



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

**“PERFIL DE EXPRESIÓN A NIVEL SÉRICO DE LOS MIRNAS  
miR-21-5p Y miR-128-3p EN PACIENTES CON  
DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE”  
R-2021-3603-039**

**TESIS**

Que para obtener el:  
Título de especialista

En:  
Genética Médica

Presenta:

**Dr. Jose Emilio Galeazzi Aguilar**

Residente de tercer año,

UMAЕ Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund”,  
Centro Médico Nacional Siglo XXI,  
Instituto Mexicano del Seguro Social.

Tutores:

**Dr. Alan Cárdenas Conejo**

Departamento clínico de Genética Médica,  
UMAЕ Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund”,  
Centro Médico Nacional siglo XXI,  
Instituto Mexicano del Seguro Social.

**M. en C. Tomas Almeida Becerril**

Unidad de Investigación Médica en Nutrición,  
UMAЕ Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund”,  
Centro Médico Nacional Siglo XXI,  
Instituto Mexicano del Seguro Social.



Ciudad de México, Octubre del 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



## TUTORES

### **Dr. Alan Cárdenas Conejo**

Departamento clínico de Genética Médica,  
Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund”,  
Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.  
alan.cardenasc@imss.gob.mx

### **M. en C. Tomas Almeida Becerril**

Unidad de Investigación Médica en Nutrición,  
Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund”,  
Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.  
tom\_almeida@outlook.com

## ALUMNO

### **Dr. Jose Emilio Galeazzi Aguilar**

Médico residente Genética Médica,  
Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría Dr. Silvestre Frenk Freund”,  
Centro Médico Nacional siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.  
emga9105@gmail.com



*"Conténtate con lo que tienes;  
alégrate de como son las cosas.  
Cuando te das cuenta de que nada falta,  
el mundo entero te pertenece"*  
— Lao Tze

## Agradecimientos

Al Doctor Alán, por ser un ejemplo a seguir, tanto en el ámbito profesional como fuera de este. Por sembrar en mí el interés por la investigación. Por sacar la mejor versión de mí.

Al Doctor Tomas, por inculcar en mi el sentido de perfección, de la metodología, del análisis, así como de la organización.

A la Doctora Maricela, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo. Por su tiempo, su paciencia, su experiencia y sus consejos.

Al Doctor Juan Carlos, por estar siempre ahí para mí, siendo un faro en los momentos difíciles. Por permitirme crecer.

A mis compañeros residentes de Genética Médica, a David, a Ana Pau, a Celia, a Daniel, a Pedro, a Ana Ceci, a Vianey y al resto de residentes por siempre apoyarme con un consejo, con una sonrisa, con una palabra. Gracias por su amistad.

Al equipo de Unidad de Investigación Médica en Nutrición, a Cecilia, a Emmanuel, a Judith, a Cristian, gracias por hacerme sentir parte del equipo, por darme sugerencias, por hacerme observaciones.

Pero sobre todo a mi familia.

A mi madre Rocío por ser mi mejor amiga, por acompañarme en todo este proceso, por creer en mi cuando nadie más lo hacía.

A mi tía Nieves, por su cariño, comprensión y dulzura. Por mantener junta a esta familia.

A mi abuela Nena por quererme, por tus oraciones, por siempre estar pendiente de mi bienestar.

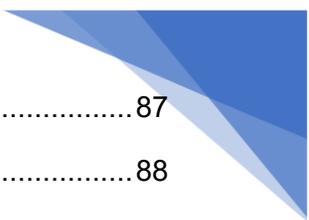
A mi abuelo Juan, donde quiera que estés, por enseñarme el valor del carácter, de una mentalidad resiliente y del trabajo.



# 1 ÍNDICE

1	ÍNDICE.....	1
2	ÍNDICE DE TABLAS.....	4
3	ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
4	ABREVIATURAS.....	7
5	RESUMEN.....	9
6	MARCO TEÓRICO.....	11
6.1	Etiología y epidemiología de la Distrofia Muscular de Duchenne.....	11
6.2	Características clínicas.....	11
6.3	Diagnóstico molecular.....	13
6.4	Tratamiento.....	13
6.5	Distrofina.....	13
6.6	Fisiopatología.....	15
6.7	Proceso fibrótico en DMD.....	17
6.8	Rol de TGF- $\beta$ 1 en el proceso fibrótico de la DMD.....	17
6.9	Papel de las MMPs en el proceso fibrótico en DMD.....	20
6.10	MicroRNAs.....	21
6.11	Perfil de miRNAs en DMD.....	22
6.12	miR-21-5p.....	24
6.13	miR-128-3p.....	27
7	ANTECEDENTES.....	28
7.1	miR-21-5p.....	28
7.2	miR-128-3p.....	29
8	JUSTIFICACION.....	30
9	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
10	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	31
11	OBJETIVO GENERAL.....	32
11.1	Objetivos específicos primarios.....	32
11.2	Objetivos específicos secundarios.....	32
12	MATERIAL Y METODOS.....	33
12.1	Diseño de estudio.....	33

12.2 Lugar del estudio .....	33
12.3 Población del estudio .....	33
12.4 Criterios de selección .....	34
12.5 Tamaño de la muestra .....	34
12.6 Definición de variables.....	35
13 DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO.....	37
14 ANALISIS ESTADISTICO.....	40
15 ASPECTOS ETICOS.....	41
16 RESULTADOS.....	43
16.1 Comparación de la edad, los parámetros antropométricos, parámetros de daño muscular, parámetros de fuerza muscular y de actividad física entre los pacientes ambulatorios y no ambulatorios con DMD.....	43
16.2 Niveles de expresión de miR-21-5p y miR-128-3p en pacientes ambulatorios y no ambulatorios.....	44
16.3 Correlación de miR-21-5p y miR-128-3p con la edad.....	46
16.4 Correlación entre miR-21-5p y miR-128-3p con las escalas de función muscular y de actividad física.....	47
16.5 Correlación entre miR-21-5p y miR-128-3p con los marcadores enzimáticos de daño muscular.....	50
16.6 Análisis <i>in silico</i> de los genes blanco de miR-21-5p y miR-128-3p.....	52
16.7 Correlación de TGF- $\beta$ con miR-21-5p, miR-128-3p y la edad.....	64
16.8 Comparación de los parámetros enzimáticos de daño muscular y de los parámetros metabólicos entre los pacientes ambulatorios y no ambulatorios con DMD.....	65
16.9 Análisis de la expresión de MMP9 en pacientes con DMD.....	66
17 DISCUSIÓN.....	68
18 CONCLUSIONES.....	76
19 REFERENCIAS.....	77
20 ANEXOS.....	84
20.1 Sistema de clasificación en la escala de Vignos.....	84
20.2 Sistema de clasificación en la escala de Brooke.....	85
20.3 Sistema de clasificación de la función motora gruesa (GMFCS, Gross Motor Function Classification Sytem).....	86



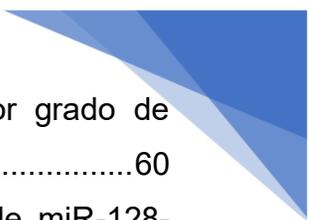
20.4 Escala Medical Research Council.....	87
20.5 Cronograma de actividades.....	88
20.6 Formato de recolección de datos.....	89
20.7 Carta de consentimiento informado.....	90

## 2 ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Descripción de las variables.....	35
<b>Tabla 2.</b> Lista de secuencias de miRNAs maduros.....	40
<b>Tabla 3.</b> Comparación de la edad, los parámetros antropométricos, parámetros de daño muscular, fuerza muscular y actividad física de pacientes ambulatorios y no ambulatorios con DMD.....	44
<b>Tabla 4.</b> Genes blanco regulados por miR-21-5p y las vías con mayor grado de enriquecimiento de estos.....	53
<b>Tabla 5.</b> Genes blanco regulados por miR-128-3p y las vías con mayor grado de enriquecimiento de estos. ....	59
<b>Tabla 6.</b> Comparación de los parámetros de daño muscular, función muscular y actividad física de pacientes ambulatorios y no ambulatorios con DMD.....	66

### 3 ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Organización del complejo proteico asociado a la distrofina.....	14
<b>Figura 2.</b> Mecanismos involucrados en la fisiopatología de la DMD. ....	17
<b>Figura 3.</b> Vía de regulación de la fibrosis mediante TGF- $\beta$ 1.....	19
<b>Figura 4.</b> Procesamiento y maduración de los miRNAs.....	22
<b>Figura 5.</b> Vía regulatoria TGF- $\beta$ con miR-21-5p.....	26
<b>Figura 6.</b> Esquema sobre el papel de miR-21 en la fibrosis en DMD.....	29
<b>Figura 7. I</b> Comparación de la expresión de los miRNAs entre los pacientes con DMD en estado ambulatorio y no ambulatorio. ....	45
<b>Figura 8.</b> Correlación entre la expresión de miR-21-5p y miR-128-3p con la edad de los pacientes con DMD.....	46
<b>Figura 9.</b> Correlaciones entre las escalas de la fuerza muscular, evaluadas con la escala de Vignos, la escala de Brooke, la escala de GMFCS y la escala de porcentaje de la fuerza MRC; además de la escala de actividad física PAQ-C con el logaritmo de la expresión de miR-21-5p.....	48
<b>Figura 10.</b> Correlaciones entre las escalas de la fuerza muscular, evaluadas con la escala de Vignos, la escala de Brooke, la escala de GMFCS y la escala de porcentaje de la fuerza MRC; además de la escala de actividad física PAQ-C con el logaritmo de la expresión de miR-128-3p.....	49
<b>Figura 11.</b> Correlación entre la expresión de miR-21-5p y los niveles séricos de CK (A), AST (B) y ALT (C) en pacientes con DMD.....	50
<b>Figura 12.</b> Correlación entre la expresión de miR-128-3p y los niveles séricos de CK (A), AST (B) y ALT (C) en pacientes con DMD.....	51
<b>Figura 13.</b> Diagrama de Venn que muestra los genes blancos de miR-21-5p, miR-128-3p.....	52
<b>Figura 14.</b> Genes blanco regulados por miR-21-5p y las vías con mayor grado de enriquecimiento de estos .....	53
<b>Figura 15.</b> Gráfico de barras de términos enriquecidos de los 30 mRNA de miR-21-5p.....	55
<b>Figura 16.</b> Gráfica que muestra la relación entre las vías enriquecidas de los genes blanco regulados por miR-21-5p.....	56
<b>Figura 17.</b> Gráfico que muestra la interacción entre las proteínas codificadas por los genes blanco cuya expresión es regulada por miR-21-5p.....	58



<b>Figura 18.</b> Genes blanco regulados por miR-128-3p y las vías con mayor grado de enriquecimiento de estos .....	60
<b>Figura 19.</b> Gráfico de barras de términos enriquecidos de los 30 mRNA de miR-128-3p.....	61
<b>Figura 20.</b> Gráfica que muestra la relación entre las vías enriquecidas de los genes blanco regulados por miR-128-3p.....	62
<b>Figura 21.</b> Gráfico que muestra la interacción entre las proteínas codificadas por los genes blanco cuya expresión es regulada por miR-128-3p.....	63
<b>Figura 22.</b> Correlación entre los niveles séricos de TGF- $\beta$ y la expresión de miR-21-5p (A) y miR-128-3p (B) en pacientes con DMD.....	64
<b>Figura 23.</b> Correlación entre los niveles séricos de TGF- $\beta$ con la edad de pacientes con DMD. ....	65
<b>Figura 24.</b> Comparación de la expresión de los niveles séricos de MMP9 entre los pacientes con DMD en estado ambulatorio y no ambulatorios.....	67
<b>Figura 25.</b> Correlación entre los niveles de expresión de MMP9 con la edad de pacientes con DMD.....	67
<b>Figura 26.</b> Esquema sobre las vías TGF- $\beta$ y BMP.....	73

## 4 ABREVIATURAS

**3'UTR:** Región 3' no traducida.

**5'UTR:** Región 5' no traducida.

**ABL:** Cepa Abelson de Virus de Leucemia Murina.

**aCGH:** Hibridación de arreglos de genomas comparativos.

**AKT:** Cinasa serina / treonina.

**ALT:** Alanina aminotransferasa.

**AST:** Aspartato aminotransferasa.

**BMP:** Proteína morfogénica ósea.

**CCL18:** Ligando 18 del motivo CC.

**cDNA:** DNA complementario.

**CDC:** Centers for disease control and prevention.

**CK:** Creatinina cinasa.

**DAPC:** Complejo proteico asociado a distrofina.

**DAVID:** the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery.

**dL:** Decilitro.

**DMB:** Distrofia muscular de Becker.

**DMD:** Distrofia muscular de Duchenne.

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico.

