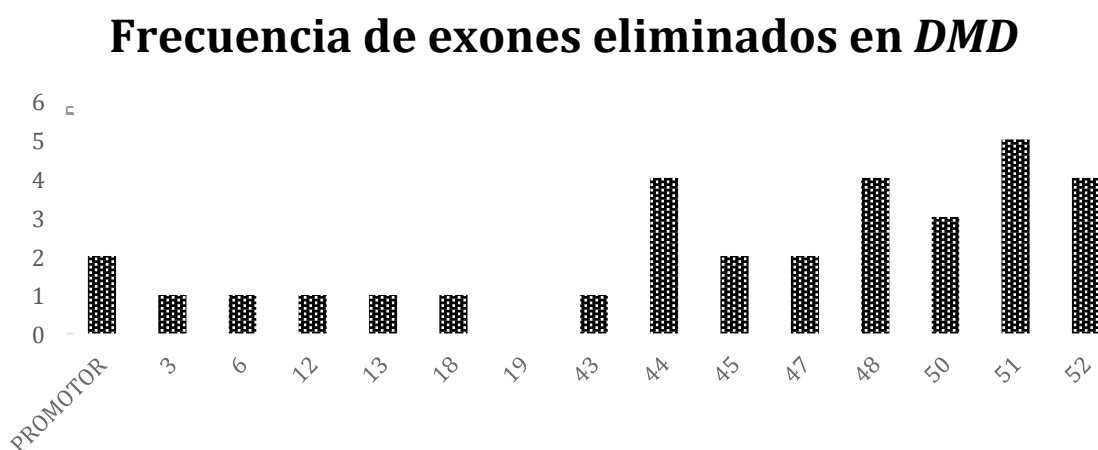


Figura 3. Frecuencia de exones eliminados en el gen *DMD* en 19 pacientes.

7.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y FUNCIÓN MUSCULAR

Se evaluaron las características antropométricas y se observó que todos los pacientes eran escolares, se encontraban con una edad promedio de 7.19 ± 2.97 años, con una talla

promedio de 120.79 ± 22.01 centímetros y peso promedio de 24.48 ± 16.47 kilogramos, ver en Tabla 2.

Se utilizaron dos escalas de función muscular, estas evalúan la función muscular de miembros superiores en caso de Brookes (1-6 puntos), por su parte Vignos evalúa la función de miembros inferiores (1-10 puntos), ambas asignan el puntaje de menor a mayor pérdida de función. El promedio para Brookes fue de 1.8 ± 0.86 , ya que todos los pacientes tienen funcionalidad de las extremidades superiores y de 3.2 ± 2.55 para la escala de Vignos, indicando que la mayoría se encuentra en estado ambulatorio.

En cuanto a las moléculas de apoptosis de la vía extrínseca; Fas-R su concentración promedio fue de 2756.27 pg/mL y Fas-L de 95.68 pg/mL.

Respecto a las moléculas de degeneración muscular la concentración de CK fue de 8990.53 ± 9558.73 y la concentración de MMP-9 fue de 150.75 ng/mL. El promedio para las moléculas de regeneración VEGF y FGFb fue de 90.46 y 6.36 pg/mL, respectivamente. Estos resultados se muestran en la tabla 2, los datos se muestran como promedio \pm desviaciones estándar (DE).

Tabla 2. Características antropométricas, clínicas y marcadores de desgaste muscular en pacientes con DMD/DMB sin tratamiento farmacológico.

Características o marcador	Promedios y DE
Edad (años)	7.19 ± 2.97
Talla (cm)	120.79 ± 22.01
Peso (kg)	24.48 ± 16.47
Pacientes con uso de silla de ruedas	6
Escala de Brookes (puntos)	1.88 ± 0.86
Escala de Vignos (puntos)	3.2 ± 2.55
<i>Moléculas de apoptosis</i>	
Fas-L (pg/mL)	95.68 ± 62.18
Fas-R(pg/mL)	2756.27 ± 1406.08
<i>Moléculas de degeneración</i>	
MMP-9 (ng/mL)	150.75 ± 72.58
CK (U/L)	8990.53 ± 9558.73
<i>Moléculas de regeneración</i>	
VEGF(pg/mL)	90.46 ± 138.22
FGFb (pg/mL)	6.36 ± 9.78

Como se mencionó previamente la degeneración muscular es un fenómeno bien conocido en el deterioro de la fuerza y la función muscular de los pacientes con DMD/BMD, por lo que resulta importante investigar si existe una asociación entre las moléculas séricas indicadoras de desgaste muscular y la función muscular. Debido a esto se formaron dos grupos de pacientes; el ambulatorio vs uso de silla de ruedas y se comparo el estado funcional (concentración de las moléculas Fas-R, Fas-L, CK, MMP-9, VEGF y FGFb. El análisis entre ambos grupos mostró una diferencia estadística ($p < 0.05$) entre las moléculas Fas-L, FGFb, CK y la edad entre los pacientes que aún caminan y los que están confinados a silla de ruedas.

En cuanto a Fas-L y CK la diferencia encontrada se debe a la mayor concentración de estas moléculas en aquellos pacientes con pérdida de la deambulación, este comportamiento es similar al observado para CK en pacientes con DMD como se ha descrito previamente en la literatura. Además encontramos un incremento entre la concentración del Factor de Crecimiento Fibroblástico primario (FGFb) en pacientes con uso de silla de ruedas con diferencia de significancia estadística ($p < 0.05$). Los resultados se muestran a continuación en la tabla 3.

Tabla 3. Moléculas de desgaste muscular en pacientes con Distrofia Muscular de Duchenne/Becker comparados en estado funcional.

