



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
CENTRO MÉDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"
INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO

CONCORDANCIA ENTRE MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y RESULTADO
EN MLPA (PRUEBA MOLECULAR) EN EL DIAGNÓSTICO DE DISTROFIA
MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD). EN EL CENTRO MÉDICO NACIONAL 20
DE NOVIEMBRE. ISSSTE

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
NEUROLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA:
DRA. RISTORI MILLA KIMBERLY MONSERRAT.

TUTOR:
DR. JOSE ANTONIO VENTA SOBERO.

SERVICIO DE NEUROLOGÍA PEDIÁTRICA DE CENTRO MÉDICO NACIONAL "20 DE
NOVIEMBRE"



ISSSTE

CIUDAD DE MÉXICO, CD. MX., OCTUBRE DEL 2018



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.

Dra. Aura Argentina Erazo Valle Solís

Subdirectora de Enseñanza e Investigación
del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE

Dr. Juvenal Gutiérrez Moctezuma

Profesor Titular de la Especialidad de Neurología Pediátrica Universidad Nacional Autónoma de México.
Jefe de Servicio de Neurología Pediátrica en el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre ISSSTE

Dr. Jose Antonio Venta Sobero.

Asesor de tesis y Medico Adscrito del servicio de Neurología pediátrica
del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE

Dra. Ristori Milla Kimberly Monserrat.

Tesista
Residente de Segundo año de Neurología Pediátrica del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre"
ISSSTE

INDICE

I. RESUMEN	5
II. ANTECEDENTES	8
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
IV. JUSTIFICACIÓN	15
V. OBJETIVO GENERAL	17
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
VII. HIPOTESIS	18
VIII. METODOLOGIA	19
IX. RESULTADOS	20
X. DISCUSION	22
XI. CONCLUSION	23
XII. BIBLIOGRAFIA	24
XIII. ANEXOS	27

AGRADECIMIENTOS:

A Mis padres David Ristori Cueto y America Inna Milla Sanchez por su ejemplo de dedicación y valores diarios.

A Mi esposo José Alberto Hernández Castañeda por estar en todo momento y motivarme para salir adelante.

A Mi Hermana Ariadna por estar conmigo en todo momento como mi guía y consejera.

A mis queridos maestros Dr. Juvenal Gutiérrez Moctezuma , José Antonio Venta Sobero , Elsa Solorzano Gómez por darme la oportunidad de continuar esta meta en mi vida, por enseñarme intelectualmente las bases como neuróloga Pediatra pero también por enseñarnos principios éticos y calidad humana con los pacientes.

ABREVIATURAS

MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

EMN: Enfermedades neuromusculares.

PCR: Reacciones de Cadena de Polimerasa.

DMD: Distrofia muscular de Duchenne.

DMB: Distrofia muscular de Becker.

CMN: Centro Médico Nacional 20 Noviembre.

CK. Creatinfosfocinasa.

RESUMEN:

La Distrofia Muscular de Duchenne es una enfermedad ligada al cromosoma X que afecta a 1 en 3600-6000 masculinos vivos. La clínica se caracteriza por un leve retraso en hitos motores y la mayoría no pueden correr y saltar adecuadamente debido a la debilidad muscular proximal, que clínicamente se manifiesta con el uso de la clásica maniobra de Gowers . La mayoría de los pacientes son diagnosticados aproximadamente a los 5 años de edad, cuando su capacidad física difiere marcadamente de la de sus pares.

La prueba molecular MLPA genómica es el estándar de oro para el diagnóstico de DMD o DMB y permite diagnosticar oportunamente la enfermedad. Sin embargo se han identificado algunas variaciones en la presentación genómica de los polimorfismos asociados a la enfermedad algunos estudios sugieren que estas variaciones podrían tener a concordancia con la severidad de la presentación clínica de esta patología neurológica.

MATERIAL Y METODOS: Se realizara un estudio transversal-observacional-descriptivo.

METODOLOGÍA: Se realizó un estudio transversal, observacional, descriptivo en 24 pacientes masculinos con DMD /DMB con DMD del CMN 20 de Noviembre ISSSTE, obteniendo los datos clínicos a través de la revisión del expediente clínico en un periodo de seis meses utilizando el DNA tomado a los pacientes mencionados y procesandolo a través de la prueba molecular MLPA (las pruebas de DNA fueron tomadas previamente por medio del proyecto: EVALUACION DE BIOMARCADORES BIOQUIMICOS Y GENETICOS PARA EL MONITOREO DEL PROGRESO DE LA DISTROFIA MUSCULAR DUCHENNE Y DETECCION DE PORTADORA. Con número de registro: 397.2014. Las pruebas se procesaron en el secuenciador sanger abi 3100 De applei Bio System ubicado en el área de investigación en medicina genómica. No se intervino a ningún paciente en el proyecto actual solo se verificaron resultados. Lo anterior con el fin de realizar correlación clínica del fenotipo de DMD y el daño molecular en el gen de la distrofina (locus Xp.21.2) en estos pacientes que nos puedan orientar aun pronóstico en la calidad de vida de los mismos; así como la severidad en la que se encuentra la enfermedad al momento de su primer contacto con el especialista. Se procesó la información a través del programa SPSS.24.2 a través de la prueba Kappa, Pearson, Moda y Mediana.