**GO:** Ontología génica.

**GDP:** Guanosina difosfato

**GTP:** Guanosina trifosfato

**Índice HOMA-IR:** Modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina.

**IMF:** Intensidad media de fluorescencia.

**IMSS:** Instituto Mexicano del Seguro Social.

**IMC:** Índice de masa corporal.

**KEGG:** Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

**MAPK:** Proteína cinasa activada mitogénica.

**Mb:** Mega base.

**MEC:** Matriz extracelular.

**mg:** Miligramos.

**miomiRNAs:** miRNA con alta expresión en músculo.

**miR:** MicroRNA.



**miRNAs:** MicroRNAs.

**MLPA:** Amplificación de sondas múltiples ligadas.

**MMP:** Metaloproteinasa.

**MRC:** Medical Research Council.

**mRNA:** RNA mensajero.

**ncRNA:** RNA no codificante.

**NT:** Nucleótidos.

**OMIM:** Online Mendelian Inheritance in Man.

**PA:** Activador de plasminógeno.

**PAI1:** Inhibidor del activador de plasminógeno 1.

**P4HA1:** procolágeno-prolina, 2-oxoglutarato 4-dioxigenasa, subunidad alfa isoforma 1.

**PAR1B:** Cinasa Reguladora de Afinidad MAP/ Microtúbulo.

**PAQ-C:** Cuestionario de actividad física en niños.

**PCR:** Reacción en cadena de polimerasa.

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

**Pre-miRNAs:** miRNAs precursores.

**Pri-miRNAs:** miRNAs primarios.

**PTEN:** Homólogo de fosfatasa y tensina.

**PTGS2:** Sintetasa de endoperóxido-prostaglandinas 2.

**RISC:** Complejo de silenciamiento inducido por RNA.

**RNA:** Ácido ribonucleico.

**RT-PCR:** PCR por transcriptasa reversa.

**SCFMG:** Sistema de Clasificación de la Función Motora Gruesa.

**SMAD:** Mothers Against Decapentaplegic Drosophila.

**SP1:** Proteína de especificidad 1.

**TIMP:** Inhibidor tisular de metaloproteinasas.

**TGF- $\beta$ 1:** Factor de crecimiento transformante beta 1.

**TGF- $\beta$ R1:** Receptor del factor de crecimiento transformante beta 1.

**UIMN:** Unidad de Investigación Médica en Nutrición.

**UMAE:** Unidad Médica de Alta Especialidad.

**VLDL:** Lipoproteína de muy baja densidad.

**$\alpha$ -SAM:** Molécula de adhesión específico de adipocitos.

**$\mu$ U:** Micro unidades.

## 5 RESUMEN

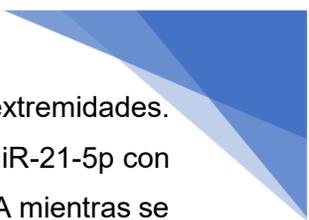
### TÍTULO: "PERFIL DE EXPRESIÓN A NIVEL SÉRICO DE LOS MIRNAS miR-21-5p Y miR-128-3p EN PACIENTES CON DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE"

**Marco teórico y antecedentes:** Las distrofinopatías con una incidencia aproximadamente de 1 por cada 5000 varones recién nacidos vivos constituyen un espectro de patologías musculares ligadas al cromosoma X, entre ellas se encuentra la distrofia muscular de Duchenne. Las manifestaciones clínicas pueden presentarse desde etapas tempranas de la vida, y los niños afectados suelen ser dependiente de una silla de ruedas a los 12 años. Esta entidad está caracterizada por una degeneración muscular en la cual se aprecia una sustitución del tejido muscular por tejido adiposo y fibroso. Dicho proceso de fibrosis está regulado a través de varias vías moleculares con el involucro de pequeñas moléculas de microRNAs (miRNAs) las cuales son controladores de la expresión génica. Por lo anterior consideramos de interés científico el conocer el papel de algunos miRNAs como reguladores del proceso fibrótico.

**Objetivo:** En Pacientes de 3 a 17 años con diagnóstico clínico y molecular de distrofia muscular de Duchenne captados en la Unidad de Investigación Médica en Nutrición de la UMAE Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI describir la expresión de miR-21-5p y miR-128-3p obtenidos de suero

**Material y métodos:** Se realizó un estudio observacional, transversal, retrospectivo y descriptivo. Se obtuvieron los datos de las variables de interés para la interpretación del perfil de expresión circulante de miR-21-5p y miR-128-3p en pacientes distrofia muscular de Duchenne con marcha independiente y con ausencia de la misma, además se realizó un análisis *in silico* para identificar a los blancos asociados de dichos miRNAs con la misma información obtenida de la base de datos previamente realizada en el estudio anterior el cual se titula "MiRNAs circulantes de estrés oxidativo y su asociación con el daño muscular en la distrofia muscular de Duchenne" cuyo número de registro ante la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS R-2018-785-089.

**Resultados:** Con la finalidad de responder al objetivo específico primario de esta investigación, se comparó la expresión del miR-21-5p y el miR-128-3p entre los pacientes ambulatorio ( $n=23$ ) y no ambulatorios ( $n=6$ ) con DMD. Se observó que el nivel sérico de la expresión de miR-21-5p fue menor en el grupo de pacientes no ambulatorios en comparación con los pacientes ambulatorios. Así mismo, se identificó que el nivel de expresión sérico de miR-128-3p mostró una disminución en los pacientes no ambulatorios en comparación con aquellos ambulatorios. De igual manera se identificó una correlación negativa de la expresión de miR-21-5p ( $r = - 0.469$ ) y de miR-128-3p ( $r = - 0.435$ ) con la edad de los pacientes. A su vez se identificó que miR-21-5p muestra una correlación inversa con la escala de Vignos, la cual evalúa a la función muscular de las extremidades inferiores ( $r = - 0.392$ ) identificándose una asociación entre menores niveles de expresión del miRNA con un puntaje



mayor en dicha escala, el cual representa una pérdida de fuerza muscular en dichas extremidades. En el mismo sentido, se identificó una correlación entre los niveles de expresión de miR-21-5p con el porcentaje de la fuerza muscular MRC, expresando mayores niveles de dicho miRNA mientras se presentaba un mayor porcentaje de la fuerza ( $r = 0.416$ ). El análisis de correlación entre las escalas de función muscular con la expresión de miR-128-3p, no mostró alguna correlación entre ambas variables. Con el objetivo de identificar a los genes blanco de miR-21-5p y de miR-128-3p se realizó un análisis *in silico*. Se identificó que miR-21-5p tiene como blanco a 30 genes que coincidieron en 3 plataformas utilizadas para este análisis. De igual manera se detalló que un total de 26 genes coincidieron en 3 plataformas como potenciales blancos de miR-128-3p. A su vez se identificó que existen 6 genes en común que son regulados tanto por miR-21-5p como por miR-128-3p. Para identificar cuáles son las vías en las que participan los genes blanco de miR-21-5p se introdujo una lista con los 30 genes regulados por miR-21-5p en el software de ShinyGO v 0.76, donde entre otras vías se encuentra la regulación negativa de la vía de la señalización BMP, siendo esta un grupo de moléculas de señalización que pertenece a la superfamilia de proteínas de TGF- $\beta$ . No existió asociación entre la expresión de miR-21-5p y miR-128-3p con los niveles séricos de TGF-  $\beta$

**Conclusiones:** Los niveles séricos de miR-21-5p y miR-128-3p son menores en el suero de los pacientes con distrofia muscular de Duchenne que han perdido la capacidad de marcha independiente a comparación de aquellos que aún preservan la marcha independiente. A su vez los niveles séricos de miR-21-5p y miR-128-3p disminuyen con la edad en los pacientes con distrofia muscular de Duchenne independientemente de su estado ambulatorio. La expresión de miR-21-5p circulante se encuentra elevada en aquellos pacientes con mayor fuerza muscular, asociándose con la escala de Vignos y con el porcentaje del MRC. La elevación de los marcadores enzimáticos de daño muscular CK, AST y ALT se correlacionan con el incremento a nivel sérico de miR-21-5p y miR-128-3p. miR-21-5p y miR-128-3p comparten como blanco en común a BMPR2, molécula que participa en la vía de señalización de BMP, la cual comparte con la vía de TGF- $\beta$  moléculas en común río abajo en su señalización. miR-21-5p tiene como blanco a SMAD7, molécula inhibidora de la vía TGF- $\beta$ . No se identificó asociación entre los niveles séricos de TGF- $\beta$  con miR-21-5p y miR-128-3p.

## 6 MARCO TEÓRICO

### 6.1 Etiología y epidemiología de la Distrofia Muscular de Duchenne

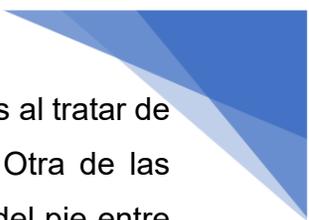
La distrofia muscular de Duchenne (DMD, OMIM #310200) es una distrofia muscular congénita que afecta aproximadamente a 1 de cada 5,000 recién nacidos vivos y es causada por la ausencia o disminución de la proteína distrofina (1). La DMD cursa con un modelo de herencia ligado al cromosoma X y tiene su origen en variantes patogénicas en el gen *DMD*, que se encuentra localizado en el Xp21 y que codifica para la distrofina cuya función principal es mantener la estabilidad del complejo de proteínas asociadas a la distrofina (DAPC), la membrana plasmática y la MEC (Matriz extracelular) (2).

El gen *DMD* tiene un tamaño que supera las 2.5 megabases (Mb) y se encuentra organizado en 79 exones. Las mutaciones que afectan al marco de lectura de este gen provocan que se genere una cadena de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) inestable ocasionando una expresión deficiente de la proteína distrofina (2).

Se han descrito diversas mutaciones en el gen *DMD*, originando un espectro fenotípico de DMD, de distrofia muscular de Becker (DMB) o de cardiopatía dilatada. Del 60 al 70% de las mutaciones en pacientes con DMD corresponden a eliminaciones, del 5 al 15% a duplicaciones y el 20% restante son mutaciones puntuales o pequeñas inserciones o deleciones (2). Las deleciones y duplicaciones en la DMD se agrupan en regiones de alta incidencia de mutaciones conocidas como *hot spots*. El *hot spot mayor* se encuentra entre los exones 45 y 55, representando el 47% de todas las variantes patogénicas presentes en el gen *DMD*, mientras que el *hot spot menor* comprende entre los exones 3 al 9, representando el 7% (3).

### 6.2 Características clínicas

Los primeros síntomas se manifiestan entre los 2 y los 5 años de edad (4,5). El retraso del desarrollo motor grueso es una de las principales características en los pacientes con DMD, manifestándose como un retraso en la adquisición de la marcha y dificultad para levantarse



del suelo. El signo de Gowers, en el cual el paciente se apoya sobre sus rodillas al tratar de incorporarse del suelo, es visto con frecuencia en pacientes con DMD (5). Otra de las características que se puede presentar es la marcha en puntas de los dedos del pie entre los 3 y 4 años de edad, haciéndose evidente a su vez la pseudohipertrofia a nivel de los músculos gastrocnemios (1).

La afección muscular tiene un periodo de estabilización, también llamado meseta entre los 3 y 6 años, la cual es seguida de una etapa de deterioro acelerado que se presenta entre los 6 y 8 años, en la cual los individuos afectados pierden la habilidad de subir escaleras y levantarse desde el suelo, pudiendo llegar a presentar contracturas musculares, sobre todo en extremidades inferiores, además de hacerse evidente la escoliosis y la lordosis. La mayoría de los pacientes afectados por DMD pierden la habilidad de la marcha independiente entre los 12 o 13 años de edad, volviéndose dependientes del uso de silla de ruedas (4).

La concentración de creatina cinasa (CK) sérica aumenta sustancialmente desde el momento del nacimiento, alcanzando niveles mayores a 20,000 U/L. Además hay un aumento de la concentración de aspartato transaminasa (AST) y de alanina transaminasa (ALT) debido al daño muscular y a la alta expresión de estas enzimas en músculo esquelético (6).

La cardiomiopatía progresiva es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la DMD, incrementándose el riesgo de presentar las mismas por lo general después de los 18 años de edad. Por otro lado, hasta un 30% de los pacientes con DMD pueden presentar una afectación cognitiva, siendo el retraso en la adquisición del habla una de las características más comunes. Con una terapia multidisciplinaria, los pacientes afectados por la DMD pueden sobrevivir hasta la quinta década de la vida gracias al desarrollo de guías para el cuidado y el tratamiento de la disfunción cardiorrespiratoria (4,8).

### 6.3 Diagnóstico molecular

El diagnóstico clínico de la DMD debe ser confirmado por una prueba molecular que muestre alguna mutación del gen *DMD*. Entre las pruebas moleculares están la reacción multiplex en cadena de polimerasa (mPCR, por sus siglas en inglés), la Amplificación Múltiple de Sondas Ligadas (MLPA, por sus siglas en inglés), la hibridación de arreglos de genomas comparativos (aCGH, por sus siglas en inglés) o bien, la secuenciación por metodología Sanger o secuenciación de nueva generación de los 79 exones con la finalidad de identificar variantes puntuales (2).

### 6.4 Tratamiento

A pesar de que actualmente no existe una cura para la DMD; el abordaje multidisciplinario médico, quirúrgico y de rehabilitación pueden impactar la historia natural de la enfermedad mejorando la calidad de vida y la sobrevida de los pacientes (7).