Moléculas y edad en años[#]	Ambulatorio (n= 18)	Uso de Silla de Ruedas (n=6)
Fas-L*	90.17 ^a ± 40.44	137.45b ± 64.48
Fas-R	97.33 ± 54.18	91.12 ± 48.12
MMP-9	170.93 ± 107.06	191..37 ± 162.20
CK**	4925 ^a (3000 - 11225)	11825 ^b (8300 - 34200)
VEGF	160.07 ± 125.31	187.08 ± 172.55
FGF-b*	14.51 ^a ± 10.46	7.64 ^b ± 6.88
Edad en años*	7.60 ^a ± 0.68	10.68b ± 2.31

Los datos se muestran como promedio ± desviación estándar o como mediana (mínimo, máximo).

* $p < 0.05$ prueba T para muestras independientes.

** $p < 0.05$ prueba U de Mann-Whitney

Para evaluar la asociación entre la concentración sanguínea de las moléculas del desgaste muscular con el estado funcional y con la edad se realizó un análisis de correlación. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 4.

Tabla 4. Coeficientes de correlación entre moléculas, estado funcional y edad.

	Brookes	Vignos	Edad en años	MMP-9	CK	FGFb
FAS-L	CC= 0.003 p= 0.989	CC= -0.192 p= 0.370	CC= -0.629 p= 0.001**	CC= 0.364 p= 0.080	CC=0.550 p= 0.005**	CC= 0.303 p= 0.151
FAS-R	CC= -0.035 p= 0.870	CC= 0.220 p= 0.302	CC= 0.022 p= 0.920	CC= 0.092 p= 0.668	CC= 0.175 p= 0.414	CC= 0.044 p= 0.837
MMP-9	CC= 0.164 p= 0.443	CC= -0.043 p= 0.844	CC= -0.123 p= 0.568	CC = 1	CC= 0.190 p= 0.374	CC= 0.044 p= 0.837
CK	CC= -0.147 p= 0.493	CC#= -0.566 p= 0.004*	CC= - 0.646 p= 0.001*	CC= 0.190 p= 0.374	CC= 1	CC= 0.357 p= 0.086
VEGF	CC= 0.212 p= 0.320	CC= 0.307 p= 0.144	CC= -0.172 p= 0.421	CC= 0.119 p= 0.581	CC= 0.046 p= 0.831	CC= 0.367 p= 0.078
FGFb	CC= - 0.241 p= 0.257	CC= -0.207 p= 0.332	CC= -0.198 p= 0.353	CC= 0.044 p= 0.837	CC= 0.357 p= 0.086	CC= 1

Los datos corresponden al Coeficiente de correlación = CC.

#= Coeficiente de correlación de Pearson cuando es indicado, el resto corresponde a coeficiente de correlación de Spearman.

*= valor de $p < 0.05$

** = valor $p < 0.05$.

Estos análisis muestran que existe una asociación inversa entre la CK con escala de Vignos y con la edad en años (CK vs Vignos, correlación= -0.556, $p= 0.004$; y CK vs edad, correlación= -0.646, $p= 0.001$) como se muestra en la figura 4 y 5.

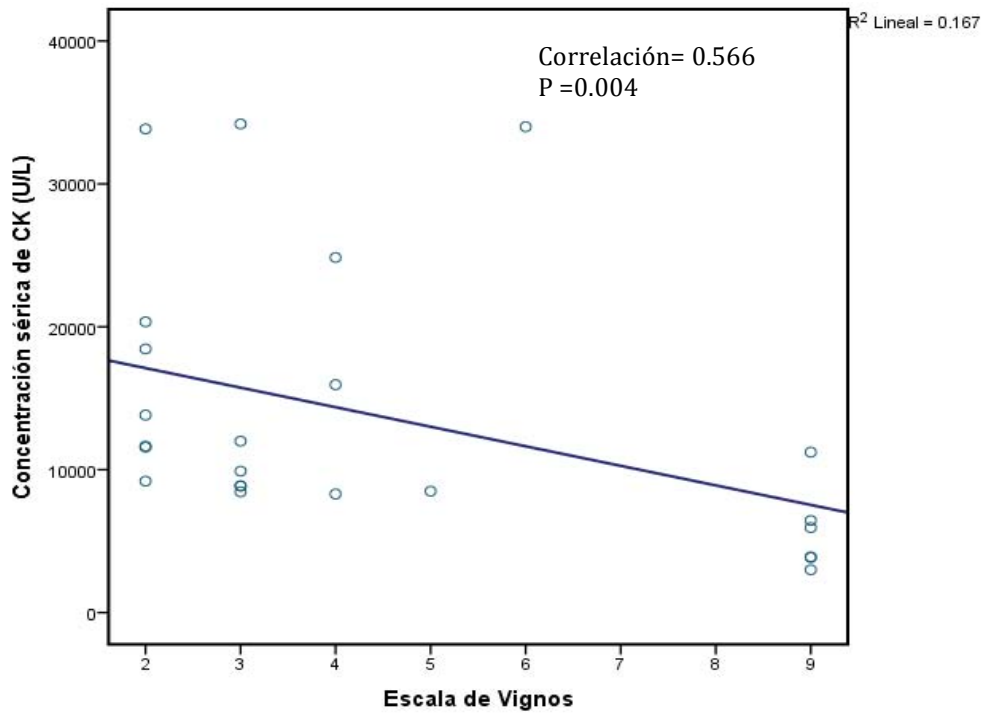


Figura 4. Correlación de Pearson entre concentración sérica de CK vs escala de Vignos