Resultados: La Distrofia Muscular de Duchenne es una enfermedad neuromuscular poco común por lo que su diagnóstico llega a ser tardío, se recolectaron datos clínicos y se analizaron los resultados obtenidos a través de la prueba molecular MLPA (obtenidos a través del proyecto antes mencionado con numero de registro 397.2014) a 24 pacientes con Distrofia muscular de Duchenne del Centro Médico

Nacional 20 de Noviembre de los cuales se encontró que el 87.5 % presentan fenotipo de DMD y el 12.5 % DMB; el 75 % de las alteraciones moleculares son Deleciones en diferentes tipos de genes encontrando en 5 pacientes daño en el exón 48-52, 3 pacientes en el exón 44, y el resto en diferentes tipos de exones como 1,3, 6,7,9, 10,45.

Al momento del diagnóstico el 93% de los pacientes presentaba alteraciones clínicas importantes como caídas frecuentes, pseudohipertrofia de gastrocnemios, el 20% deambulaba sin dificultad, siendo un 80 % con dificultad para la misma o pérdida total.

Se les realizo previo al estudio molecular estudios de laboratorio y gabinete a los pacientes con clínica de DMD encontrando una CPK de más de 3000 en el 95.2 % de los pacientes con una p.000 , electromiografía alterada en el 66.7 % con una p. con 10/24 pacientes con patrón miopatico en el resultado, biopsia muscular positiva en el 50 % de los pacientes, siendo esta ultima con una p.152 de correlación con el fenotipo del paciente.

Con respecto a la edad de los pacientes fue en los adolescentes 15 años en adelante en donde se encontraron mayor número de casos. Se encontraron alteraciones cardiacas miocardiopatía dilatada en dos pacientes y 3 con patrón restrictivo pulmonar.

De 24 pacientes 8 tuvieron antecedentes heredofamiliares, y 95 % al momento del diagnóstico se requirió inicio de tratamiento o continuación con el mismo con Deflazacort.

CONCLUSIONES:

La Distrofia muscular De Duchenne es observada en varones, pueden haber casos de aparición de novo sin antecedentes heredofamiliares, su diagnóstico al momento del primer contacto es tardío encontrando las complicaciones propias de la enfermedad que no permitan al paciente tener una adecuada calidad de vida y ensombreciendo su pronóstico de vida.

La variedad más frecuentemente encontrada es Duchenne con respecto a Becker, se observa que dentro de los estudios de laboratorio y gabinete realizados como protocolo de la enfermedad la creatininfosfocinasa fue la que mayor sensibilidad mostro al estar elevada en más de 3000 en todos los pacientes confirmados.

Es de importancia hacer un diagnóstico oportuno en los pacientes con distrofia Muscular de Duchenne ya que depende de ello su pronostico de vida ya que el inicio temprano de Deflazacort y el manejo multidisciplinario permite mejoría en la calidad de vida y prolongar la presencia de las complicaciones fatales propias de dicha enfermedad.

Dentro de los resultados del estudio molecular el exón 48-52 fue el que mayor frecuencia se encontró con daño en el gen de la distrofina . Confirmando que la prueba molecular MLPA es el estándar de oro de esta enfermedad y que con una toma de sangre periférica y procesándolas a través del secuenciador nos permite diagnosticar oportunamente al paciente y poder brindar asesoramiento genético a la familia del mismo .

ANTECEDENTES

Las distrofias musculares son progresivas, producen degeneración muscular y pérdida de fuerza. Este grupo heterogéneo de trastornos se han caracterizado por un nivel clínico y molecular desde la década de 1980, dando lugar a una clasificación compleja basada en el fenotipo y correlaciones genéticas moleculares. El inicio de los síntomas clínicos abarca desde el período neonatal hasta la adultez tardía. La distribución de la debilidad muscular predominante ayuda a identificar seis principales fenotipos similares a Duchenne, que involucra hombro, cintura pélvica y músculos flexores del cuello, con hipertrofia de la pantorrilla, hay distrofias con distribución peroneal, escapulohumeral y que presentan contracturas tempranas así como con una distribución a nivel de cintura del miembro (pelvis y hombro) así como con compromiso fascioescapulohumeral peroneal y del músculo distal (miopatía distal) la que se nombra distrofia muscular oculofaríngea.ⁱ

El modo de herencia en las distrofias musculares puede ser autosómico dominante, autosómico recesivo o ligado a X. Los defectos moleculares subyacentes responsables para estos trastornos son diversos, incluidos los extracelulares las proteínas matriciales (laminina-2, colágeno VI), transmembrana y proteínas asociadas al sarcolema (distrofina, sarcoglicanos, caveolin-3, integrina $\alpha 7$, disferlina), proteasas citoplasmáticas (calpaína-3), proteínas citoplasmáticas asociadas con orgánulos y sarcómeros (titina, fukutina,) y proteínas nucleares de membrana (lamin, emerin).⁴

El descubrimiento de que la distrofia muscular de Becker (DMB) es una forma alélica más leve de distrofinopatía, y que la distrofina está presente pero alterada cualitativamente y cuantitativamente, permitió la posibilidad de proporcionar beneficio clínico a los pacientes con Distrofia Muscular de Duchenne, incluso con la restauración parcial de la expresión de la distrofina.ⁱⁱ

La restauración de distrofina se puede lograr de dos maneras diferentes: por medio de terapias genéticas, suministrando nuevo material genético, que no está presente de manera natural en las células del paciente, como la copia funcional del gen; o a través de terapias moleculares, con moléculas pequeñas o más grandes (oligonucleótidos, enzimas) que interactúan con el propio material genético del paciente y la maquinaria de transcripción o traducción para restaurar la expresión de la distrofina. Una caracterización de la mutación a nivel genómico es de importancia primordial para proporcionar asesoramiento genético a la familia y así establecer correlaciones genotipo-fenotipo y pronóstico. Dentro de los estudios complementarios en distrofinopatías los niveles de Creatininfosfocinasa son útiles como parte del diagnóstico de pacientes con Distrofia muscular de Duchenne.⁵