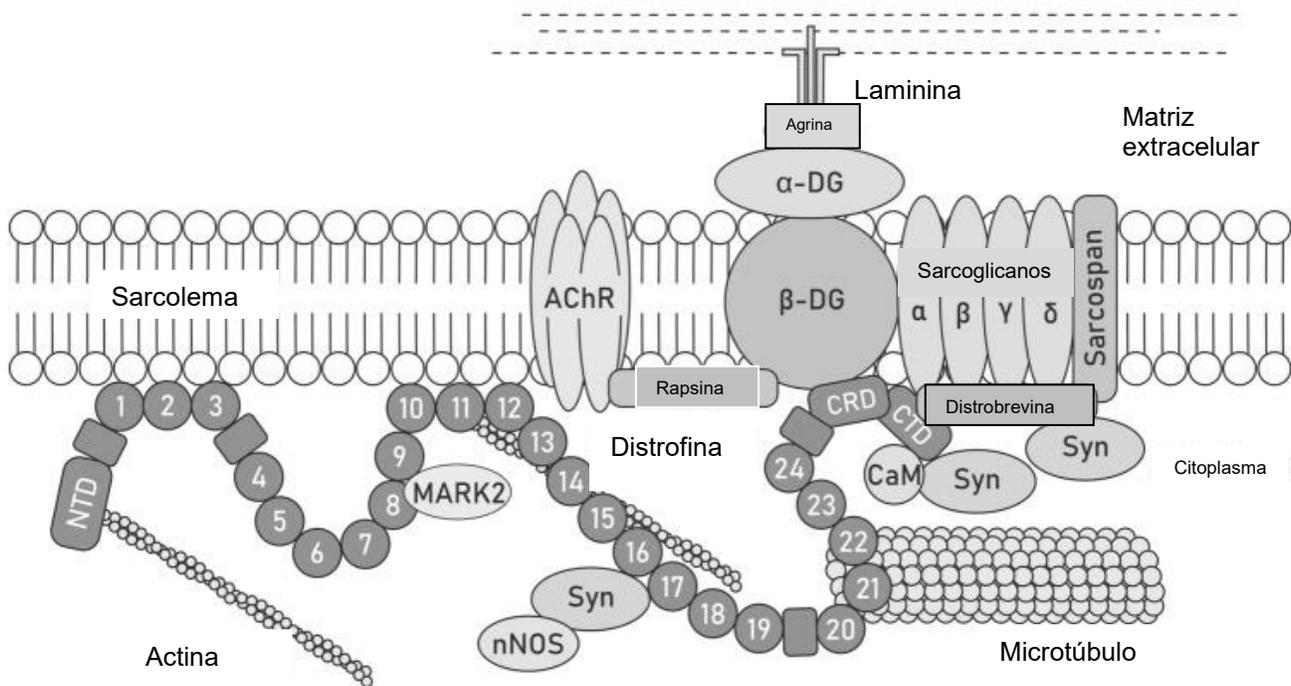
Las guías recomiendan el uso de glucocorticoides a largo plazo, en particular la prednisolona o el deflazacort en aquellos varones cuyo desarrollo motor se detiene o empieza a existir un declive del mismo (8). La edad de inicio de la terapéutica con esteroides varía entre pacientes, iniciándose por lo general entre los 4 y 5 años de edad. Ambos medicamentos han demostrado evidencia de mejoría en la fuerza muscular y retrasando la pérdida de la ambulación independiente, además de retrasar el inicio de la cardiomiopatía (2).

### 6.5 Distrofina

La distrofina consta de un dominio amino terminal, un dominio central que se compone de 24 repetidos similares a la espectrina, un dominio rico en cisteína y un dominio carboxilo terminal, siendo cada uno de estos dominios sitios de interacción con distintas proteínas.

En el músculo estriado la distrofina interactúa con el citoesqueleto, canales proteicos, proteínas de señalización y de andamiaje. La distrofina se localiza por debajo de la membrana celular de las células musculares, encargándose de unir a la actina del citoesqueleto de estas células con proteínas contráctiles del citoplasma. Además, la distrofina une a las proteínas previamente mencionadas con la laminina y otras proteínas de la matriz extracelular, entre ellas las colágenas; esto con la finalidad de transferir la fuerza muscular contráctil a la matriz extracelular y así llevar a cabo el movimiento del sistema musculoesquelético (9).

La fuerza muscular que se genera a través de ciclos repetitivos de contracción y relajación de la sarcómera requiere un manejo eficiente del estrés mecánico por parte del sarcolema. En el músculo sano dicha integridad es lograda vía la unión del citoesqueleto con el sarcolema y la matriz extracelular a través del complejo proteico asociado a la distrofina (DAPC) (2) (Fig. 1).



**Fig. 1** | Organización del complejo proteico asociado a la distrofina (DAPC, por sus siglas en inglés). AChR, Receptores de acetilcolina; CRD, Dominio rico en cisteína; CTD, Dominio C terminal; DG, Distroglicano; nNOS, Sintasa de óxido nítrico neuronal; NTD, Dominio amino terminal; Syn, Sintrofinas. Círculos centrales del 1 al 24 corresponden a repetidos similares a la espectrina. Los rectángulos dentro de la distrofina corresponden a los módulos de bisagra. Figura tomada y modificada de Starosta, 2021 (10).

## 6.6 Fisiopatología

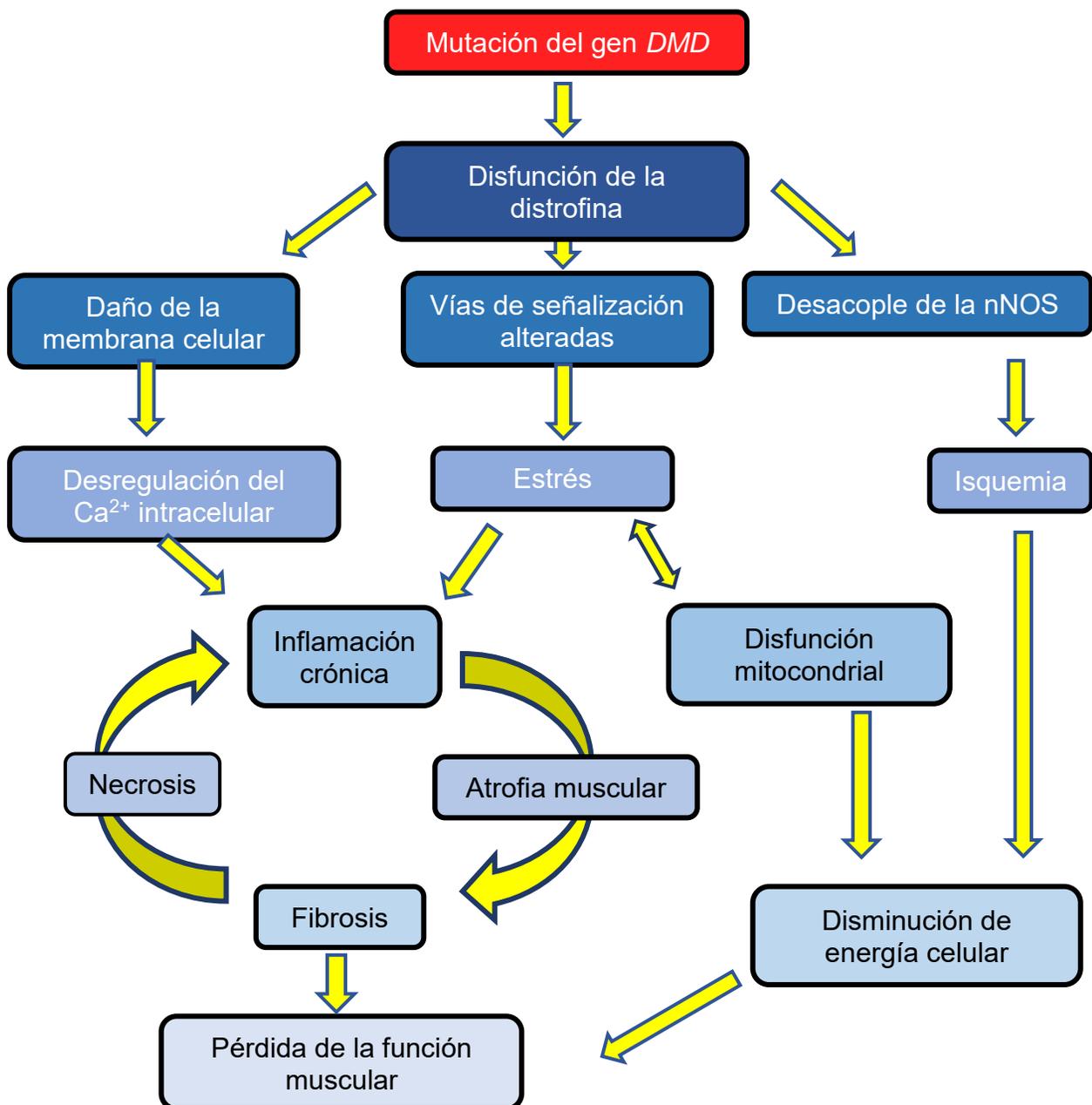
Como resultado de la ausencia de distrofina, las miofibras se vuelven frágiles y susceptibles al estrés mecánico conduciendo a su necrosis. Además, el déficit de la distrofina resulta en un desmontaje del DAPC, existiendo una pérdida de la interacción entre la F-actina y la matriz extracelular (2).

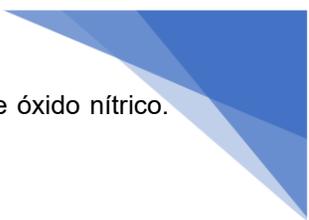
La mionecrosis favorece la aparición de inflamación crónica además de estrés oxidativo conduciendo a la miogénesis regenerativa; sin embargo, la mionecrosis supera al proceso regenerativo, por lo cual, la inflamación y el estrés oxidativo continúan hasta conducir a fibrosis, que consiste en la sustitución del tejido muscular por tejido fibrótico. Este proceso fibrótico afecta al potencial de regeneración muscular en individuos con DMD, lo que conlleva a una pérdida grave del tejido muscular acentuando la generación de tejido fibrótico (9).

Por otro lado, el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular también juega un papel importante en la fisiopatología de la DMD. La sobrecarga de dicho catión en las células musculares es el resultado de una entrada anormal de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales iónicos y de micro rupturas formadas en el sarcolema (11). Dicha sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  induce una disfunción mitocondrial, lo que a su vez contribuye a la muerte celular ya que se activan vías degradativas como la vía proteasa calpaína (12).

El desmontaje del DAPC induce daño muscular, ya sea a través de fuga sarcolémica, de lesión isquémica, de estrés oxidativo y/o una activación aberrante de proteasa calpaína dependiente de calcio, ocasionando la aparición de organelos defectuosos y de componentes celulares alterados en el músculo distrófico. Normalmente los organelos defectuosos y los agregados proteicos formados intracelularmente son eliminados por el proceso de la autofagia (16). Sin embargo, dicho proceso se encuentra reprimido en la DMD (17). Debido a esto existe una acumulación disfuncional de proteínas y organelos defectuosos, favoreciendo a la degeneración muscular (18).

Las células musculares dañadas son reconocidas y removidas por células inflamatorias. En los pacientes jóvenes con DMD (entre 2 y 8 años), estas células consisten principalmente en macrófagos y en células T (13). En la fase temprana de la enfermedad, macrófagos proinflamatorios M1 promueven la lisis de las células musculares a través de la producción de especies reactivas de oxígeno. Los macrófagos M1 pueden ser reemplazados por macrófagos M2, los cuales tienen actividad antiinflamatoria y promueven el proceso de fibrosis (14). Este proceso está mediado por la sobreexpresión del factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ ), ocurriendo en un ambiente crónico inflamatorio del músculo esquelético. El resto de las principales vías afectadas en DMD se muestran en la **Fig.2**.





**Fig. 2 |** Mecanismos involucrados en la fisiopatología de la DMD. nNOS, Sintasa neuronal de óxido nítrico. Imagen tomada y modificada de Yao, 2021.

## 6.7 Proceso fibrótico en DMD

La fibrosis se caracteriza por una síntesis excesiva y descontrolada de proteínas de la matriz extracelular (MEC) incluyendo a las colágenas y a la fibronectina, las cuales pueden afectar al correcto funcionamiento tisular. La fibrosis es una característica prominente en el músculo esquelético en etapas avanzadas de pacientes con DMD. La activación de los fibroblastos, principales reguladores de la fibrosis, así como la síntesis de proteínas de la matriz extracelular son promovidas por citocinas fibrogénicas como TGF-  $\beta$ 1 (15). Existen múltiples vías de señalización que modulan la progresión fibrótica pero la que se ha descrito en mayor medida a nivel de músculo esquelético es TGF-  $\beta$ 1 (16).

## 6.8 Rol de TGF- $\beta$ 1 en el proceso fibrótico de la DMD

La familia de proteínas TGF-  $\beta$  corresponde a citocinas que son secretadas por distintos tipos celulares y controlan procesos como el crecimiento y la diferenciación celular (17).

Los fibroblastos son células maestras mediadoras de la fibrosis que se encuentran en un proceso de activación continua en la DMD, favoreciendo una deposición masiva de proteínas de la matriz extracelular, entre ellas fibras de colágena (18). De igual manera se ha descrito que los fibroblastos pueden adquirir su conformación activa por medio de la molécula TGF-  $\beta$ 1, la cual es una citocina autocrina y paracrina secretada en parte por macrófagos M2, proceso visto durante la inflamación crónica (19).