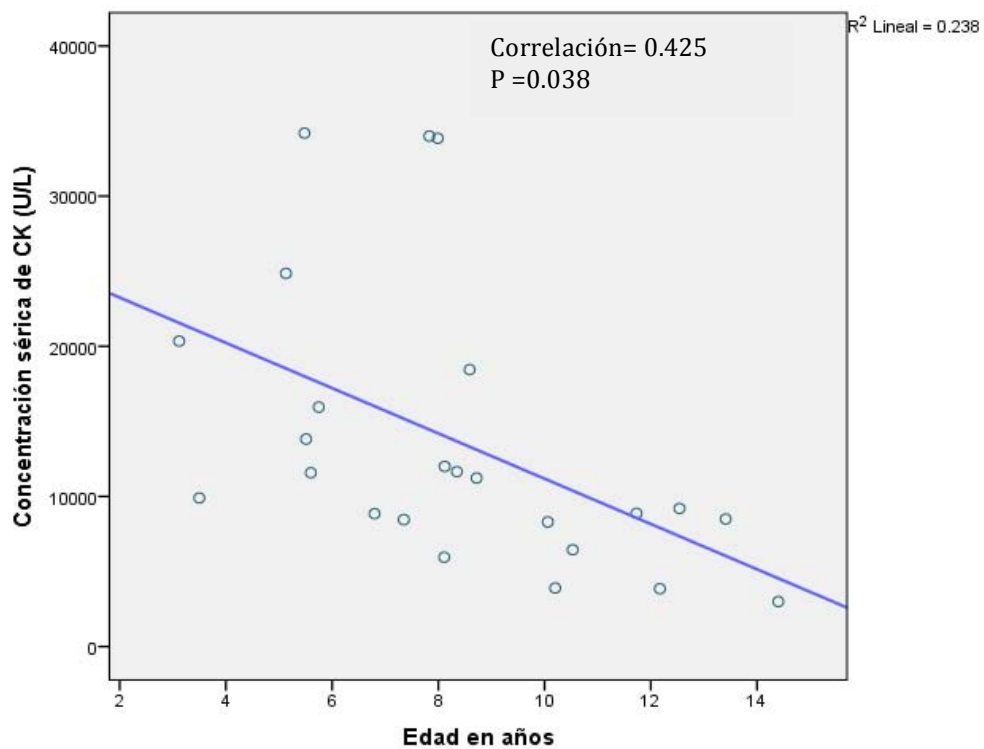


Figura 5. Correlación de Spearman entre la concentración sérica de CK y la edad en años.

En cuanto a Fas-L, no se encontró asociación con la escala de Vignos pero si con la edad

en años (correlación= -0.629, $p= 0.001$) como se muestra en la figura 6.

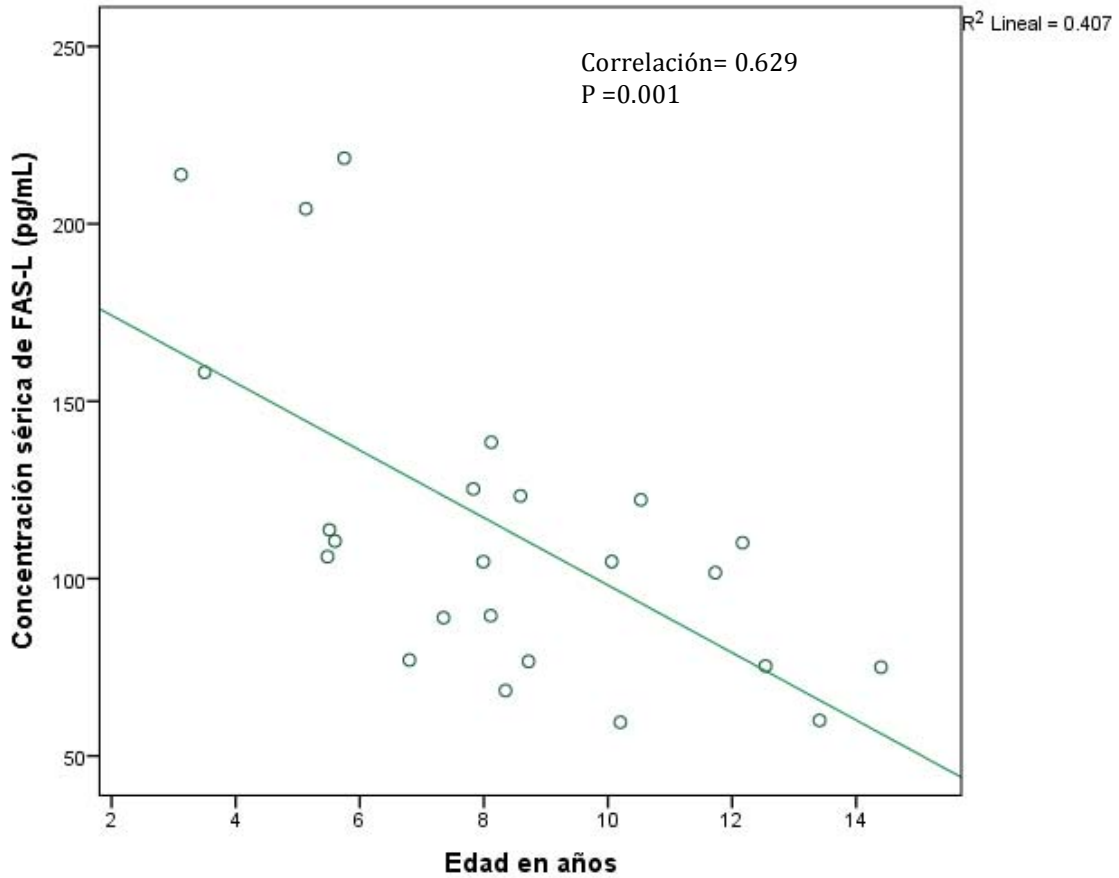


Figura 6. Correlación de Spearman entre concentración sérica de Fas-L y la edad en años.

Un hallazgo importante que observamos fue que la molécula de apoptosis Fas-L tiene una correlación positiva con CK (correlación= 0.550, $p= 0.005$) tal y como lo muestra la figura 7.