Para conocer la fisiopatología de la distrofia muscular de Duchenne-Becker es importante conocer que la proteína distrofina presenta un dominio de unión a actina

N-terminal y un dominio de barra central larga que consta de 24 repeticiones similares a espectrina además de un dominio de unión a distroglicano C-terminal. Dentro del dominio de barra central hay un segundo dominio de unión a actina, así como un sitio de unión para el óxido nítrico sintasa neuronal; proteínas adicionales, que incluyen la distrobrevina y la sintrofina y que se unen a la distrofina distal al dominio de unión al distroglicano. Esto sugiere un papel para la distrofina en la señalización; es claro que la distrofina juega un papel crítico como un enlazador estructural entre la F-actina citoesquelética y el b-distroglicano, una de la glucoproteína asociada a distroglicano unida a la membrana. Otra de estas proteínas, α -dystroglycan, se encuentra externamente, donde se une con la matriz extracelular.ⁱⁱⁱ

Los pacientes con DMD y DMB presentan fuerzas de deformación generadas por la contracción muscular significativas, lo que conduce a elevaciones de la creatina quinasa (CK) en el suero y el influjo de calcio dentro de la fibra muscular, la activación de las proteasas dependientes de calcio siguiendo ciclos de necrosis, degeneración y regeneración de la fibra muscular y aumento de la fibrosis endomisial con sustitución grasa del músculo a lo largo del tiempo, y pérdida de la función contráctil del músculo de manera secundaria.⁶

Las manifestaciones clínicas de los pacientes con DMD es relativamente uniforme y las diferencias en la evolución individual se deben especialmente a la afectación cardíaca asociada y los cuidados particulares otorgados a los pacientes a distintos niveles: rehabilitación, seguimiento cardíaco, respiratorio, ortopédico, psicosocial y nutricional. Es importante el seguimiento psicopedagógico de estos pacientes ya que el 30% se asocia a coeficiente intelectual bajo.^{iv}

Alrededor del 60 al 70% de las mutaciones causantes de DMD son grandes reordenamientos (deleciones o duplicaciones) que incluyen uno o más exones; éstos son identificados fácilmente tanto en los enfermos como en las portadoras mediante la amplificación de la sonda dependiente de la ligadura múltiple (MLPA).^v

En DMD puede producirse una mutación *de novo*, esto significa que nuevos casos surgirán incluso con un buen diagnóstico prenatal, sin embargo, ya se cuentan con herramientas y asesoramiento familiar y diagnóstico prenatal para conocer estos casos.^{vi} En la mayoría de los pacientes hay una deleción (68%) o duplicación (11%) en uno o más exones también se encuentran mutaciones (20% de los pacientes).⁹ Estas eliminaciones y duplicaciones pueden ocurrir en cualquier lugar en el gen, pero se concentran entre exones 45-55 y exones 2-10 para deleciones y duplicaciones, respectivamente.⁹

LA IMPORTANCIA DEL DIAGNOSTICO PRENATAL:

Ante la sospecha de una madre portadora de distrofia muscular de Duchenne o Becker el control prenatal es de suma importancia así como la evolución del embarazo ya que la presentación clínica de los pacientes que presentan características clínicas específicas aunque no en la forma más severa, se puede

observar durante el periodo perinatal en alteraciones como oligohamnios o disminución de los movimientos fetales. Al nacer los pacientes presentan compromiso respiratorio, hipotonía y debilidad generalizada. Se observa atrofia cerebral posterior al nacimiento. por lo antes mencionado el asesoramiento genético de las madres de un paciente con diagnóstico nos permite el asesoramiento evitar casos nuevos en la familia.¹⁰

Una vez diagnosticada la distrofia muscular de Duchenne o Becker los pacientes presentan además de la debilidad generalizada, falla respiratoria, aprendizaje lento, complicaciones cardiorrespiratorias, debilidad facial, miotonia, coeficiente intelectual bajo, defectos de conducción, miotonia, cataratas, resistencia a la insulina mencionando lo anterior por la importancia de una detección temprana oportuna.¹

ESTUDIOS DE IMAGEN COMO COMPLEMENTACION DIAGNOSTICA:

Se realizó un estudio en el Hospital Universitario de Taiwán. Todos los participantes presentaron carta de consentimiento bajo información. Entre abril de 2015 y junio de 2016, se reclutaron 40 pacientes fueron para el estudio en la clínica de desórdenes neuromusculares del Hospital Universitario de Taiwán. Se concluyó que el ultrasonido es el primer estudio para evaluar la distrofia muscular.¹¹

DIAGNOSTICOS DIFERENCIALES DE DISTROFINOPATIAS:

Dentro del estudio de la distrofia muscular de Duchenne y Becker hay que tomar en cuenta los diagnósticos diferenciales como la distrofias de cinturas dentro de las que destacan LGMD cuya secuenciación del exoma no es considerada actualmente el examen de primera línea para el diagnóstico de distrofias musculares, pero es una herramienta útil para el diagnóstico molecular de pacientes con clínica de distrofia muscular; por lo que es fundamental caracterizar el patrón de debilidad muscular, determinar el tipo de herencia y solicitar otros exámenes.¹²

ESTUDIOS MOLECULARES.