Diversos estudios han demostrado que TGF-  $\beta$ 1 incrementa significativamente en los músculos de los pacientes con DMD cuando se le compara con controles sanos; y la inhibición de esta molécula se ha sugerido como un potencial manejo terapéutico para



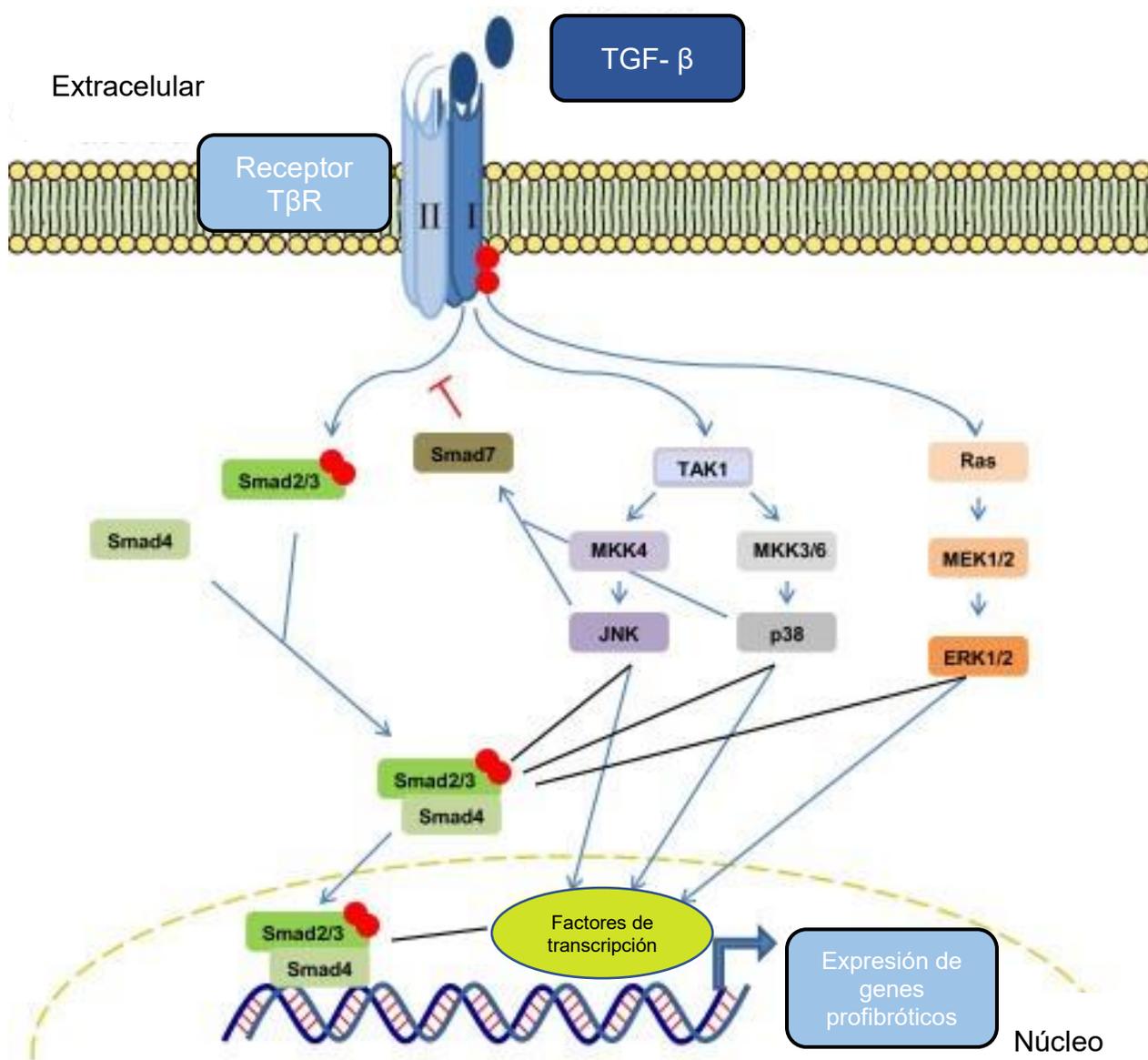
reducir, o al menos retrasar la aparición de fibrosis en DMD. Sin embargo, en la actualidad, no existen medicamentos que tengan como blanco a TGF- $\beta$ 1 (20).

TGF- $\beta$ 1 regula el proceso de fibrosis a través de la señalización mediante los receptores transmembranales cinasa serina/treonina de los cuales existen 3 tipos. Los receptores tipo I (TGF $\beta$ RI) y el tipo II (TGF $\beta$ RII) son receptores de señalización que forman heterodímeros, mientras que el receptor tipo III (TGF $\beta$ RIII) es un proteoglicano que regula el acceso de TGF- $\beta$ 1 a los receptores de señalización. TGF- $\beta$ 1 se une directamente a la subunidad TGF $\beta$ RII permitiendo que la misma active a TGF $\beta$ RI a través de un proceso de fosforilación. TGF $\beta$ RI fosforila subsecuentemente a diferentes proteínas SMAD llevando a una translocación de complejos SMAD al interior del núcleo. Dentro del núcleo, el complejo SMAD se une a secuencias específicas de DNA para regular la transcripción de varios genes objetivo, dentro de los cuales se encuentran genes profibróticos. Por lo tanto TGF- $\beta$ 1 incrementa la deposición de proteínas de matriz extracelular al estimular la síntesis de las mismas (15).

En fibroblastos bajo condiciones fisiológicas, la activación de TGF $\beta$ RII fosforila a los factores de transcripción SMAD2 y SMAD3. Estos factores de transcripción entonces se unen a SMAD4 para formar un complejo que llega al interior del núcleo para activar la transcripción de genes profibróticos. Alternativamente TGF- $\beta$  también posee un efecto de señalización sobre otros factores de transcripción como los pertenecientes a la vía RAS/MEK/ERK, la vía p38 MAPK o la vía C-ABL. El proceso de señalización a través de estas vías alternativas también es capaz de modificar la expresión génica mediada por la interacción con promotores de diferentes genes (21).

ERK, una cinasa regulada por señales extracelulares suele favorecer la expresión de la colágena tipo I, mientras que otras moléculas de señalización como lo son FAK, JNK y TAK1 son necesarias para diversos procesos como la contracción de la matriz extracelular y diferenciación de miofibroblastos. TGF- $\beta$  puede a su vez disminuir la producción de enzimas que degradan a la matriz extracelular como lo son las metaloproteinasas de matriz (MMPs) y simultáneamente, incrementar la producción de proteínas como inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) y del inhibidor del activador tisular de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) el cual inhibe a enzimas degradadoras de la matriz extracelular (21).

Además de las moléculas como TGF-  $\beta$  que promueven el depósito de matriz extracelular, la reparación muscular también requiere factores que regulen la degradación proteolítica de la misma matriz; por ejemplo, para facilitar la migración de células satélite y de mioblastos, para remover el andamiaje colocado durante la regeneración y para permitir el crecimiento de las fibras musculares. Un fallo en estos procesos conlleva a una deposición de matriz extracelular, fibrosis y pérdida de función muscular. Entre estos factores que regulan la remodelación de la matriz extracelular se encuentran proteasas serina de la activación del sistema de plasminógeno (PA), MMPs y sus inhibidores, PAI-1 y los TIMPs, respectivamente (22). Las vías descritas se ejemplifican en la **Fig. 3**.



**Fig. 3** | Vía de regulación de la fibrosis mediante TGF- $\beta$ 1. Figura tomada y modificada de Burks, 2011.

## 6.9 Papel de las MMPs en el proceso fibrótico en DMD

Las MMPs son proteasas dependientes de calcio que tienen un importante rol en la remodelación de la MEC, inflamación, fibrosis, además de la activación de distintas citocinas, moléculas de adhesión celular y factores de crecimiento tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. La MMP-2 y la MMP-9 son 2 de las principales MMPs, las cuales tienen como función degradar al colágeno tipo IV, el cual es una parte integral de la membrana basal (23).

Una presencia persistente de MMP-9 contribuye a un proceso inflamatorio y de destrucción tisular, el cual se ha visto en diferentes entidades patológicas. El aumento de la expresión de MMP-9 puede ser secundario a numerosos agentes como lo son las citocinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión célula-MEC. Además de su participación en la degradación de la colágena tipo IV, la MMP-9 participa en el proceso de activación de TGF- $\beta$  siendo este uno de los probables mecanismos por los cuales MMP-9 promueve la fibrosis (23).

La expresión de genes y la activación de MMPs se encuentran desreguladas en pacientes con DMD (24). Por ejemplo, se ha descrito un incremento progresivo de los niveles de MMP-9 en el suero de pacientes afectados por DMD. Se ha reportado que los niveles séricos de MMP-1 y TIMP1 se encuentran significativamente elevados en pacientes DMD en comparación con individuos sanos (2.9 y 31.2 años de edad). En individuos con DMD los niveles de MMP-9 se han encontrado en concentraciones más elevadas en pacientes de mayor edad (no ambulatorios), comparados con pacientes ambulatorios, sugiriendo que MMP-9 está relacionado con la progresión de la enfermedad en DMD (25).

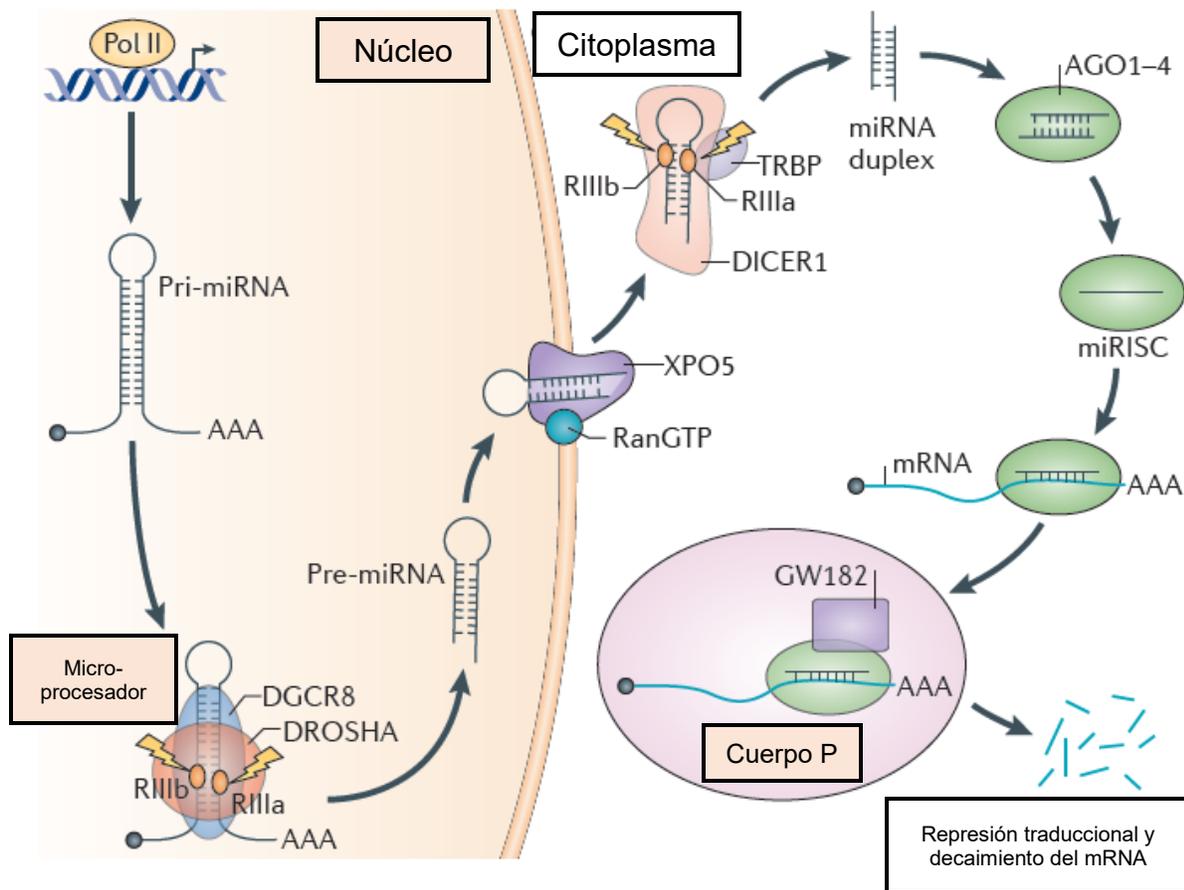
## 6.10 MicroRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs no codificantes que tienen un rol importante en la regulación de la expresión génica. Los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II para generar a los pri-miRNAs, que posteriormente son escindidos por la nucleasa DROSHA para generar pre-miRNAs. Los pre-miRNAs son transportado hacia el citoplasma para continuar con su procesamiento a través de DICER para formar los miRNAs maduros (26).

En la mayoría de los casos, los miRNAs interactúan con la región no traducida 3' (3'UTR, por sus siglas en inglés) de las cadenas de RNA mensajeros (mRNA) para inducir la degradación del mRNA o la represión de la traducción de este. La interacción de los miRNAs con sus genes blanco es dinámica y depende de muchos factores como lo son la localización subcelular de los miRNAs, la abundancia de estos, así como la de sus mRNAs blancos, además de la afinidad de la interacción miRNA-mRNA (34).

Los transcritos de los miRNAs maduros funcionan a través del ensamblaje de un complejo de proteínas circundantes conocido como el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Utilizando a la secuencia del miRNA como guía, RISC es capaz de unirse a una región complementaria en la región 3'UTR del mRNA blanco, lo que genera el silenciamiento de expresión génica ya sea a través de la represión traduccional o por la degradación del mRNA (27) (**Fig. 4**).

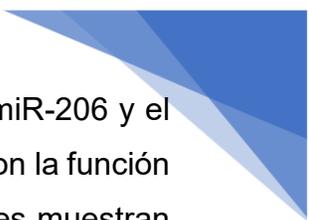
Los miRNAs pueden ser liberados a los fluidos extracelulares y ser transportados hacia células blanco vía vesículas como lo pueden ser los exosomas, o a través de la unión a proteínas. Los miRNAs tienen una función extracelular como mensajeros químicos para mediar la comunicación célula-célula (28) y debido a la presencia de los miRNAs en fluidos extracelulares, se ha planteado su utilización como biomarcadores de diversas enfermedades (29).