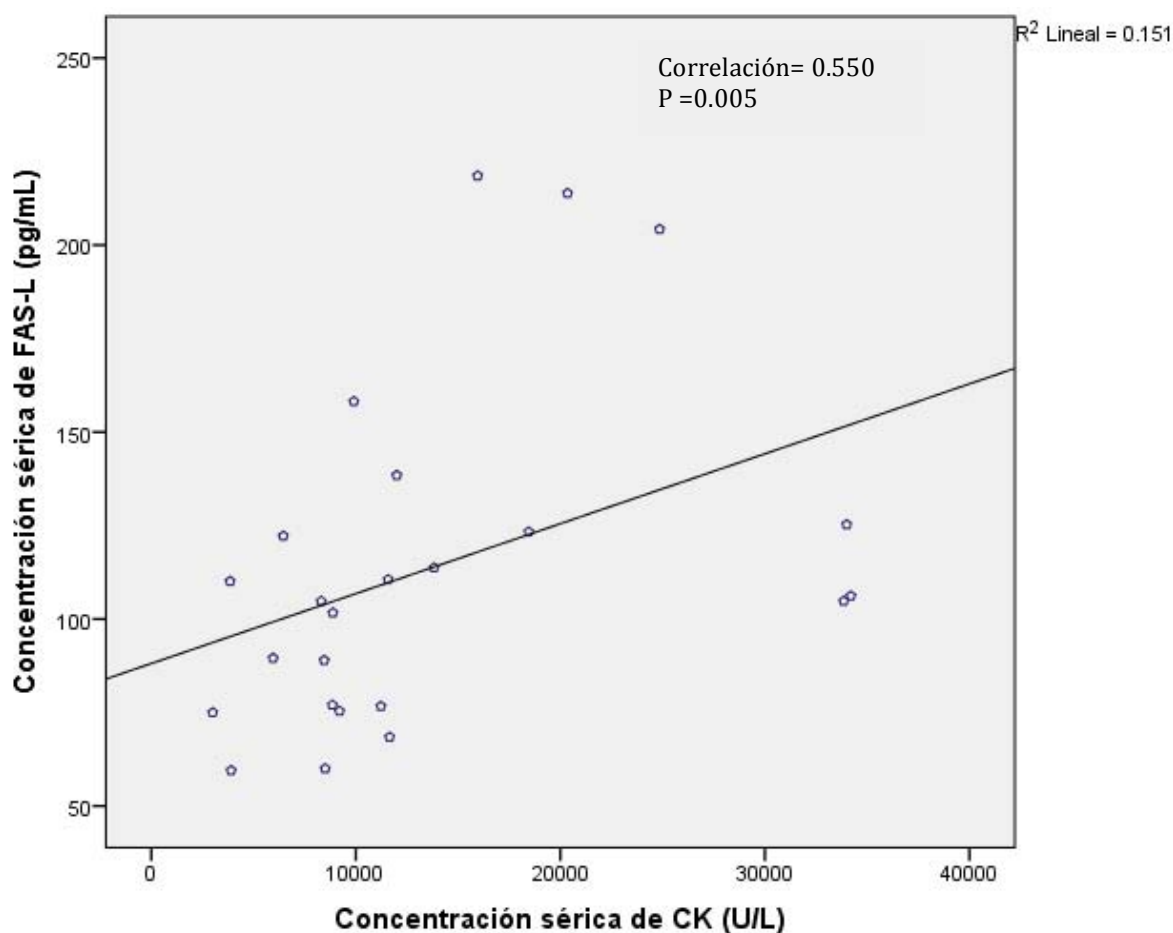


Figura 7. Correlación de Spearman_entre concentración sérica de CK vs concentración sérica de Fas-L.

Respecto a Fas-R y MMP-9 no se encontró asociación con las escalas funcionales o con la edad, únicamente esta última molécula mostró una tendencia significativa (correlación= 0.364 con $p = 0.08$) a dicha asociación con Fas-L, debido a esto sería importante evaluar un mayor número de individuos con la intención de confirmar la relación entre estos parámetros.

Por otro lado, ninguno de los dos factores de crecimiento (VEGF y FGFb) involucrados en la regeneración tuvieron alguna correlación con las escalas de función muscular o la edad.

Finalmente a diferencia de lo reportado previamente sobre la molécula MMP-9, no encontramos diferencias significativas con los parámetros de funcionalidad, pero si una tendencia a estar asociada con Fas-L (correlación= 0.364, $p= 0.080$) por lo que ampliar el número de pacientes nos ayudaría definir si existe o no esta posible relación.

8. DISCUSIÓN

El presente trabajo describe las características de un grupo de pacientes con diagnóstico clínico y molecular de Distrofia Muscular de Duchenne/Becker, en los cuales se cuantificaron moléculas séricas para determinar de forma indirecta si el músculo deficiente en distrofina se encuentra en desgaste muscular así como una evaluación clínica sobre la función muscular. Es importante mencionar que aunque existe información sobre las moléculas de degeneración CK y MMP-9, a nuestro conocimiento no existe información que recabe el estado sobre la apoptosis (receptor soluble de Fas, o su ligando Fas-L,) así como los factores de regeneración (VEGF o FGFb); sobre su asociación con el estado funcional de los pacientes con DMD/BMD. No obstante, existen estudios previos que describen estas moléculas en la fisiopatología y como posibles marcadores de desgaste muscular en el ser humano con DMD^{20,45} y el modelo *mdx*¹⁸, resulta importante conocer su comportamiento en relación al estado funcional ya que el proceso de desgaste muscular es un proceso dinámico y dependiente del tiempo de evolución.

Mediante la cuantificación de las moléculas de desgaste (CK y MMP-9) confirmamos lo descrito acerca del comportamiento de CK en distrofia muscular de Duchenne/Becker, y es que al inicio es un marcador de necrosis y daño del sarcolema pero que gradualmente disminuye en su concentración en relación directa con el estado funcional y la edad del paciente⁴⁸. Por otro lado, nuestros resultados indican que existe una relación directa entre el ligando de Fas (Fas-L) con el estado funcional valorado por escala de Vignos y con la edad, un dato que sugiere la presencia de mayor apoptosis cuando la función muscular está más comprometida, a diferencia de lo reportado en el modelo de ratón, donde se ha sugerido que la apoptosis es un evento que precede a los cambios en biopsia muscular compatibles con necrosis²⁷. Además se ha propuesto que esta molécula podría indicar un mecanismo de desgaste muscular con predominio de apoptosis por la vía extrínseca en estos pacientes cuando se midió su concentración sérica²⁰ lo cual se sugiere en nuestros resultados por un aumento de la concentración sanguínea de Fas-L en aquellos pacientes en silla de ruedas. Sin embargo vale la pena recordar que el musculo es un grupo de células que forman un sincitio bien comunicado y que existe evidencia de que a pesar de encontrarse datos morfológicos en el músculo similares a necrosis, varias caspasas efectoras se activan al mismo tiempo y no sólo ocurre autofagia, si no también se activa la apoptosis a través de las proteínas mitocondriales de la vía intrínseca, es conocido que estas vías tienen un mecanismo molecular en común, a través del receptor de Fas¹⁶ y se conoce que Fas-R es un receptor que se solubiliza en estados inflamatorios como la respuesta que se desencadena en tumores uterinos y la infección por virus^{53,54}, sin