En México hay instituciones como el Instituto Nacional De Rehabilitación que ha realizado el diagnóstico molecular de Distrofia muscular de Duchenne y Becker por medio de estudios moleculares, ellos han utilizado la prueba PCR multiplex, la cual posteriormente se complementa con el diagnóstico por MLPA. La técnica de PCR multiplex descrita por Chamberlain y por Beggs permite analizar deleciones de los exones 1, 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 50, 51, 52 y 60 del gen Distrofia muscular de Duchenne. (11). En el Instituto Nacional de Rehabilitación se ha analizado el ADN de los pacientes por medio de dos reacciones de PCR multiplex usando los oligonucleótidos descritos previamente por Chamberlain (exones 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 46, 48 y 51) y Beggs (exones 1, 3, 6, 13, 43, 47, 50, 52 y 60). Para llevar la reacción de PCR se utilizó el kit Multiplex PCR de Qiagen. (11) y con

lo antes mencionado se ha llegado al diagnóstico de 22 pacientes con fenotipo Distrofia muscular de Duchenne, por PCR múltiple.¹³

Debido a que la técnica de PCR multiplex sólo analiza deleciones de 19 exones, y que la Distrofia muscular de Duchenne y Becker puede ser causada no sólo por deleciones, sino también por duplicaciones o mutaciones puntuales en cualquiera de los 79 exones del gen distrofia muscular de Duchenne, no se puede descartar que el resto de los sujetos tenga alguna mutación, por lo que es necesario complementar el diagnóstico con un análisis por MLPA.¹³

En un estudio realizado en Japón por la universidad de Tokio en el año de 2015 como protocolo de estudio de la terapia génica para la Distrofia Muscular de Duchenne se realizó y demostró la corrección genética del gen de la distrofina mediante el uso de tres métodos diferentes: 1: interrupción del empalme aceptador para omitir el exón 45, 2: introducción de indeles pequeños para modular el marco de lectura de proteínas, y 3: knockin del exón 44 faltante para restaurar la región de codificación de proteínas completa. Los resultados obtenidos demostraron que la corrección genética mediante estos enfoques en pacientes disminuye considerablemente el riesgo de muta génesis fuera del objetivo y, por lo tanto, es una prueba prometedora para la terapia génica de Distrofia Muscular de Duchenne. La proteína distrofina restaurada se localizó en la región de la sub-membrana, como se esperaba, esto nos permite considerar y conocer otro tipo de estudios para el diagnóstico de dicha enfermedad.¹⁴

TRATAMIENTO DE DISTROFIA MUSCULA DE DUCHENNE Y BECKER.

Una vez confirmado el diagnostico de distrofia muscular de Duchenne y Becker se considera el tratamiento con prednisona durante un máximo de 6 meses mostrando mejoría en la fuerza muscular, con una dosis de 0,75 mg/kg al día. El uso de una dosis más alta de 1,5 mg/kg diaria no resultó más efectiva, y una dosis más baja de 0,3 mg/kg al día resultaba menos beneficiosa. La administración diaria era más efectiva que el tratamiento en días alternos.¹⁵

Para el tratamiento médico de distrofia muscular de Duchenne y Becker Bonifati en el 2000 realizo un estudio con 18 participantes, que comparó los efectos adversos de la prednisona con los de deflazacort, ambos administrados en un régimen de dosis diaria durante un año. Los dos corticosteroides demostraron un beneficio similar en la fuerza y las pruebas funcionales, pero la diferencia en el aumento de peso fue estadísticamente significativa, siendo más marcada en el grupo de tratamiento con Prednisona.¹⁵

Los corticoides, las intervenciones respiratorias, cardíacas, ortopédicas y de rehabilitación han llevado a mejoras en la función, la calidad de vida , la salud y la longevidad y los niños que son diagnosticados hoy en día ,tendrán la posibilidad de que su esperanza de vida esté en la cuarta década.¹⁵

El tratamiento con glucocorticoides no es recomendable para niños para menores de 2 años de edad. Se ha encontrado que el uso diario de un glucocorticoide es preferible a regímenes alternativos.¹⁵

En un estudio realizado en el periodo de enero 2004 a julio de 2014 con el fin de actualizar la guía de la Academia Americana de Neurología (AAN) sobre el tratamiento con corticosteroides de la distrofia muscular de Duchenne (DMD), se sugiere ¹⁵:

- Debe usarse para mejorar la resistencia y se puede usar para mejorar la función motora.¹⁵
- Mejorar la función pulmonar.
- Reducir la necesidad de cirugía de escoliosis.
- Retrasar el inicio de la cardiomiopatía a los 18 años de edad .

Y con respecto al Deflazacort, que se ofrece como una intervención para pacientes con Distrofia muscular de Duchenne, se concluye que se puede usar para:

- Mejoría de la fuerza y el tiempo de la función de la motriz y retardo en la edad de 1,4-2.5 años en la pérdida de la ambulación. ¹⁵.
- Mejora la función pulmonar, ya que retrasa el inicio de la miocardiopatía en pacientes hasta los 18 años de edad, aumenta la supervivencia .¹⁵

El Deflazacort y la prednisona pueden ser equivalentes para mejorar la función motora.¹⁵. Con respecto de los efectos adversos de la prednisona puede asociarse con aumento de peso en los primeros años de tratamiento en comparación con deflazacort¹⁵

El Deflazacort puede asociarse con un mayor riesgo de cataratas en comparación con la prednisona. La prednisona 0,75 mg / kg/ día probablemente esté asociada con un riesgo significativo con aumento de peso, hirsutismo y apariencia cushingoide. ¹⁵

Se sugirió que la adición de bisfosfonatos (alendronato) puede mejorar la salud ósea en pacientes con Distrofia muscular de Duchenne que toman prednisona.¹⁵