**Fig. 4 I** Procesamiento y maduración de los miRNAs. Figura tomada y modificada de Lin, 2015 (30).

### 6.11 Perfil de miRNAs en DMD

En la miogénesis regenerativa la diferenciación, mantenimiento y reparación de músculo son procesos regulados por distintos miRNAs. Muchos de ellos son expresados de manera tejido específico, por ejemplo, en el tejido muscular. Entre los miRNAs del músculo se encuentran miR-1, miR-133a, miR-133b y miR-206, los cuales son esenciales en el desarrollo muscular y mantenimiento de este, por lo que también se denominan miomiRNAs. Estudios en modelos murinos de tejido muscular lesionado reveló que la administración de algunos miomiRNAs (miR-1, miR-133 y miR-206) era capaz de acelerar la regeneración muscular, prevenir fibrosis en el sitio de la lesión e incrementar la expresión de marcadores clásicos de miogénesis regenerativa (31).



Se ha observado una relación entre los niveles séricos de miR-1, miR-133 y miR-206 y el daño muscular en pacientes con DMD. Esta relación ha sido consistente sólo con la función muscular y no con la edad, al contrario de los niveles séricos de CK, los cuales muestran fluctuaciones causadas por edad y por el tratamiento esteroideo y por lo general no se relacionan a la gravedad de la enfermedad (32).

En un estudio realizado por Llano-Diez en el 2017 se demostró la utilidad de los miRNAs no sólo como biomarcadores para la detección temprana de la enfermedad, sino también como un biomarcador predictivo sobre el estado de lesión tisular en los pacientes. Este estudio reveló que miR-30c y miR-181a se encontraban en niveles más altos en sangre de pacientes con DMD con función motora preservada a comparación de la población en general. Este estudio fue consistente en que no se encontró ninguna relación con la edad del paciente (2 a 14 años de edad) o con el uso previo de corticoesteroides (33).

Otro estudio reportó que la expresión de miR-199a-5p, un miRNA que se ha relacionado en otras entidades con la presencia de fibrosis, se encontraba sobre expresado en exosomas cuyo origen eran fibroblastos de pacientes con DMD (34). A su vez un análisis de los patrones de expresión de miRNAs en muestras de pacientes con DMD reveló que miR-1, miR-31 y miR-133b se encuentran significativamente sobre expresados en pacientes que se encuentran en un régimen terapéutico diario con corticoesteroides. Ya que el uso de corticoesteroides en pacientes con DMD retrasa el deterioro muscular, se puede inferir que estos miRNAs pueden ser útiles para evaluar la cantidad de masa muscular restante en pacientes con DMD (35).

La información presentada indica que ciertos miRNAs se encuentran desregulados en circulación de pacientes con DMD. Demostrándose además que distintos grupos de miRNAs son suficientemente sensibles para detectar síntomas de DMD en etapas tempranas de la enfermedad y pueden ser útiles para detectar mejoría en la salud muscular.



Además de los miRNAs abordados anteriormente, este estudio se centra en el estudio de dos miRNAs en particular: el miR-21-5p y el miR-128-3p que se describen a continuación.

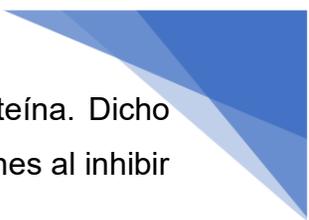
## 6.12 miR-21-5p

El miR-21-5p se encuentra codificado por el gen *MIR21*, el cual se encuentra localizado en 17q23.1 y se ha estudiado en distintas entidades patológicas como lo son enfermedades autoinmunes, cardiopatías y enfermedades oncológicas (36).

Se ha identificado un involucro directo de miR-21-5p en el proceso de fibrogénesis, por ejemplo, el proceso de curación de heridas. Diversos estudios señalan que los macrófagos afectan negativamente a el proceso de curación de heridas, demostrando que una depleción de macrófagos después de una reconstrucción de ligamento cruzado anterior mejora significativamente a las propiedades morfológicas y biomecánicas en la zona de unión tendón-hueso, probablemente debido a una disminución de la producción de TGF- $\beta$ , identificando el mismo estudio que la depleción de los macrófagos muestran una reducción de la proliferación celular y de la matriz extracelular. En dicho estudio se identificó que el miR-21-5p exosomal derivado de macrófagos, favorece la proliferación, migración y actividad fibrótica en células tendinosas vía SMAD7 (37).

Los exosomas que contienen en su interior a miR-21-5p pueden ser transportados al tendón lesionado e inducir a la formación de tejido fibrótico al regular al alza la actividad funcional de fibroblastos y de tenocitos en respuesta a la lesión tendinosa. En pacientes en los cuales han sufrido adhesión tendinosa se investigó el perfil de miRNAs en exosomas, y dentro de los reportados, miR-21-5p el cual se había reportado previamente para promover la fibrogénesis en músculo cardíaco y en riñón, mostró ser el más abundante (37).

De igual manera se identificó que la expresión de la colágena y de otros componentes de la matriz extracelular son regulados por el miR-21-5p, el cual a su vez está regulado al alza por TGF- $\beta$ 1 en diversas condiciones patogénicas. Además, se demostró en dicho estudio que la introducción de miR-21-5p favorece la sobreexpresión de COL I, COL III,  $\alpha$ -SMA y



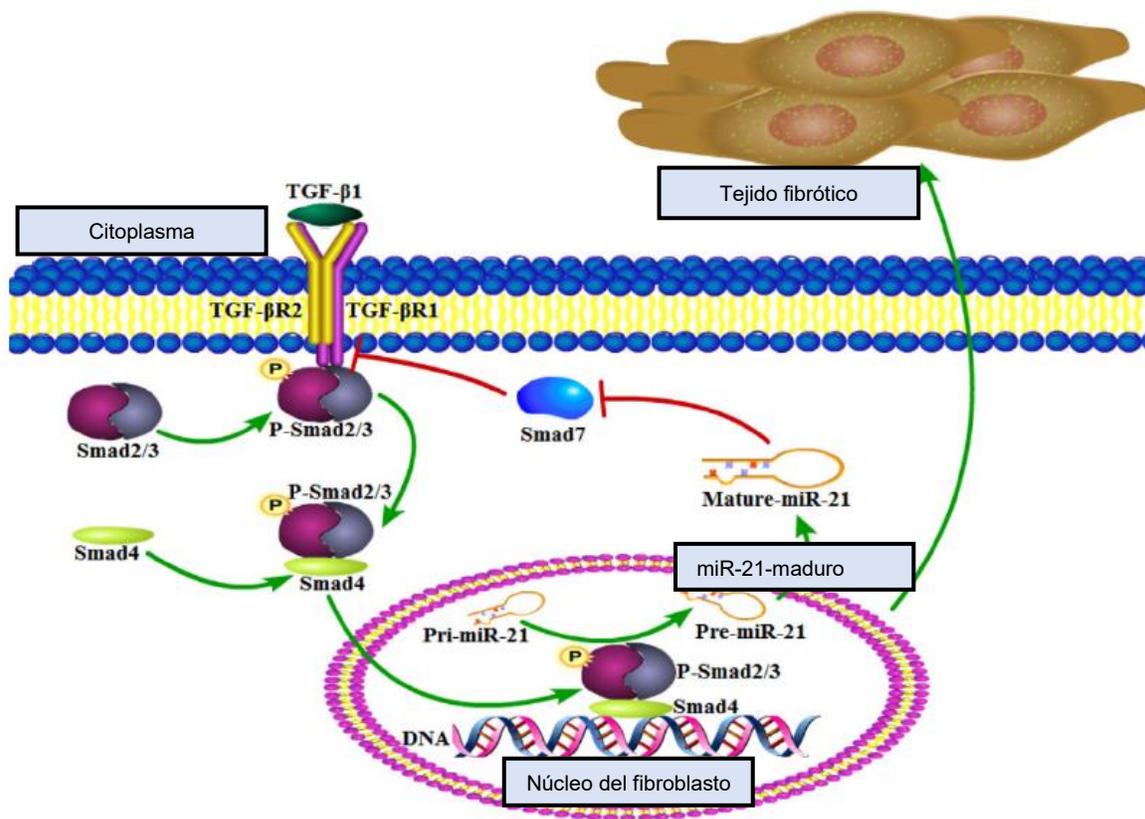
TGF- $\beta$ 1 en fibroblastos y en tenocitos, tanto a nivel de mRNA como de proteína. Dicho estudio concluye que miR-21-5p promueve la fibrogénesis de células en tendones al inhibir la expresión de SMAD7 (37).

En otro estudio se investiga el rol de miR-21 en el proceso de fibrosis de músculo distrófico y los componentes moleculares de la vía fibrótica dependiente de miR-21 en tejido muscular esquelético experimentalmente dañado, así como en músculo distrófico esquelético en modelo murino. En ambos casos, la expresión de miR-21, el cual es apenas detectable en músculo sano, incrementa concomitantemente con el proceso fibrótico de una manera dependiente de la edad.

Consistente con esto, la sobreexpresión de miR-21 en tejido muscular del modelo murino *mdx*, el cual es un modelo de DMD, provocó una anticipación del proceso fibrótico, así como un aumento en la gravedad de este. Al contrario, se demostró que la administración de un antagonista de miR-21 en ratones senescentes redujo en cierta medida al proceso fibrótico. Sobre el mecanismo propuesto por el cual se regula a el proceso fibrogénico a través de esta vía se comenta lo siguiente. La proteasa uPA genera la formación de plasmina activa, la cual activa a TGF- $\beta$  latente en su forma activa, la cual, a su vez, a través de la activación transcripcional de SMAD2, estimula la expresión de colágeno y TIMP-1 en fibroblastos, resultando dicho proceso en una alteración del metabolismo de la MEC y desarrollo de fibrosis y progresión de distrofia muscular (38).

En etapas tempranas de la enfermedad la expresión de PAI-1, un inhibidor de la proteasa uPA, se encuentra elevada causando una desaceleración en el proceso fibrótico. En etapas avanzadas de la enfermedad los niveles de PAI-1 disminuyen, lo que lleva a una hiperactivación de uPA, llevando a un aumento de la señalización TGF- $\beta$  y SMAD2, además de que existe un aumento de la vía de señalización AKT en fibroblastos, dependiente de miR-21 a través de una represión de PTEN fosfatasa, lo que lleva a una proliferación de fibroblastos, aumentando la fibrosis muscular (38).

En la **Fig. 5** se esquematiza la vía regulatoria entre TGF- $\beta$  con miR-21-5p descrita a nivel de fibroblastos. En otro estudio realizado en el 2020 en un modelo de fibroblastos se identificó que la estimulación de estos mediante TGF- $\beta$  favorecía la regulación de miR-21-5p al alza, así como de distintas proteínas profibróticas como los son  $\alpha$ -SAM, TIMP-1 y COL1A1. De igual manera en dicho estudio se identificó que miR-21-5p actúa en la vía profibrótica al inhibir a SMAD7, el cual es un inhibidor de TGF- $\beta$ . De igual manera se identificó que la inhibición de miR-21-5p revertía en cierta medida estos efectos (39).



**Fig. 5 |** Vía regulatoria TGF- $\beta$  con miR-21-5p. Las flechas verdes indican una regulación positiva mientras que las rojas a negativa. El círculo amarillo significa fosforilación. Tomada y modificada de Wang, 2016(40).

### 6.13 miR-128-3p

El miR-128-3p es un miRNA intrónico codificado por los genes MIR128-1 (2q21.3) y MIR128-2 (3p22.3) y tiene una participación crítica en la proliferación y diferenciación de células satélite musculares, preadipocitos y células endoteliales (41).

Dicho miRNA se ha identificado sobre expresado en el proceso de diferenciación de los mioblastos, aunque de igual manera inhibe la proliferación de los mismos. Esto a través de la vía de señalización de insulina, en específico siendo proteínas blanco de miR-128-3p IRS1, PI3K y AKT, las cuales suelen inhibir la diferenciación de mioblastos. Se ha identificado que el miR-128-3p puede estar regulado a la baja por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (42).

Dicho miRNA se ha estudiado en el proceso fibrótico, sobre todo a nivel de músculo cardíaco de modelo murino, donde la fibrosis auricular parece ser dependiente de la vía TGF- $\beta$ 1/SMAD (43). Lo anterior sucede debido a que el miR-128-3p tiene como blanco al factor de transcripción proteína de especificidad 1 (SP1), el cual se une a TGF- $\beta$ 1 y puede activar la expresión del mismo, por lo tanto miR-128-3p tiene un efecto inhibitorio en la vía de señalización TGF- $\beta$ 1/SMAD, inhibiendo la fibrosis auricular (44).

En otro estudio se investigó las funciones de miR-128-3p en el desarrollo de células satélites de músculo esquelético bovino, encontrando que la sobreexpresión de miR-128 reduce los niveles proteicos de SP1 e inhibe la proliferación y diferenciación de células musculares satélite. (40).

## 7 ANTECEDENTES

Respecto a los dos microRNAs de interés en este trabajo; es decir, miR-21-5p y miR-128-3p, los trabajos que se han reportado en la distrofia muscular de Duchenne se presentan a continuación.