embargo, no observamos asociación entre esta molécula y las escalas funcionales. Desafortunadamente no existen estudios sobre su concentración en estados no patológicos, además sus desviaciones en nuestros resultados son amplias por lo que posiblemente esta situación contribuya a su pobre o nula asociación con la apoptosis y el desgaste muscular.

Actualmente la MMP-9 es una proteína muy bien estudiada cuanto a su relación al progreso de la DMD/BMD, ya que esta molécula se eleva de forma significativa en pacientes que han perdido la ambulación y que por lo tanto son mayores en edad^{45,46}, sin embargo, nuestros datos no muestran alguna relación o diferencia entre la MMP-9 con el estado funcional o con la edad, únicamente como una posible asociación con el ligando de Fas-L, pues encontramos un coeficiente de correlación de 0.364, con una $p= 0.080$ que indica una tendencia a ser significativa por lo que consideramos que se requiere ampliar el número de pacientes para determinar esta posible asociación.

En cuanto a FGFb se refiere, encontramos diferencia estadística ($p>0.05$) cuando agrupamos su concentración como pacientes ambulatorios y con uso de silla de ruedas, por una mayor concentración de esta proteína en pacientes confinados a silla de ruedas, lo que sugiere que el aumento pudiera estar condicionado por el evento de regeneración que intenta compensar los mecanismos de desgaste⁵⁵. Con respecto al Factor de Crecimiento Endotelial Vascular VEGF se ha reportado que esta molécula promueve la supervivencia de las células satélite de músculo esquelético tras un infarto miocárdico⁵⁶ sin embargo, en su relación a la distrofia muscular de Duchenne se ha observado principalmente una disminución en su concentración sérica²⁰ sobre nuestros resultados no encontramos diferencias entre los grupos analizados ni cuando se correlacionó con las escalas de función muscular o las otras moléculas.

Estos resultados confirman la presencia de mayores niveles sanguíneos de las moléculas relacionadas a la fisiopatología del desgaste muscular con participación de la apoptosis en su vía extrínseca mediante el sistema Fas/FasL, el incremento de CK como una pérdida de la integridad de la membrana muscular, y el incremento del FGF-b como posible bio-marcador de regeneración muscular. Además nos indican que el ligando de Fas tiene un comportamiento muy similar al de la CK, con una relación directa al deterioro del estado funcional y su incremento en concentraciones séricas, por lo que esta molécula podría ser considerada para estudios posteriores como un bio-marcador de desgaste muscular.

9. CONCLUSION

Con este estudio concluimos.

1. El diagnóstico clínico y molecular de los pacientes varones con debilidad muscular es útil para realizar estudios de investigación clínica, manejo integral y vigilancia clínica.
2. Nuestros resultados sugieren que la apoptosis es un proceso activo durante el desgaste muscular por el incremento del ligando de Fas en pacientes con pérdida del estado ambulatorio y con el incremento de la edad.
3. CK y Fas-L presentan un incremento proporcional a la edad y ambas moléculas tienen un comportamiento similar.
3. La concentración de CK se asocia a la escala de Vignos, ninguna otra molécula de desgaste muscular tuvo asociación con las escalas, con la edad o con otra proteína evaluada.
4. Respecto a Fas-R y MMP-9 no se encontró asociación con las escalas funcionales o con la edad, por lo que consideramos que es importante evaluar un mayor número de individuos con la intención de confirmar o descartar si existe alguna asociación entre estos parámetros.

ANEXO 1.

ESCALAS DE EVALUACIÓN CLÍNICA PARA PACIENTES CON DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE.

Table 1. Sistema de clasificación en Escala de Vignos.

Descripción.

- 1 Camina y puede subir escaleras sin ayuda.
- 2 Camina y puede subir escaleras con ayuda de barandal.
- 3 Camina y puede subir escaleras lentamente con ayuda de barandal (más de 25 segundos en 8 escalones regulares).
- 4 Camina sin ayuda y puede levantarse de la silla pero no puede subir escaleras.
- 5 Camina sin ayuda pero no puede levantarse de una silla o subir escaleras.
- 6 Camina sólo con ayuda o camina de forma independiente con ferulas largas (aparto ortopédico) de piernas.
- 7 Camina con férulas largas pero requiere apoyo para el equilibrio.
- 8 Se levanta con ayuda de férulas pero no puede caminar aún con ayuda.
- 9 Confinado a una silla de ruedas.
- 10 Confinado a la cama.

Tabla 2.Sistema de clasificación en la Escala de Brookes

- 1 Iniciando con los brazos a los lados, el paciente puede abducir los brazos en círculo completo hasta alcanzar la línea media por encima de la cabeza.
- 2 Puede levantar los brazos encima de la cabeza solo si flexiona los codos (disminuyendo la circunferencia total del movimiento) o mediante el uso de musculos accesorios.
- 3 No puede elevar los brazos por encima de la cabeza pero puede levantar un vaso de 8 onzas (240 ml) hasta la boca.
- 4 No puede levantar un vaso de 8 onzas (240 ml) hasta la boca, pero puede llevarse las manos a la boca
- 5 No puede llevarse la mano a la boca, pero puede sostener una pluma o monedas de la mesa.
- 6 Sin función de manos.