A su vez se encontró que los pacientes con distrofia muscular de Duchenne pueden asociar a otro tipo de las complicaciones como las endocrinas por lo tanto; dentro del tratamiento de distrofia muscular de Duchenne y Becker se encuentran evitar el deterioro del crecimiento, la pubertad retrasada y la insuficiencia suprarrenal. ¹⁵

Los objetivos de la valoración endocrinológica son monitorear el crecimiento y el desarrollo, identificar y diagnosticar la deficiencia de hormonas, proporcionar terapia de reemplazo hormonal endocrina cuando se lo indique y prevenir una crisis suprarrenal potencialmente mortal. ¹⁵ Una disminución en el crecimiento, como lo

evidencia el cruce hacia abajo del percentil de altura o una velocidad de talla anualizada de menos de 4 cm por año, es consistente con un crecimiento lineal alterado.¹⁵

Todo lo anterior mencionado nos permite conocer las comorbilidades de los pacientes con distrofinopatías y que el manejo de los mismos es multidisciplinario, así como la importancia de que el diagnóstico oportuno nos permite mejorar la calidad de vida de estos pacientes.

En la experiencia del Departamento de Medicina Genómica del Centro Médico Nacional 20 de noviembre se han identificado mutaciones que coinciden con estudios realizados en el Instituto Nacional de Rehabilitación asumiendo que estas podrían tener una prevalencia importante en población Mexicana aunque esta hipótesis aún se encuentra en proceso de verificación. Comunicación verbal de la Dra. Silvia García y Luz Berenice López Hernández con protocolo autorizado en: Evaluación de biomarcadores bioquímicos y genéticos para el monitoreo del progreso de la distrofia muscular Duchenne y detección de portadoras. No. Registro 397.2014.

I. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

El diagnóstico de la DMD y DMB suele retrasarse de hasta varios años en virtud de que los profesionales de la salud no están familiarizados con esta enfermedad lo cual repercute de manera importante en la historia natural de la enfermedad ya que al no ofrecer las medidas terapéuticas que han demostrado ser de utilidad, el tiempo de deambulación se acorta y las complicaciones se aceleran. Estos eventos aumentan los costos de atención tanto directos como indirectos sin considerar los aspectos psicológicos en el entorno familiar.

En diferentes estudios y en nuestro Centro Médico Nacional 20 de Noviembre (Departamento de Genómica se han identificado algunas mutaciones en el gen de la distrofina (locus Xp21.2) asumiendo algunos estudios que estas mutaciones podrían tener concordancia con los diferentes grados de severidad que se presentan en la historia familiar de los pacientes que la padecen. Basado en esto planteamos la siguiente pregunta de investigación:

Cuál es la Concordancia entre manifestaciones clínicas y resultado en MLPA (prueba molecular) en el diagnóstico de Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) en el Centro Médico nacional 20 de noviembre. ISSSTE?

II. JUSTIFICACION

La Distrofia Muscular de Duchenne es una enfermedad ligada al cromosoma X que afecta a 1 en 3600-6000 masculinos vivos. La clínica se caracteriza por un leve retraso en hitos motores y la mayoría no pueden correr y saltar adecuadamente debido a la debilidad muscular proximal, que clínicamente se manifiesta con el uso de la clásica maniobra de Gowers. La mayoría de los pacientes son diagnosticados aproximadamente a los 5 años de edad, cuando su capacidad física difiere marcadamente de la de sus pares.^{vii}

La DMD ocurre como resultado de mutaciones en el gen de la distrofina (locus Xp21.2). Las formas alélicas más leves de la enfermedad reconocidas incluyen la distrofia muscular intermedia y la distrofia muscular de Becker, que causa la pérdida de la deambulación a los 16 años o posterior.

Se propuso la presente investigación para identificar la concordancia entre las variaciones en las mutaciones del gen con las manifestaciones clínicas, esperando que la información que se obtenga nos permita identificar a los pacientes que requieran atención especializada, específica y oportuna que coadyuve en la atención médica que se ofrece en el Servicio de Neurología Pediátrica del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre. ISSSTE.

III. OBJETIVO GENERAL

Determinar la concordancia entre manifestaciones clínicas y resultado en MLPA (prueba molecular) en el diagnóstico de Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) del Centro Medico Nacional 20 De Noviembre.

IV. OBJETIVOS ESPECIFICOS

En pacientes con enfermedad Distrofia muscular de Duchenne: conocer:

- “ Las mutaciones de gen de la distrofina (locus Xp.21.2).
- “ Los grados de severidad de la enfermedad”.
- “ La edad de manifestación de la enfermedad”
- “Conocer la mortalidad y morbilidad asociada”.

V. HIPOTESIS

La Concordancia entre manifestaciones clínicas y resultado en MLPA (prueba molecular) en el diagnóstico de Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es mayor del 50%.

VI. METODOLOGIA

Se realiza el proyecto en los pacientes con Distrofia Muscular de Duchenne atendidos en Centro Medico Nacional 20 de Noviembre. ISSSTE.

La Muestra original era para 70 pacientes sin embargo por ser una enfermedad neuromuscular poco común se recolecto para 24.

Los criterios de inclusión se encuentran los pacientes con diagnóstico de DMD o DMB por clínica y por MLPA.

Los criterios de exclusion se encuentran los pacientes con trastornos neurológicos con otros tipos de distrofias, con otras enfermedades genéticas asociadas.

Realizando un estudio transversal-descriptivo-observacional, no probabilístico por conveniencia.