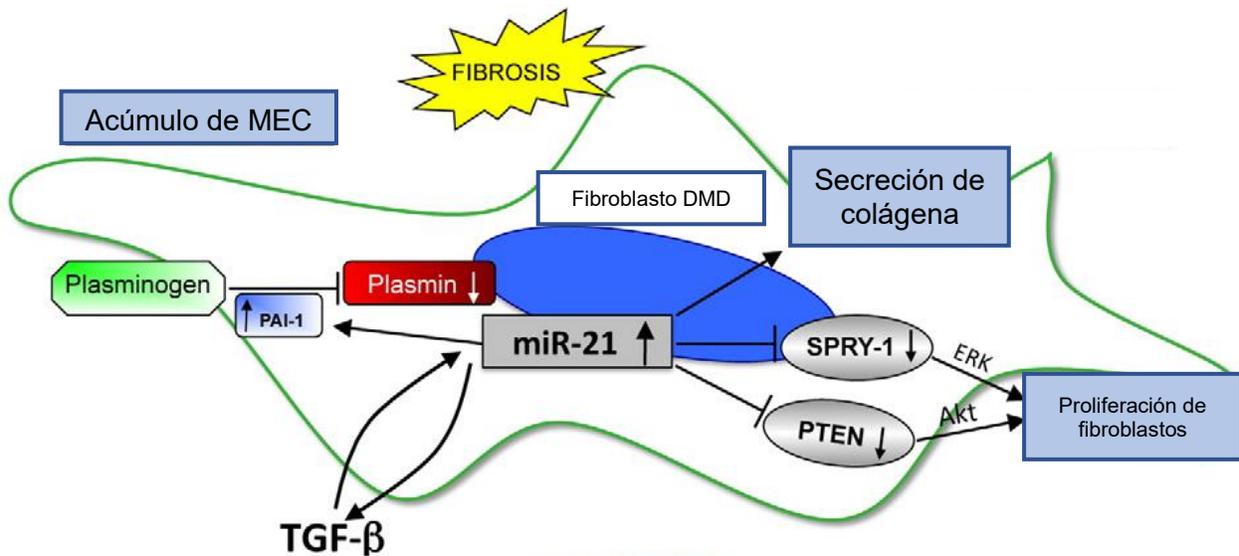
### 7.1 miR-21-5p

Catapano *et al.* (2018), analizaron la expresión de 87 miRNAs en la orina de 54 pacientes con DMD ambulatorios y no ambulatorios. En el estudio se identificó que existe una regulación a la baja de miR-21-5p, miR-22-3p y miR-29c-3p en los pacientes con DMD cuando se les comparó con sujetos sanos; sin embargo, no se mostraron resultados sobre la comparación de los niveles de los miRNAs entre pacientes ambulatorios y no ambulatorios (45). Dicho estudio representa el único antecedente en orina de la literatura de los miRNAs estudiados en fluidos de pacientes con DMD ya que todos los estudios en fluidos corporales se centran en sangre.

En el estudio realizado por Morgoulis *et al.* (2019), se demostró que la expresión de miR-21 en mioblastos derivados de pacientes DMD se encuentra elevada en comparación con los mioblastos provenientes de controles sanos, y que una inhibición de la expresión del mismo, disminuía la expresión de TGF- $\beta$  (46).

Ardite *et al.* (2012) describieron que la expresión de miR-21 es apenas detectable en músculo esquelético sano y que dicha expresión incrementa de una manera concomitante con el proceso de fibrogénesis en función de la edad. Además, en dicho estudio se demostró que la sobreexpresión de miR-21 en el músculo de individuos del modelo murino mdx de menor edad era suficiente para anticipar el proceso de fibrosis, incrementando la gravedad del mismo (38).

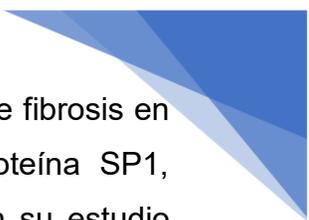
A su vez Zanotti y colaboradores en 2015 investigaron el rol de miR-21 en el proceso de fibrosis en tejido de biopsia muscular de 14 pacientes afectados por distrofia muscular de Duchenne de entre uno y ocho años de edad, los cuales no habían recibido terapia con corticoesteroides, encontrándose una sobreexpresión de mir-21 tanto en miocitos como en miofibroblastos, relacionándose positivamente en ambos casos con un mayor nivel de transcritos de *COL1A1* y de *COL6A1*. De igual manera se identificó como probables blancos de miR-21-5p a los transcritos de los genes inhibidores del ciclo celular *SPRY1* y *PTEN*, favoreciendo la proliferación de fibroblastos (47). Dicha vía molecular se ejemplifica en la **Fig. 6**.



**Fig. 6** | Esquema sobre el papel de miR-21 en la fibrosis en DMD. Tomada y modificada de Zanotti, 2015.

## 7.2 miR-128-3p

Aunque el miR-128 no ha sido altamente estudiado como miR-21-5p en modelos o en pacientes con DMD, Gurinder *et al.* (2020) reportaron que miR-128-3p favorece la diferenciación de mioblastos pero inhibe la proliferación de los mismos, esto a través de una regulación de la vía de la insulina (42).



A su vez Feng *et al.* (2019) demostraron que miR-128-5p inhibía el proceso de fibrosis en tejido de músculo cardíaco humano a través de una inhibición de la proteína SP1, subsecuentemente inhibiendo la vía de señalización TGF- $\beta$ 1/SMAD (44). En su estudio publicado en el 2019, Shen identificó a miR-128-3p como un promotor de la diferenciación de células satélite en modelo de pollo, logrando esto a través de una inhibición de la mioestatina, la cual actúa un antagonista de dicho proceso (48).

## 8 JUSTIFICACION

La distrofia muscular de Duchenne constituye la distrofinopatía más frecuente a nivel global. Se trata de una enfermedad grave y progresiva, con afectación al músculo esquelético, causando un deterioro del mismo hasta llegar a la dependencia del uso de silla de ruedas desde edades tempranas, afectando la calidad de vida tanto del paciente como la de su familia. A pesar de los recientes avances en cuanto al diagnóstico oportuno y manejo interdisciplinario, estos pacientes siguen con una marcada disminución en su esperanza y calidad de vida.

Múltiples terapéuticas para la distrofia muscular de Duchenne están siendo desarrolladas, enfocadas muchas de ellas en detener, o desacelerar el proceso de reemplazo fibrótico que sufre el tejido muscular de estos pacientes. Dichas terapéuticas, se beneficiarían de biomarcadores presentes en sangre, los cuales pudieran ser utilizados para monitorear la progresión de la enfermedad, así como facilitar la toma de decisiones en cuanto al momento idóneo para el inicio del uso de dichas terapéuticas. Como ejemplo de probables biomarcadores se encuentran los miRNAs. Dichos biomarcadores, ampliamente utilizados en otras entidades patológicas, constituyen no solamente un marcador del proceso de fibrosis en tejido muscular distrófico, sino que regulan al mismo.

Por lo anterior, el conocer o determinar el papel de algunos miRNAs como reguladores del proceso fibrótico podría ser útil para en un futuro, mediante un diseño metodológico apropiado para ello, lograr establecer una relación entre el patrón de expresión de miRNAs a nivel sérico con el estadio clínico de la enfermedad, suponiendo una oportunidad para su



posible uso como biomarcadores del estado fibrótico muscular en pacientes con esta condición, y permitiendo el posible desarrollo de otras estrategias terapéuticas centradas en disminuir o desacelerar a la fibrosis muscular.

## **9 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se conoce que en etapas avanzadas de la distrofia muscular de Duchenne el tejido muscular es sustituido por tejido fibrótico, debido a una alteración de la capacidad regenerativa del músculo esquelético, siendo este proceso favorecido por la sobreexpresión de TGF- $\beta$ 1 en el ambiente crónico inflamatorio del músculo distrófico. Por otra parte, en la regulación de la expresión de TGF- $\beta$ 1 participan diferentes microRNAs, que se han utilizado previamente en otras entidades como biomarcadores de progresión de enfermedad. En particular se ha observado que tanto miR-21-5p y miR-128-3p regulan en cierta medida el proceso fibrótico en diferentes patologías, sobre todo a través de la vía que involucra a TGF- $\beta$ 1, sin embargo hasta nuestro conocimiento, aún no existen datos reportados sobre el patrón de expresión de miR-21-5p y miR-128-3p en suero en pacientes afectados por la distrofia muscular de Duchenne, ni el posible cambio de los mismos con la evolución de la entidad, es así como surge la siguiente pregunta de investigación.

## **10 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

En pacientes de entre 3-17 años con distrofia muscular de Duchenne evaluados en el laboratorio de Nutrición Molecular, Unidad de Investigación Médica en Nutrición de la UMAE Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS entre los años 2018-2021

¿Cuál es el patrón de expresión de los miR-21-5p y miR-128-3p obtenido del suero en pacientes con marcha independiente y con ausencia de ella como posibles reguladores del proceso fibrótico?

## 11 OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de miR-21-5p y miR-128-3p obtenidos de suero de pacientes con Distrofia Muscular de Duchenne.

### 11.1 Objetivos específicos primarios

1. Determinar el nivel de expresión circulante de miR-21-5p y miR-128-3p en pacientes con marcha independiente y en pacientes con ausencia de marcha independiente obtenidos de la base de datos del estudio de mayor escala.
2. Identificar mediante un análisis *in silico* a los blancos de miR-21-5p y miR-128-3p mediante los programas MicroRNA.org, TargetScan y miRDB con especial atención en TGF- $\beta$ 1.

### 11.2 Objetivos específicos secundarios

1. Analizar si existe una asociación entre los niveles séricos de TGF- $\beta$ 1 con los miRNAs de interés.
2. Identificar si existe una asociación entre la expresión de los miRNAs de interés con el daño muscular, los datos clínicos y metabólicos registrados de los pacientes pertenecientes al proyecto de investigación principal.
- 3.- Detallar si se presenta una asociación entre los niveles séricos de la MMP9 con el estado ambulatorio o con la edad de los pacientes pertenecientes al proyecto de investigación principal.

## 12 MATERIAL Y METODOS

### 12.1 Diseño de estudio

Por la maniobra del Investigador. - Observacional.

Por el número de mediciones. - Transversal.

Por la recolección de los datos. – Retrospectivo.

Por el número de grupos. – Descriptivo.

### 12.2 Lugar del estudio

Laboratorio de Nutrición Molecular ubicado en la Unidad de Investigación Médica en Nutrición (UIMN), de la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund” de Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Todas las mediciones clínicas y experimentales se llevaron a cabo en el laboratorio de Nutrición Molecular de la institución ya mencionada, la interpretación de la expresión de los miRNAs de interés y el análisis *in silico* se llevó a cabo en esta misma unidad de investigación.

### 12.3 Población del estudio

Para los análisis propuestos para este estudio, se incluyeron los resultados de los pacientes con diagnóstico clínico y molecular confirmado de DMD entre 3 y 17 años (n=29) que hubieran aceptado participar en el estudio de mayor escala con registro R-2018-785-089. Los pacientes provinieron del Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund”, del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

## 12.4 Criterios de selección

Criterios de inclusión: Datos generados de los sujetos que formen parte del proyecto “MiRNAs circulantes de estrés oxidativo y su asociación con el daño muscular en la distrofia muscular de Duchenne”

## 12.5 Tamaño de la muestra

No se realizó cálculo del tamaño de la muestra pues se tomaron los resultados de la base de datos previamente comentada.

## 12.6 Definición de variables

**Tabla 1.** Descripción de las variables. La variable independiente de este trabajo es el daño muscular en los pacientes con DMD que fue medida con escalas de fuerza y función muscular de extremidades superiores e inferiores reflejadas en la capacidad de locomoción o marcha. La variable dependiente es la expresión sérica de los miRNAs de interés. Las variables se describen a continuación en la tabla.

Variable independiente	Definición conceptual	Definición operacional	Clasificación	Escala de medición
Marcha o deambulaci3n independiente	Capacidad de las extremidades inferiores para realizar la locomoci3n.	Capacidad de caminar de manera independiente cuya evaluaci3n de la funci3n muscular de extremidades inferiores, fue determinada mediante la escala de Vignos (La donde el valor de 1 es marcha independiente y 8-10 sin marcha) que se ha realizado en proyecto principal.	Cualitativa nominal	Marcha Presente/ausente

Variable dependiente	Definición conceptual	Definición operacional	Clasificación	Escala de medición
Nivel de expresión miR-21-5p	miR-21-5p es una molécula pequeña de RNA no codificante que regulan el proceso de traducción a través del silenciamiento o degradación de mRNA objetivo.	Nivel de expresión del miR-21-5p en suero obtenido mediante qRT-PCR. TaqMan®, Applied Biosystems®	Cuantitativa continua	Unidades relativas de expresión
Nivel de expresión de miR-128-3p	miR-128-3p es una molécula pequeña de RNA no codificante que regulan el proceso de traducción a través del silenciamiento o degradación de mRNA objetivo	Nivel de expresión del miR-128-3p en suero mediante qRT-PCR. TaqMan®, Applied Biosystems®	Cuantitativa continua	Unidades relativas de expresión

Variabes descriptoras.

Variante descriptora	Definición conceptual	Definición operacional	Clasificación	Escala de medición
Edad	Lapso que transcurre desde el nacimiento hasta el momento de referencia.	Edad obtenida al momento de la toma de la muestra.	Cuantitativa discreta	Numérica

## 13 DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO

Se solicitó la aprobación por parte del comité de ética en investigación y el comité local de investigación en salud la aprobación de este proyecto.