ANEXO 2.
HOJA DE REGISTRO DE DATOS SOBRE FUNCION MUSCULAR

Nombre:			
		Fecha:	
Brookes			
Vignos			

10. REFERENCIAS

1. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. for the DMD Care Considerations Working Group. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management, *Lancet Neurol.* 2010; 9: 77–93.
2. Barras BT, Miller DT, Urion DK. Dystrophinopathies. 2000 Sep 5 [Actualizado: 2014 Nov 26]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editores. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1119/> Revisado en línea: junio 2014.
3. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. for the DMD Care Considerations Working Group*Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care, *Lancet Neurol.* 2010; 9: 177–89.
4. Davies KE y Nowak KJ. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev, Mol Cell Biol*, October 2006; 7:773-789.
5. Muntoni Francesco, Torelli Silvia, y Ferlini Alessandra. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins and multiple phenotypes. *Lancet Neurol*; 2003; 2: 731-740.
6. Blake DJ, Weir A, Newey SE, y Davies EK. Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle. *Physiol Rev* 2002; 82: 291–329.
7. Rybakova IN, Patel JR, Ervasti JM. The Dystrophin Complex Forms a Mechanically Strong Link Between the Sarcolemma and Costameric Actin, *JCB Report* 2000, September; 5:1209-1214.
8. Shin J, Tarishi MM, Ogura Y, Kumar A. Wasting mechanisms in muscular dystrophy. Review. *Int J Biochem Cell B*, 2013; 45: 2266– 2279.

9. Ambrosio F, Li Y, Usas A, Boninger ML, Huard J. Orthopedic Biology and Medicine: Musculoskeletal Tissue Regeneration, Biological Materials and Methods. Chapter 22, Muscle Repair after Injury and Disease. Totowa, NJ. Editado por W. S. Pietrzak © Humana Press, 2008.
10. Iman A-M, Ekram A-S y Soheir K. Cytokines and growth factors in Duchene muscular dystrophy patients. Egypt J Med Hum Genet, Nov 2008; 9: 181-188.
11. De Paepe B y De Bleecker JL. Cytokines and Chemokines as Regulators of Skeletal Muscle Inflammation: Presenting the Case of Duchenne Muscular Dystrophy. Review Article, Volume 2013, Article ID 540370, 10 pages.
12. Mann CJ, Perdiguero E, Kharraz Y, Aguilar S, Pessina P, Serrano AL et al. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. Skeletal Muscle, 2011, 1: 1-21.
13. Ng R, Banks GB, Hall JK, Muir LA, Ramos JN, Wicki J et al. Animal Models of Muscular Dystrophy, Prog in Mol Biol and Trans Sci 2012; 105: 83-111.
14. Merrick D, Kurt L, Stadler J, Lerner D, and Smith J. Muscular dystrophy begins early in embryonic development deriving from stem cell loss and disrupted skeletal muscle formation. Dis Model Mech. 2009 Jul-Aug; 2(7-8): 374–388.
15. Deconinck N y Dan B. Pathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy: Current Hypothesis. Pediatr Neurol 2007; 36: 1-7.
16. Elmore Susan, Apoptosis, Toxicol Pathol. 2007 ; 35(4): 495–516.
17. Miller JB y Girgenrath M. The role of apoptosis in neuromuscular diseases and prospects for anti-apoptosis therapy. TRENDS in Mol Med June 2006; Vol.12 (No.6): 279-286.
18. Sandri M, Carraro U. Review. Apoptosis of skeletal muscles during development and disease . Int J of Biochem Cell B, 1999, 31: 1373-1390.

19. Olive M, Martinez-Matos JA, Montero J y Ferrer I, Apoptosis is not the mechanism of cell death of muscle fibers in human muscular dystrophies and inflammatory myopathies. *Muscle & Nerve*, october 1997; 7 : 1328-1330.
20. Abdel-Salam E., Abdel-Meguid I, Korraa SS Markers of degeneration and regeneration in Duchenne muscular dystrophy, *Acta Myologica*, 2009; XXVIII: p. 94-100.
21. Cruz-Guzmán OR, Rodríguez-Cruz M y Escobar-Cedillo RE. Systemic Inflammation in Duchenne Muscular Dystrophy: Association with Muscle Function and Nutritional Status. *BioMed Res Int*. Article ID 891972. 1:7.
22. Serdaroglu A, Guumlumlyener K. Role of Apoptosis in Duchenne's Muscular Dystrophy. *Turk J of Child Neurol* January 2002; 17: 66-67.
23. Migheli A, Mongini T, Doriguzzi C, Chiado PL, Piva R, Ugo I et al. Muscle apoptosis in humans occurs in normal and denervated muscle, but not in myotonic dystrophy, dystrophinopathies or inflammatory disease. *Neurogenetics*. 1997; 1: 81–87.
24. Honda A, Abe S, Hiroki E, Honda H, Iwanuma O, Yanagisawa N. , Ide Y. Activation of caspase 3, 9, 12, and Bax in masseter muscle of mdx mice during necrosis, *J Muscle Res Cell Motil*. 2007; 28:243–247.
25. Danielsson O, Nilsson C, Lindvall B, Ernerudh J. Expression of apoptosis related proteins in normal and diseased muscle: A possible role for Bcl-2 in protection of striated muscle. *Neuromus Dis* . 2009; 19: 412–417.
26. Behrens L, Bender A, Johnson MA y Hohlfeld R. Cytotoxic mechanisms in inflammatory myopathies Co-expression of Fas and protective Bcl-2 in muscle fibres and inflammatory cells. *Brain*. 1997;120 : 929–938.
27. Tidball JG, Albrecht DE, Lokensgard BE y Spencer MJ. Apoptosis precedes necrosis of dystrophin-deficient muscle. *J of Cell Science*. 1995; 108: 2197-2204.