Se tomaron los resultados del estudio por el proyecto con número de registro 397.2014 titulado “EVALUACION DE BIOMARCADORES BIOQUIMICOS Y GENETICOS PARA EL MONITOREO DEL PROGRESO DE LA DISTROFIA MUSCULAR DUCHENNE Y DETECCION DE PORTADORAS”. Sin tener que

intervenir a ningún paciente en el proyecto actual. Y complementando los datos por medio de la revisión de expedientes clínicos de los pacientes elegidos.

Se procesaron los datos a través del programa SPSS.24.2 por medio de las pruebas estadísticas kappa, moda, mediana, r Pearson.

VII. RESULTADOS

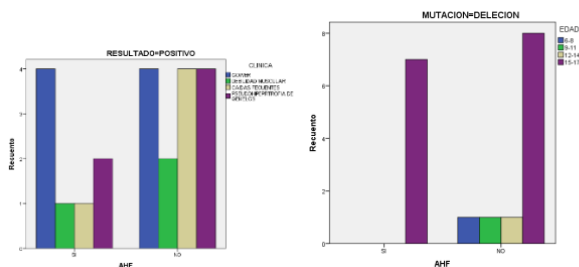
La Distrofia Muscular de Duchenne es una enfermedad neuromuscular poco común por lo que su diagnóstico llega a ser tardío, se recolectaron datos clínicos y se analizaron los resultados obtenidos a través de la prueba molecular MLPA (obtenidos a través del proyecto antes mencionado con número de registro 397.2014) a 24 pacientes con Distrofia muscular de Duchenne del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre de los cuales se encontró que el 87.5 % presentan fenotipo de DMD y el 12.5 % DMB; el 75 % de las alteraciones moleculares son Deleciones en diferentes tipos de genes encontrando en 5 pacientes daño en el exón 48-52, 3 pacientes en el exón 44, y el resto en diferentes tipos de exones como 1,3, 6,7,9, 10,45. Siendo observada en varones en el 100% de pacientes.

Al momento del diagnóstico el 93% de los pacientes presentaba alteraciones clínicas importantes como caídas frecuentes, pseudohipertrofia de gastrocnemios, el 20% deambulaba sin dificultad, siendo un 80 % con dificultad para la misma o pérdida total.

Al momento del diagnóstico el 93% de los pacientes presentaba alteraciones clínicas importantes como caídas frecuentes, pseudohipertrofia de gastrocnemios, el 20% deambulaba sin dificultad, siendo un 80 % con dificultad para la misma o pérdida total.

Se les realizó previo al estudio molecular estudios de laboratorio y gabinete a los pacientes con clínica de DMD encontrando una CPK de más de 3000 en el 95.2 % de los pacientes con una p.000, electromiografía alterada en el 66.7 % con una p. con 10/24 pacientes con patrón miopático en el resultado, biopsia muscular positiva en el 50 % de los pacientes, siendo esta última con una p.152 de correlación con el fenotipo del paciente.

Con respecto a la edad de los pacientes fue en los adolescentes 15 años en adelante en donde se encontraron mayor número de pacientes. Se encontraron alteraciones cardíacas miocardiopatía dilatada en dos pacientes y 3 con patrón restrictivo pulmonar.



De 24 pacientes 8 tuvieron antecedentes heredofamiliares, y 95 % al momento del diagnóstico se requirió inicio de tratamiento o continuación con el mismo con Deflazacort.

VIII. DISCUSION

La Distrofia Muscular de Duchenne es una enfermedad ligada al cromosoma X que afecta a 1 en 3600-6000 masculinos vivos. La clínica se caracteriza por un leve retraso en hitos motores y la mayoría no pueden correr y saltar adecuadamente debido a la debilidad muscular proximal, que clínicamente se manifiesta con el uso de la clásica maniobra de Gowers. La mayoría de los pacientes son diagnosticados aproximadamente a los 5 años de edad, cuando su capacidad física difiere marcadamente de la de sus pares.

La DMD ocurre como resultado de mutaciones en el gen de la distrofina (locus Xp21.2). Las formas alélicas más leves de la enfermedad reconocidas incluyen la distrofia muscular intermedia y la distrofia muscular de Becker, que causa la pérdida de la deambulación a los 16 años o posterior.

Dentro de lo encontrado esta investigación nos ayuda a complementar el diagnóstico del fenotipo de acuerdo al resultado molecular lo cual ya fue mencionado en el artículo publicado por el Instituto Nacional de Rehabilitación en México en el 2016 donde se ha analizado el ADN de los pacientes por medio de dos reacciones de PCR multiplex usando los oligonucleótidos descritos previamente por Chamberlain (exones 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 46, 48 y 51) y Beggs (exones 1, 3, 6, 13, 43, 47, 50, 52 y 60). Para llevar la reacción de PCR se utilizó el kit Multiplex PCR de Qiagen. y con lo antes mencionado se llegó al diagnóstico de 22 pacientes con fenotipo Distrofia muscular de Duchenne, por PCR múltiple, sin embargo debido a que la técnica de PCR multiplex sólo analiza deleciones de 19 exones, y que la

Distrofia muscular de Duchenne y Becker puede ser causada no sólo por deleciones, sino también por duplicaciones o mutaciones puntuales en cualquiera de los 79 exones del gen distrofia muscular de Duchenne, no se puede descartar que el resto de los sujetos tenga alguna mutación, por lo que es necesario complementar el diagnóstico con un análisis por MLPA. Que en el caso de nuestros pacientes se encontró que el exón con mayor frecuencia en el daño fue el 48-52 y que el 95 % de los pacientes con clínica de Duchenne se permitió confirmar el diagnóstico.