Se obtuvieron los datos de las variables de interés para la interpretación del perfil de expresión circulante de miR-21-5p y miR-128-3p en pacientes distrofia muscular de Duchenne con marcha independiente y con ausencia de la misma, además se realizó un análisis *in silico* para identificar a los blancos asociados de dichos miRNAs con la misma información obtenida de la base de datos previamente realizada en el estudio anterior (mayor escala) en el cual cada uno de los participantes o su representante legal firmó una carta de consentimiento informado y/o de asentimiento, la cual se titula “MiRNAs circulantes de estrés oxidativo y su asociación con el daño muscular en la distrofia muscular de Duchenne” cuyo número de registro ante la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS R-2018-785-089. Cabe destacar que en dicha base los datos se encuentran anonimizados.

Trabajo realizado previamente para obtener la base de datos sobre la cual se trabajará en el presente proyecto:

Los pacientes con el diagnóstico clínico de DMD fueron referidos al laboratorio de nutrición clínica para la realización de diagnóstico molecular de DMD por PCR o por MLPA.



Aquellos pacientes con diagnóstico molecular se les citó en una segunda ocasión en ayuno donde se registraron datos generales, antecedentes heredofamiliares, somatometría, además de medición cualitativa de fuerza y función muscular mediante las escalas MRC, Brooke, Vignos, realizándose además un cuestionario de actividad física y de consumo de alimentos.



Se tomó muestra sanguínea de 5 ml de cuyo suero fueron obtenidos los miRNAs circulantes.



Se realizó una extracción de RNA total mediante el kit comercial miRNeasy Serum/Plasma Kit.



Se realizó una cuantificación de RNA total extraído de las muestras de suero mediante un espectrofotómetro.



Se sintetizó cDNA de los miRNAs obtenidos en la fracción de RNA total con el kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit.



Se realizó PCR cuantitativa preparándose el mix de las reacciones agregándose TaqMan® Small RNA Assay, cDNA y TaqMan® universal PCR Master Mix II, además de agua libre de nucleasas. La PCR tiempo real se llevó a cabo en un termociclador (Lightcycler Nano, Roche) La síntesis se realizó a 50 °C por 2 minutos seguida de otra incubación a 95°C por 10 minutos, después 95°C por 15 segundos y finalmente 60°C por un minuto

Trabajo que se realizó en el presente proyecto

Se analizó la expresión de miR-21-5p y miR-128-3p que fueron obtenidos del suero de pacientes con DMD tanto ambulatorios y en pacientes no ambulatorios.



Se realizaron análisis de correlación entre los niveles de expresión de miR-21-5p y miR-128-3p con las escalas de fuerza y función muscular, así como con TGF- los parámetros metabólicos obtenidos del proyecto principal.



Se llevó acabo un análisis *in silico* de los potenciales mRNA que son regulados por miR-21-5p y miR-128-3p a través de los programas bioinformáticos Diana ([dianalab.e-ce.uth.gr](http://dianalab.e-ce.uth.gr)), Target scan (<http://www.targetscan.org>) y miRDB (<http://www.mirdb.org>).



Se construyó una red regulatoria de miRNA-mRNA seleccionando a los miR21-5p y miR-128-3p y sus mRNA blanco y el software metascape utilizado para visualizar y calcular el grado de cercanía entre los mismos.



Se analizaron a de las posibles vías en las que participan los miRNAs, así com los términos con un mayor grado de enriquecimiento mediante el software metascape y shinyGO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>)



Dicha plataforma primero identificó a los términos enriquecidos (pudiendo ser términos GO/KEGG), de vías canónicas, o por agrupación de genes, etc., posteriormente los valores p hipergeométricos acumulativos y factores de enriquecimiento fueron calculados y utilizados para el filtrado. Aquellos términos que permanecían significativos se agruparon jerárquicamente en un árbol basado en similitudes estadísticas Kappa entre los miembros de esos genes (similar al que es usado en el sitio de DAVID). Entonces el puntaje Kappa de 0.3 se aplicó como umbral para convertir el árbol en agrupamientos.

**Tabla 2.** Lista de secuencias de miRNAs maduros.

Ensayo	ID en miRBase	Número de acceso en miRBase	Secuencia
<b>miRNAs de estudio</b>			
000397	hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
2216	hsa-miR-128-3p	MIMAT0000424	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU
<b>miRNA control</b>			
1973	U6 snRNA	No aplica	No aplica

## 14 ANALISIS ESTADISTICO

Los datos se analizaron con el programa SPSS v22.0. (IBM Corp. Released 2011). Todas las pruebas se realizaron bajo intervalos de confianza del 95% y se consideraron un valor alfa  $< 0.05$ . Para todos los análisis estadísticos primeramente se exploró la distribución Gaussiana de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Para la determinación de cada miRNA de interés entre las etapas de la DMD se realizaron pruebas de *T-student*, en caso de que los datos hubieran presentado una distribución normal. En contraste, si los datos mostraron una distribución no normal, se realizó una prueba de U de Mann Whitney. Para los análisis de correlación entre los miRNAs con el daño muscular se realizaron correlaciones de Pearson en caso de los datos hayan presentado una distribución normal. En contraste, si los datos mostraron una distribución no normal se realizaron correlaciones de Spearman (Esto cubre el objetivo secundario de este presente protocolo).

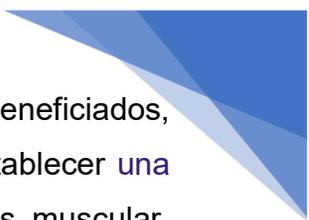
## 15 ASPECTOS ETICOS

### Aspectos éticos y legales

Para realizar el presente proyecto de investigación consideramos las pautas de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos la cual fue adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial en Helsinki, Finlandia en junio 1964 y enmendada por la 64ª Asamblea General, en Fortaleza, Brasil de octubre 2013, en base a que todos participantes involucrados en este proyecto contamos con la formación y las calificaciones científicos y éticas apropiadas. Así mismo establecemos que los participantes en este estudio no fueron afectados de manera adversa en su salud dado que tomamos los datos que se encuentran anonimizados manteniendo de esa manera su confidencialidad. A su vez nos basamos también en la Ley General de Salud en el Título III, Capítulo III artículo 41bis, fracción II y el Título Quinto, Capítulo único, Artículo 100 y en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud en el Título II, Capítulo I, Artículos 13, 14, 16 y 17.

**Riesgo de la investigación.** Tomando en cuenta el artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud, consideramos que nuestro proyecto fue una investigación sin riesgo dado que realizamos una revisión de una base de datos que se encuentra anonimizada a manera de una investigación documental retrospectiva sin identificar a los sujetos ni tratar aspectos sensitivos de su conducta, dado que en dicha base de datos no existen identificadores personales pues cada paciente fue codificado con un folio.

**Confidencialidad y privacidad.** Los datos que fueron utilizados para la identificación precisa del paciente (Nombre, número de seguridad social, dirección, teléfono) no fueron registrados en este estudio, sino que fueron substituidos por un sistema de codificación mediante folio por lo cual se mantuvo la confidencialidad y la privacidad de cada paciente. La información recopilada permanecerá en poder de los investigadores durante cinco años en sus dispositivos electrónicos posteriormente será eliminada.



**Beneficios posibles.** Los pacientes participantes en este estudio no se vieron beneficiados, sin embargo, con la realización de este trabajo de investigación se buscó establecer una relación entre los niveles séricos de los miRNAs con el proceso de fibrosis muscular, pudiendo utilizarse a los mismos en un futuro como biomarcadores de este mismo, esto con la finalidad de conocer la evolución de la enfermedad.

**Balance riesgo beneficio.** Debido a que se trató de un estudio descriptivo, el riesgo para los pacientes con su realización fue prácticamente nulo considerando por una parte que se tomaron las medidas antes mencionadas para proteger la confidencialidad y la privacidad de cada uno de ellos. Y, por otra parte, dado la naturaleza observacional del estudio no se les sometió a ninguna maniobra que pudiera comprometer su integridad de alguna manera. Los beneficios a futuro para otros pacientes se esperan que sean mayores al establecer dichos miRNAs como posibles biomarcadores del proceso de fibrosis muscular.

Por todo lo anterior se solicitó la exención de la carta de consentimiento informado.

## 16 RESULTADOS

### 16.1 Comparación de la edad, los parámetros antropométricos, parámetros de daño muscular, parámetros de fuerza muscular y de actividad física entre los pacientes ambulatorios y no ambulatorios con DMD.

Respecto a los parámetros antropométricos de la población total de los pacientes con DMD de este estudio, se observó una media de edad de 8.27 años, una talla de 120 cm y un peso de 20.6 Kg. En la estratificación de la población total según su estado ambulatorio se observó que la edad, así como la talla y el peso presentaron una diferencia entre los pacientes ambulatorios y no ambulatorios, siendo mayores en el último grupo.

Los parámetros enzimáticos de daño muscular que se tomaron en cuenta fueron las enzimas CK, AST y ALT. Respecto a la población total de pacientes con DMD se identificó que dichas enzimas que evalúan al daño muscular fueron elevados respecto a los parámetros normales. En la comparación que se realizó según el estado ambulatorio de los pacientes los niveles de los marcadores enzimáticos de daño muscular fueron mayores en aquellos pacientes ambulatorios en comparación con aquellos que han perdido la deambulaci3n.

La funci3n muscular fue evaluada mediante las escalas de Brooke, que evalúa a las extremidades superiores, la de Vignos y de SCFMG que evalúan a las inferiores, y el porcentaje de la fuerza MRC que toma en cuenta a las cuatro extremidades (anexos). Respecto a la poblaci3n total de pacientes con DMD se identificó que las escalas que evalúan a la funci3n muscular se encontraban disminuidos, es decir, presentaban una funci3n muscular afectada. De igual manera se observó una funci3n muscular disminuida en miembros superiores y en miembros inferiores en el grupo de los pacientes no ambulatorios.

La actividad física se analizó mediante el cuestionario PAQ-C, donde se identificó que aquellos individuos sin capacidad de la marcha independiente puntuaron más bajo, es decir, tuvieron menor actividad física (**Tabla 3**).

**Tabla 3** | Comparación de la edad, los parámetros antropométricos, parámetros de daño muscular, fuerza muscular y actividad física de pacientes ambulatorios y no ambulatorios con DMD.

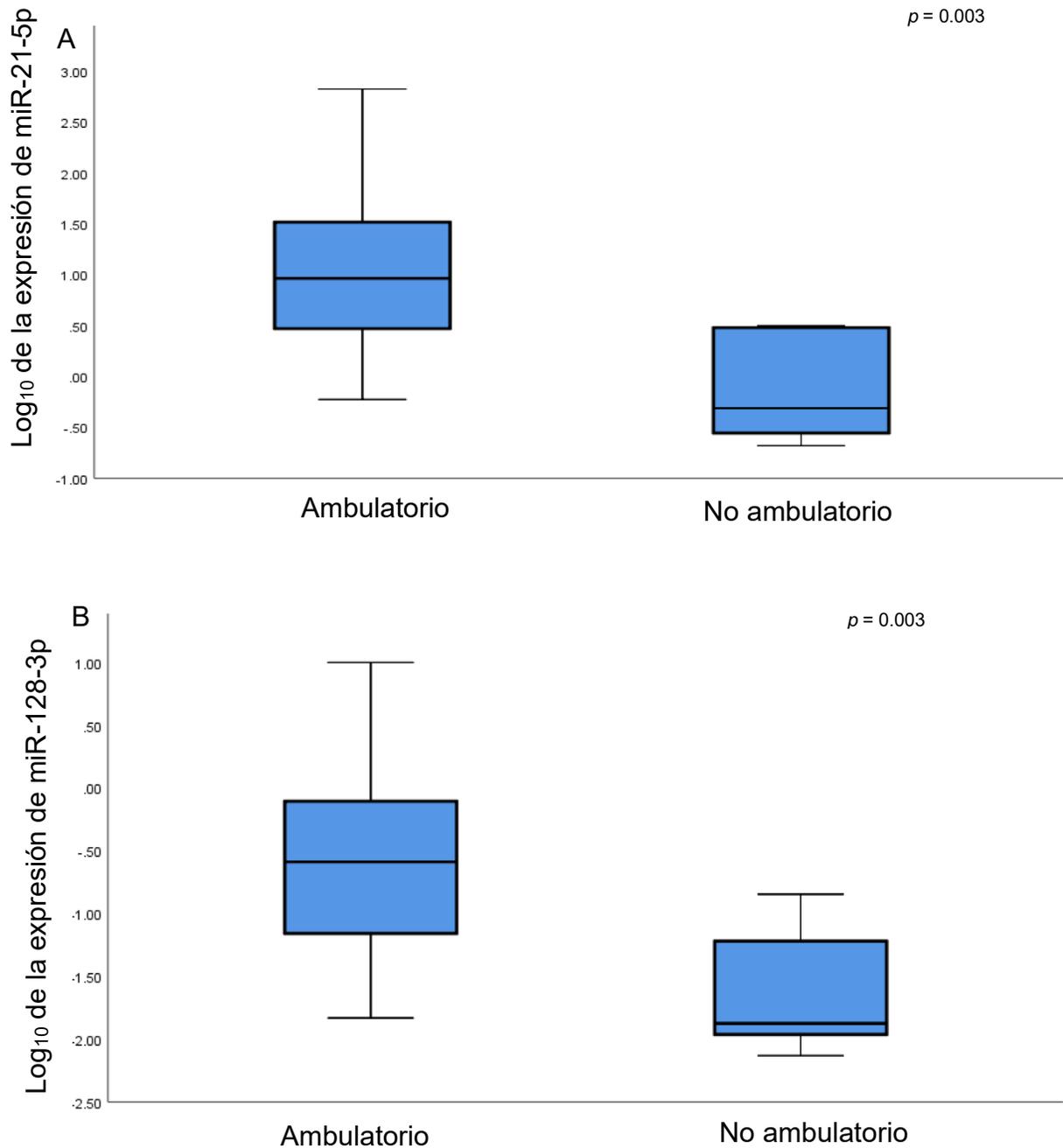
Variable	Población total de DMD (N=29)	Ambulatorio (n=23)	No ambulatorio (n=6)	Valor de p
Edad (años)	8.27 ± 3.40	7.00 ± 2.46	13.18 ± 1.30	<0.001 <sup>a</sup>
Parámetros antropométricos				
Talla (cm)	120.52 ± 20.88	112.96 ± 14.87	149.50 ± 14.05	<0.001 <sup>a</sup>
Peso (kg)	20.60 (11.70, 53.40)	19.05 (11.70, 48.80)	39.20 (22.20, 53.40)	0.005 <sup>b</sup>
Percentil del IMC	19 (1, 97)	28 (1, 97)	6 (1, 77)	0.118 <sup>b</sup>
Parámetros de daño muscular				
CK (U/L)	12,000 (3,050, 28,150)	13,850 (3,900, 28,150)	6,400 (3,050, 7550)	0.002 <sup>b</sup>
AST (U/L)	184.45 ± 76.00	207.09 ± 68.43	97.67 ± 18.82	<0.001 <sup>a</sup>
ALT (U/L)	239.38 ± 34.52	280 ± 120.25	83.67 ± 32.13	<0.001 <sup>a</sup>
Parámetros de fuerza muscular				
Escala de Brooke (puntaje)	2 (1, 4)	1 (1, 3)	3 (2, 4)	<0.001 <sup>b</sup>
Escala de Vignos (puntaje)	3 (2, 9)	3 (2, 4)	9 (9, 9)	<0.001 <sup>b</sup>
SCFMG (puntaje)	2 (1, 5)	2 (1, 2)	5 (4, 5)	<0.001 <sup>b</sup>
Fuerza muscular MRC (%)	84.62 (43.08, 100) <sup>¶</sup>	90.77 (75.38, 100) <sup>‡</sup>	70.77 (43.08, 76.92) <sup>‡</sup>	0.001 <sup>b</sup>
Parámetro de actividad física				
PAQ-C (Puntaje)	2.20 ± 0.82 <sup>¶</sup>	2.41 ± 0.80 <sup>£</sup>	1.45 ± 0.31	<0.001 <sup>a</sup>