28. Sandri M, Carraro U, Podhorska-Okolov M, Rizzi C, Arslan P, Monti D, Franceschi C. Apoptosis, DNA damage and ubiquitin expression in normal and mdx muscle fibers after exercise. *FEBS Letters*. 1995; 373: 291-295.
29. Tews DS. Characterization of initiator and effector caspase expressions in dystrophinopathies. *Neuropathology*. 2006; 26: 24–31.
30. Bondesen BA, Mills ST, Kegley KM y Pavlath GK. The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 287: 475–483.
31. Collins RA y Grounds MD. The Role of Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF) in Skeletal Muscle Regeneration: Studies in TNF and TNF (-)/LT(-). *J of Histochem & Cytochem*. 2011; 49 (8): 989-1001.
32. Saito K, Kobayashi D, Komatsu M, Yajima T, Yagihashi A et al. A Sensitive Assay of Tumor Necrosis Factor a in Sera from Duchenne Muscular Dystrophy Patients, *Clin Chem*. 2000; 46: 1703-1704.
33. Florence JM, Pandya S, King WM, Robison JD, Baty J, Miller JP et al. Intrarater Reliability of Manual Muscle Test (Medical Research Council scale) Grades in Duchenne's Muscular. *Phys Ther*. 1992; 72:115-122.
34. Scott E, Mawson SJ. Measurement in Duchenne muscular dystrophy: considerations in the development of a neuromuscular assessment tool. *Dev Med & Child Neurol*. 2006; 48: 540-544.
35. Campolina-Diniz GP, Belizário-Facury-Lasmar LML y Gurgel G. Motor assessment in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Arq Neuropsiquiatr*. 2012; 70 (6) :416-421.
36. Lu Y-M y Lue Y-J. Strength and Functional Measurement for Patients with Muscular Dystrophy, *Muscular Dystrophy*, Dr. Madhuri Hegde (Ed.), 2012. ISBN: 978-953-51-0603-6, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/muscular-dystrophy/strength-decrease-pattern-and-functionalmeasurement-for-patients-with-muscular-dystrophy>.

37. Pizzato TM, Baptista CRJA, Souza MA, Benedicto MMB, Martinez EZ, Mattiello-Sverzut. Longitudinal assessment of grip strength using bulb dynamometer in Duchenne Muscular Dystrophy. *AC Braz J Phys Ther.* 2014 May-June; 18(3):245-251.
38. Palisano RJ, Rosenbaum P, Bartlett D, Livingston MH. Content validity of the expanded and revised Gross Motor Function Classification System. *Developmental Medicine & Child Neurology* 2008, 50: 744–750.
39. Bayram E, Topcu Y, Karakaya P, Torun BM, Sahin E, Gunduz Nihan, et al. Correlation between motor performance scales, body composition, and anthropometry in patients with duchenne muscular dystrophy. *Acta Neurol Belg* 2013, 113:133–137.
40. Fernandes LAY, Caromano FA, Assis SMB, Hukuda ME, Voos MC, Carvalho EV. Relationship between the climbing up and climbing down stairs domain scores on the FES-DMD, the score on the Vignos Scale, age and timed performance of functional activities in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Braz J Phys Ther.* 2014 Nov-Dec; 18(6):513-520.
41. Prior TW y Bridgeman SJ. Experience and Strategy for the Molecular Testing of Duchenne Muscular Dystrophy. *J of Mol Diag.* August 2005; Vol. 7: (3) 317-326.
42. Ben IA, Hamzi K, Bellayou H, Itri M, Ilham S, Nadifi S. Evolution of Molecular Diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy. *J Mol Neurosci.* 2013; 50:314–316.
43. Gatta V, Scarciolla O, Gaspari AR, Palka C, De Angelis MV, Di Muzio A et al. Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA). *Hum Genet,* 2005; 117: 92–98.
44. Goemans N y Buyse G. Current Treatment and Management of Dystrophinopathies. *Curr Treat Options Neurol.* 2014; 16: 287-295.
45. Ferlini A, Flanigan KM, Lochmüller H, Muntoni F, 't Hoen PAC, McNally E. Workshop report 204th ENMC International Workshop on Biomarkers in Duchenne Muscular Dystrophy 24–26 January 2014, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular Disord.* 2015;

25: 184–198.

46. Nadarajah VD, Putten M, Chaouch A, Garrood P, Straub V, Lochmüller H et al. Serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a biomarker for monitoring disease progression in Duchenne muscular dystrophy DMD. *Neuromuscular Disord.* 2011; 21: 569–578.

47. Nico B, Corsi P, Ria R, Crivellato CE, Vacca DA, Roccaro CAM, Mangieri CD, Ribattia AD y Roncalia L. Increased matrix-metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression in the brain of dystrophic mdx mouse. *Neuroscience.* 2006; 140 : 835–848.

48. Aartsma-Rus A, Ferlini A, Vroom E. Biomarkers and surrogate endpoints in Duchenne: Meeting report. *Neuromuscular Disord.* 2014; 24 : 743–745.

49. Mercuria E y Muntonib F. Muscular dystrophy: new challenges and review of the current clinical trials. *Curr Opin Pediatr.* 2013; 25:701–707

50. Houde S, Filiatrault M, Fournier A, Dubé J, D'Arcy S, Bérubé D et al. Deflazacort Use in Duchenne Muscular Dystrophy: An 8-Year Follow-Up. *Pediatr Neurol.* 2008; 38 : 200-206.

51. Ryall JG y Lynch GS. The potential and the pitfalls of β -adrenoceptor agonists for the management of skeletal muscle wasting. *Pharm & Therap.* 2008; 120: 219–232.

52. Babcock TA, Novak T, Ong E, Jho DH, Helton WS y Espat NJ. Modulation of Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophage Tumor Necrosis Factor-Production by 3 Fatty Acid Is Associated with Differential Cyclooxygenase-2 Protein Expression and Is Independent of Interleukin-10. *J of Surg Res.* 2002; 107 : 135–139

53. Kondera-Anasz Z, Mielczarek-Palacz A, Sikora J. Soluble Fas receptor and soluble Fas ligand in the serum of women with uterine tumors. *Apoptosis.* 2005 Oct; 10 (5) : 1143-9.