IX. CONCLUSIONES

En conclusión la Distrofia muscular De Duchenne es observada en varones, pueden haber casos de aparición de novo sin antecedentes heredofamiliares, su diagnostico al momento del primer contacto es tardío encontrando las complicaciones propias de la enfermedad que no permitan al paciente tener una adecuada calidad de vida y ensombreciendo su pronostico de vida.

La variedad más frecuentemente encontrada es Duchenne con respecto a Becker, se observa que dentro de los estudios de laboratorio y gabinete realizados como protocolo de la enfermedad la creatininfosfocinasa fue la que mayor sensibilidad mostro al estar elevada en más de 3000 en todos los pacientes confirmados.

Es de importancia hacer un diagnóstico oportuno en los pacientes con distrofia Muscular de Duchenne ya que depende de ello su pronóstico de vida ya que el inicio temprano de Deflazacort y el manejo multidisciplinario permite mejoría en la calidad de vida y prolongar la presencia de las complicaciones fatales propias de dicha enfermedad.

Dentro de los resultados del estudio molecular el exón 48-52 fue el que mayor frecuencia se encontró con daño en el gen de la distrofina . Confirmando que la prueba molecular MLPA es el estándar de oro de esta enfermedad y que con una toma de sangre periférica y procesándolas a través del secuenciador nos permite diagnosticar oportunamente al paciente y poder brindar asesoramiento genético a la familia del mismo.

X. BIBLIOGRAFIA





1. Bushby K, Finkel R, Birnkrant J , Case LE, Clemens PR, Cripe L . Diagnostic and management of Duchenne muscular dystrophy , part 1. Diagnosis and pharmacological and psuchosocial management. Lancet Neurology.2010; 17:77-93.
2. Claudia Godi. Longitudinal MRI quantification of muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy, Annals of clinical and translational Neurology, 2016;4: 607-622 .
3. Abbs S, Tuffery-Giraud Sylvie B , Bakker C E, Ferlini D A , Sejersen E Thomas. Best Practice Guidelines on molecular diagnostics in Duchenne/ Becker muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. , 2010; 20:422-427.

4. Kenneth F. Swaiman, Aswall E. Ferreiro, M Donna, Schor Nina, Muscular Dystrophies In Pediatric Neurology (principles and practical). Vol 1.Fifth edition, USA, editorial Elsevier. 2012:1570-1600.
5. Emma Mattews,Brasington Ruth, Kuntzer Thierry,Jichi Fatima, Manzur Adrian. Coricosteroids for the treatment of Duchenne Muscular Dystrophy, Cochrane.Database.<http://cochranelibrarywiley.com/doi/10.1002/14651858.CD003725.pub4/full2015>. Review 2018.
6. Nicolas Wein , Alfano Lindsay , Flanigan K. Genetics and Emerging Treatments for Duchenne and Becker Muscular Dystrophy . Pediatric Clin N Am. 2015; 62 :723–742.
7. Alessandra Ferlinni Neri Marcella, Gualandi Francesca.The medical genetics of dystrophinopathies: Molecular genetic diagnosis and its impact on clinical practice. Neuromuscular Disorders. 2013; 23: 4–14.
8. Luca Bello , Guja Astrea, Giulia Ricci, Maria Grazia D'Angelo. Genetic diagnosis as a tool for personalized treatment of Duchenne muscular dystrophy, Acta Myologica. 2016;31:122-17.
9. Annemieke Aartsma-Rus , Ieke B Ginjaar, and Bushby Kate. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. J Med Genet .2016; 3: 145-151.
10. Le Rumeur E, Dystrophin and two related genetic diseases. Duchenne and Becker muscular dystrophies, Bosn J Basic Med.Sci . 2015; 15(3): 14-20.
11. Wen-Chin Weng, Po-Hsiang Tsui, Chia-Wei Lin, Chun-Yen Lin, Leigh Lu F, Weng Wu Kuan. Evaluation of muscular changes by Ultrasound Nakagami imaging in Duchenne muscular dystrophy ,Scientific Reports. 2016; 7:4429
12. Andrés Felipe , Ramírez-Botero. Enfoque diagnóstico molecular utilizando secuenciación exómic en las distrofias musculares de cintura-cadera, Rev. Fac. Med. 2016 ; 64:59-64.
13. Alexandra B Luna-Angulo, Suarez Sánchez Roció, Cortes-Callejas Hernán, Ruano Calderón Luis, Escobar-Cedillo Rosa E, Tapia Guerrero. Molecular

diagnosis of neuromuscular diseases at the Instituto Nacional de Rehabilitación (National Institute of Rehabilitation), Current situation and prospects, *Investigacion en Discapacidad*. Abril 2016;5:9-26

14. Hongmei Lisa, Fujimoto Naoko, Sasakawa Noriko, Shirai Saya. Precise Correction of The Distrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy patient Induced Pluripotent stem cells by talent and CRISPR-Cas 9, *Stem Cell Reports*. 2015; 4:143-145.
15. Gloss David , Moxley Richard, Oskoui Maryam. Practice guideline update summary: Corticosteroid treatment of Duchenne muscular dystrophy . *American Academy of Neurology*. 2016; 86: 465-472.
16. Anaya Segura Mónica, Garcia Martinez Froylan A, Montes-Almanza Luis Angel, Lopez Hernandez Berenice. Non-Invasive Biomarkers for Duchenne Muscular Dystrophy and Carrier Detection. *Journal Molecules*. 2015: 20;11154-11172.
17. Anaya Segura Mónica, Rangel Villalobos Héctor, Martínez Cortes Gabriela, López Hernández Berenice. Comparison of Mutation Profiles in the Duchenne Muscular Dystrophy Gene among Populations: Implications for Potential Molecular Therapies. *International Journal Molecular Science*. 2016: 17; 1334-1346.
18. Anaya Segura Monica, Rangel-Villalobos Hector, Martinez Cortes Gabriela, Lopez Hernandez Berenice. Serum Levels of MicroRNA-206 and Novel Mini-STR Assays for Carrier Detection in Duchenne Muscular Dystrophy. 2016: 17; 1334-1347.

XI. ANEXOS

 MÉXICO GOBIERNO DE LA REPÚBLICA		 ISSSTE INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SALUD PARA LOS TRABAJADORES DEL ESTADO	
---	---	---	---

ANEXO 1
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES CON DISTROFIA MUSCULAR

México, D.F., a _____

Por medio de la presente yo, _____ Autorizo mi participación en el proyecto de investigación titulado:

“EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS Y GENÉTICOS PARA EL MONITOREO DEL PROGRESO DE LA DISTROFIA MUSCULAR DUCHENNE Y DETECCIÓN DE PORTADORAS”

El objetivo de este estudio es mejorar la atención de los pacientes con distrofia muscular. Se me ha explicado que mi participación consistirá en responder las preguntas convencionales de una historia clínica y la toma de una muestra única de 10 ml de sangre distribuidos en dos tubos recolectores, misma que está indicada para el diagnóstico de mi enfermedad independientemente de mi participación en el presente proyecto. Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes y molestias de mi participación en el estudio, que son los siguientes:

Riesgos y molestias:

- a) Por la toma de sangre: malestar y dolor, formación de hematoma o morete en el sitio del piquete de la vena.
- b) Por la extracción de sangre: ningún riesgo grave.
- c) Beneficios:
- a) Se generará información importante para el monitoreo del progreso de la enfermedad y detección de portadoras. Entiendo que conservo el derecho de retirarme o retirar mi muestra biológica del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente. Asimismo, se me ha informado que esta muestra de ADN además podría ser utilizada en otros estudios relacionados con distrofia muscular con el fin de contribuir al conocimiento de esta enfermedad, para ello mi muestra será almacenada a -20°C durante un periodo de 5 años en Hospital y a partir de la toma de la muestra y pasado este tiempo será desechada.

El investigador principal ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma absolutamente confidencial. Para cumplir la anterior, el investigador utilizará para la creación de la base de datos (que tendrán mi información clínica, así como las respuestas del cuestionario acerca de mis datos que se me aplicará), número de folio (NO empleará mi nombre) para identificarme y de esa forma conservar mi anonimato.

Datos de la investigadora principal a los cuales puede comunicarse en caso de dudas o preguntas relacionadas con el estudio: Dra. Luz Berenice López Hernández, Dra. Silvia García. Domicilio de contacto: Félix Cuevas #540, Col. Del Valle, Del. Benito Juárez, México, D.F.; Piso del edificio D en la Subdirección de Enseñanza e Investigación, Calle San Lorenzo 502, esquina Av. Coyoacán, Col. Del Valle, Delegación Benito Juárez, C.P. 03100. Presidente del Comité de Ética: Dr. Abel Archundia García 52005003 ext. 14622.

<p>Investigador Responsable (Nombre completo y firma)</p> <p>Testigo _____ (Nombre completo y firma) Domicilio _____</p> <p>Parentesco _____</p>	<p>Paciente (Nombre completo y firma)</p> <p>Testigo _____ (Nombre completo y firma) Domicilio _____</p> <p>parentesco _____</p>
--	--

1/1

VARIABLE	TIPO	INDICADORES	ITEM
EDAD	CUANTITATIVA	1. PREESCOLAR 2. ESCOLAR. 3. ADOLESCENTE	1. DE 2 A 4 AÑOS. 2. DE 5 A 11 AÑOS. 3. DE 1 A 18 AÑOS
GENERO	CUALITATIVA	1. FEMENINO 2. MASCULINO	
SINTOMAS	CUALITATIVA	1. CAIDAS FECUENTES 2. DEBILIDAD MUSCULAR. 3. SIGNO DE GOWERS. 4. PSEUDOHIPTROFIA DE GEMELOS.	1. SI 2. NO
ANTEC. FAMILIARES DE DISTRONOPATIAS	CUALITATIVA	1. CONSANGUINEIDAD EN LOS PADRES. 2. FAMILIARES CON DISTRONOPATIAS.	1. SI 2. NO
PRUEBAS DE FUNCION HEPATICA	CUANTITATIVA	1. ALTA 2. MODERADA 3. BAJA	VER ANEXOS.
NIVELES DE CREATININ FOSFORINASA	CUANTITATIVO	1. ALTO. 2. MODERADO. 3. NORMAL	1. DE 2000 EN ADELANT. 2. DE MAS DE 200 A 2000 3. MENOS DE 200
BIOPSIA MUSCULAR POSITIVA PARA DISTRONIA	CUALITATIVA	1. POSITIVO 2. NEGATIVO	1. ALTERACION NECROTICO-DEGENERATIVA DEL MUSCULO INFILTRACION ADIPOSITA.
ELECTROMIOGRAFIA ALTERADA	CUALITATIVA	1. ALTERADA. 2. NORMAL	
TRATAMIENTO	CUALITATIVA	1. NINGUNO 2. DEFLAZACORT 3. ESTEROIDE	1. MEJORIA 2. SIN MEJORIA