54. Kamihira S, Yamada Y, Hiragata Y, Yamaguchi T, Izumikawa K, Matsuo Y et al. Serum levels of soluble Fas/APO-1 receptor in human retroviral infection and associated

diseases. Intern Med. 1997 March; 36(3): 166–170.

DATOS DE CONTACTO

TUTOR

DRA. MARICELA RODRIGUEZ CRUZ, Investigador Titular, Laboratorio de Nutrición Molecular. Unidad de Investigación Médica en Nutrición, Hospital de Pediatría, "Dr. Silvestre Frenk Freund", Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. Teléfono: 56276944 Ext. 22483, e-mail: maricela.rodriguez.cruz@gmail.com

COTUTOR

DRA. EUGENIA DOLORES RUIZ CRUZ, Médico Genetista Adscrito y Profesor Adjunto del curso de Genética Médica, Servicio de Genética del Hospital General "Gaudencio González Garza", del Centro Médico Nacional "La Raza", Instituto Mexicano del Seguro Social. Teléfono: 57245900 Ext. 23445, e-mail: draeugenia.ruiz@gmail.com

TESISTA

DR. LUIS LEONARDO FLORES LAGUNES. Médico Residente de Genética Médica del Hospital General "Gaudencio González Garza", del Centro Médico Nacional "La Raza", Instituto Mexicano del Seguro Social. Teléfono: 57245900 Ext. 23445
e-mail: dr.leonardofloreslagunes@gmail.com

HOJA DE FIRMAS

Dra. Luz Arcelia Campos Navarro
Directora de Educación e Investigación en Salud
Hospital General "Dr. Gaudencio González Garza"
Centro Médico Nacional La Raza

Dr. Miguel Arturo Márquez Gutiérrez, Médico Genetista, Profesor Titular del Curso de Genética Médica y Jefe de Servicio de Genética del Hospital General "Gaudencio González Garza", del Centro Médico Nacional "La Raza", Instituto Mexicano del Seguro Social- Universidad Nacional Autónoma de México.

Dra. Maricela Rodríguez Cruz, Investigador Titular, Laboratorio de Nutrición Molecular. Unidad de Investigación Médica en Nutrición, Hospital de Pediatría, "Dr. Silvestre Frenk Freund", Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Dra. Eugenia Dolores Ruiz Cruz, Médico Genetista Adscrito y Profesor Adjunto del curso de Genética Médica, Servicio de Genética del Hospital General "Gaudencio González Garza", del Centro Médico Nacional "La Raza", Instituto Mexicano del Seguro Social.

Dr. Luis Leonardo Flores Lagunes
Médico Residente en Genética Médica

ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción	2
1.2.- Datos históricos	2
1.3.- Gen <i>DMD</i>	2
1.4.- Proteína distrofina	3
Figura 1.- Complejo de proteínas asociadas a Distrofina.	4
Sub-complejo de proteínas intra-citoplásmico.	
1.5.- Fisiopatología: desgaste muscular y reparación anormal.	4
1.5.1.- Apoptosis y necrosis como mecanismos de desgaste muscular en DMD/BMD.	6
1.6.- Cuadro clínico y evaluación clínica de la función muscular	10
1.7.- Diagnóstico	12
1.8.- Biomarcadores de enfermedad	12
1.9.- Tratamiento farmacológico actual y terapias en desarrollo	13
2.- Justificación	15
3.- Pregunta de investigación	16
4.- Hipótesis	17
5.- Objetivo general	18
6. Metodología	
6.1 Diseño del estudio	19
6.2 Lugar de estudio	19
6.3 Población de estudio	19
6.4 Criterios de selección	20
6.5 Tipo de muestreo	21
6.6 Definición operativa de variables	21
6.7 Descripción general del estudio	22
6.8 Técnicas de medición	22
6.8.1. Diagnóstico Molecular	22
6.8.2. Variables antropométricos	23
6.8.3. Determinación de los marcadores de degeneración muscular.	23
6.8.4. Determinación de los marcadores de regeneración muscular	24
6.9 Análisis estadístico	26
6.10 Aspectos éticos	26
6.11 Recursos, financiamiento y factibilidad	27

Tabla 1. Descripción de rangos de ensayo, especificidad, reactividad cruzada e interferencia de las moléculas evaluadas mediante ensayo de ELISA.	25
Figura 2. Representación esquemática del ensayo de inmunoanálisis ELISA (Enzyme linked Inmuno Sorbent Assay, Ensayo de Inmuno Adsorción Ligado a Enzima).	28
7. Resultados	28
7.1. Resultados del diagnóstico molecular	28
Tabla 2. Características antropométricas, clínicas y marcadores de desgaste muscular en pacientes con DMD/DMB sin tratamiento farmacológico	
Figura 3. Frecuencia de exones eliminados en el gen <i>DMD</i> en 19 pacientes	28
Tabla 3. Moléculas de desgaste muscular en pacientes con distrofia muscular de Duchenne/Becker comparados en estado funcional.	30
Tabla 4. Coeficientes de correlación entre moléculas, estado funcional y edad.	31
Figura 4. Correlación entre concentración sérica de CK vs Escala de Vignos	32
Figura 5. Correlación entre concentración sérica de CK y la edad en años.	32
Figura 6. Correlación entre concentración sérica de Fas-L y la edad en años.	33
Figura 7. Correlación entre concentración sérica de CK vs concentración sérica de Fas-L.	34
	35
8. Discusión	
	37
9. Conclusión	
	38
Anexo 1. Escalas de evaluación clínica para pacientes con distrofia muscular de duchenne	
Anexo 2. Hoja de registro de datos de función muscular.	39
10. Referencias	40

Agradecimientos

A mi familia.

A mis tutores.

Grupo multi-disciplinario de laboratorio de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición.

Dr. Edgar F. Ricardez Marcial, CMN La Raza.

Dr. Miguel A. Márquez Gutiérrez, CMN La Raza.

Dra. Rosa Elena Escobar Cedillo, INR.

A las familias de los pacientes que nos han permitido aprender de ellos...