Los datos se muestran como media ± desviación estándar (DE) o mediana (mínimo, máximo), en función de la distribución de los datos. AST, aspartato aminotransferasa. ALT, Alanina aminotransferasa. CK, Creatinina cinasa. DMD, Distrofia muscular de Duchenne. MRC, Medical Research Council; PAQ-C, Cuestionario de actividad física. SCFMG: Sistema de Clasificación de la Función Motora Gruesa. <sup>a</sup> Prueba de *t-student*, <sup>b</sup> Prueba de U de Mann-Whitney. Percentil calculado con base a las tablas de la CDC. <sup>¶</sup> n = 27. <sup>‡</sup> n = 22. <sup>‡</sup> n = 5. <sup>£</sup> n = 25.

## 16.2 Niveles de expresión de miR-21-5p y miR-128-3p en pacientes ambulatorios y no ambulatorios.

Con la finalidad de responder al objetivo específico primario de esta investigación, se comparó la expresión del miR-21-5p y el miR-128-3p entre los pacientes ambulatorio y no ambulatorios con DMD (**Fig. 7**). Se observó que el nivel sérico de la expresión de miR-21-

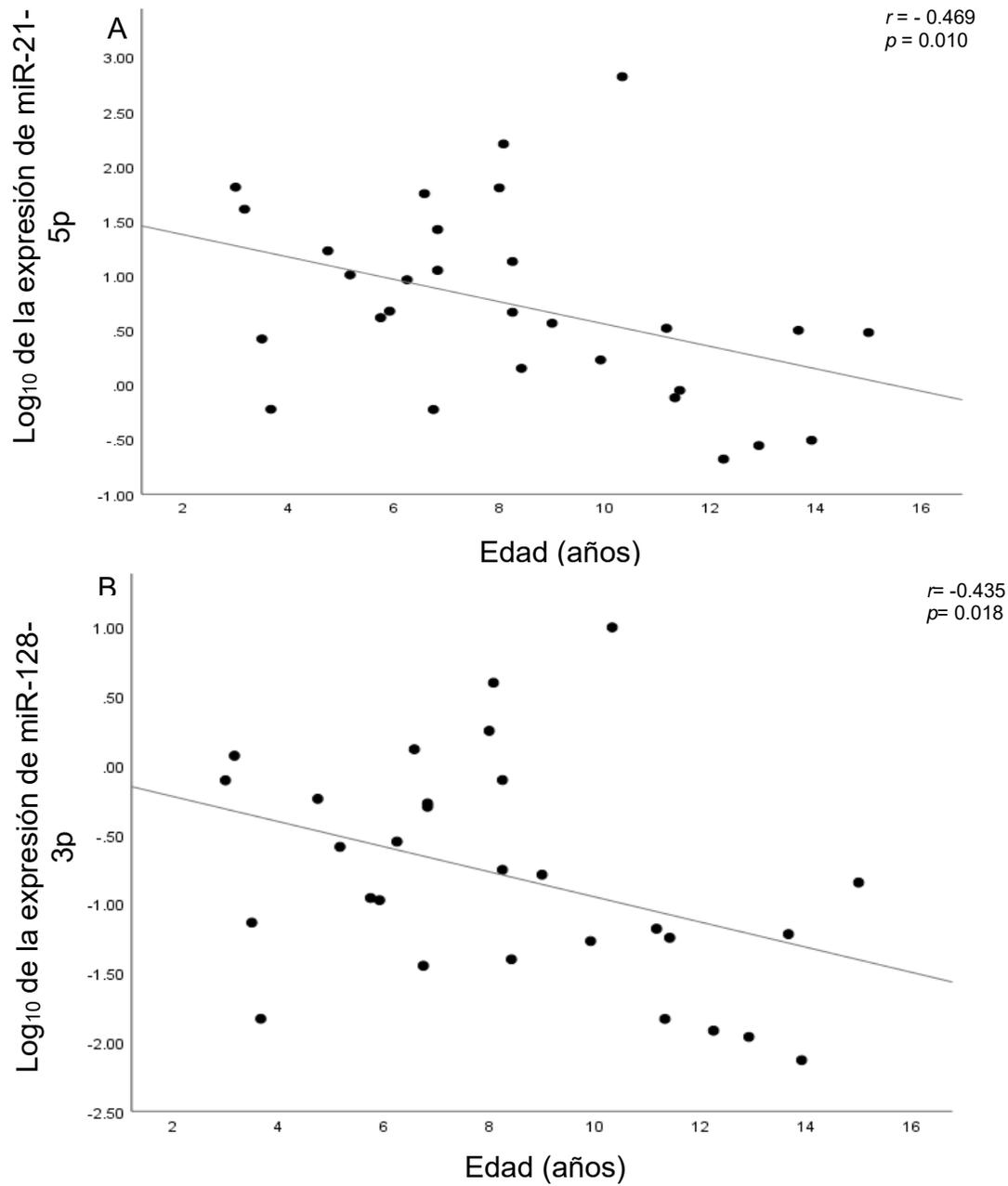
5p fue menor en el grupo de pacientes no ambulatorios en comparación con los pacientes ambulatorios (**Fig. 7 A**). Así mismo, se identificó que el nivel de expresión sérico de miR-128-3p mostró una disminución en los pacientes no ambulatorios en comparación con aquellos ambulatorios (**Fig. 7 B**).



**Fig. 7 I** Comparación de la expresión de los miRNAs entre los pacientes con DMD en estado ambulatorio y no ambulatorio. miR-21-5p (A) y miR-128-3p (B). Prueba de U Mann de Whitney. Pacientes ambulatorios ( $n = 23$ ), pacientes no ambulatorios ( $n = 6$ ).

### 16.3 Correlación de miR-21-5p y miR-128-3p con la edad.

Debido a que la distrofia muscular de Duchenne es una enfermedad muscular crónica y degenerativa, en la cual con la edad se va presentando una mayor degeneración muscular se realizó un análisis entre los niveles de expresión de ambos miRNAs con la edad. Se identificó una correlación negativa de la expresión de miR-21-5p ( $r = -0.469$ ) y de miR-128-3p ( $r = -0.435$ ) con la edad de los pacientes (**Fig. 8**).



**Fig. 8** | Correlación entre la expresión de miR-21-5p (A) y miR-128-3p (B) con la edad de los pacientes con DMD. Coeficiente de correlación obtenido por correlación de Spearman ( $N = 29$ ).

#### 16.4 Correlación entre miR-21-5p y miR-128-3p con las escalas de función muscular y de actividad física.

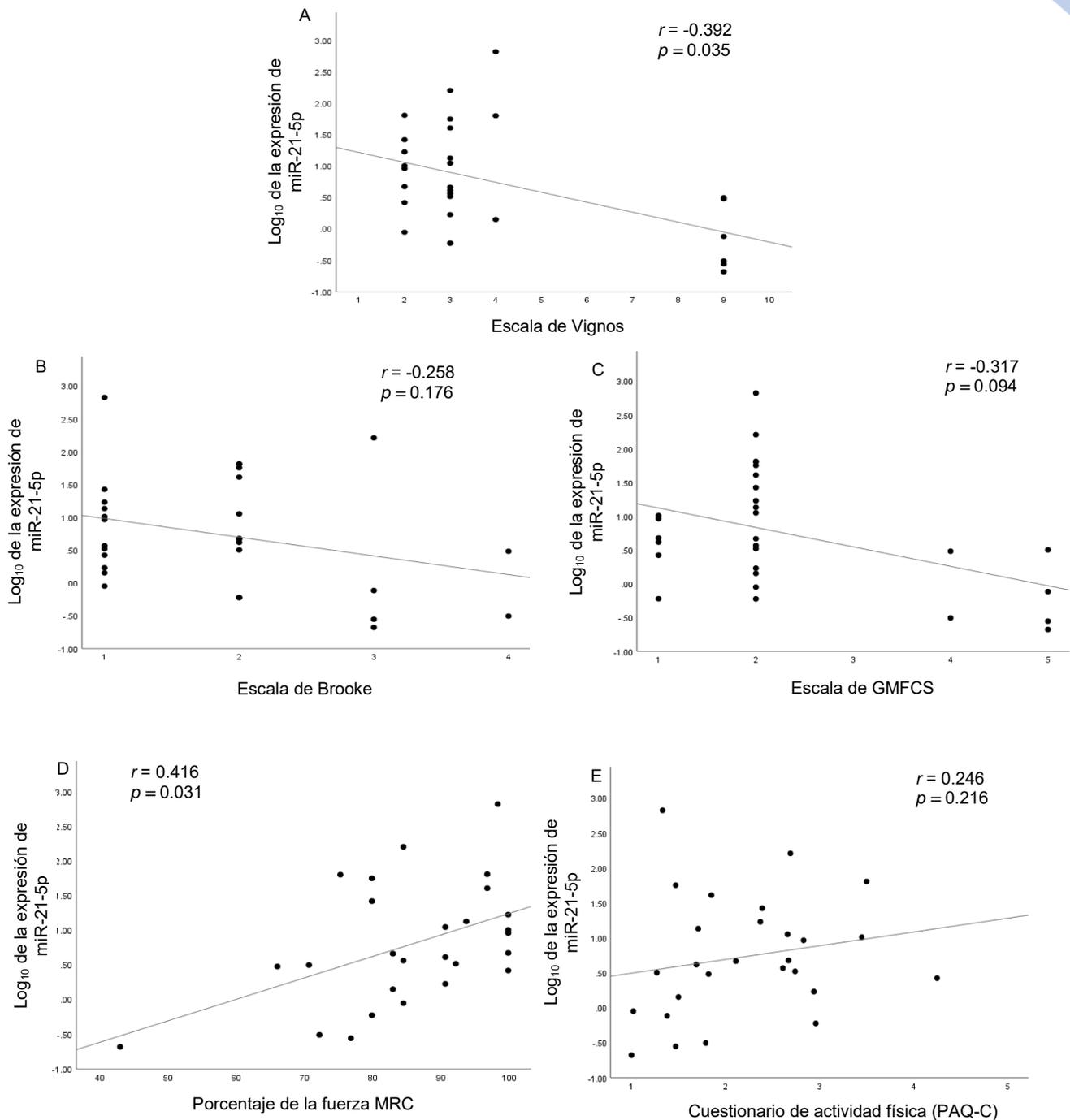
Con la finalidad de identificar si existe una asociación entre los niveles de expresión circulantes de los miRNAs de interés con los datos de fuerza muscular y actividad física se realizaron análisis de correlación entre estos datos.

Se identificó que miR-21-5p muestra una correlación inversa con la escala de Vignos, la cual evalúa a la función muscular de las extremidades inferiores ( $r = -0.392$ , **Fig. 9 A**), identificándose una asociación entre menores niveles de expresión del miRNA con un puntaje mayor en dicha escala, el cual representa una pérdida de fuerza muscular en dichas extremidades.

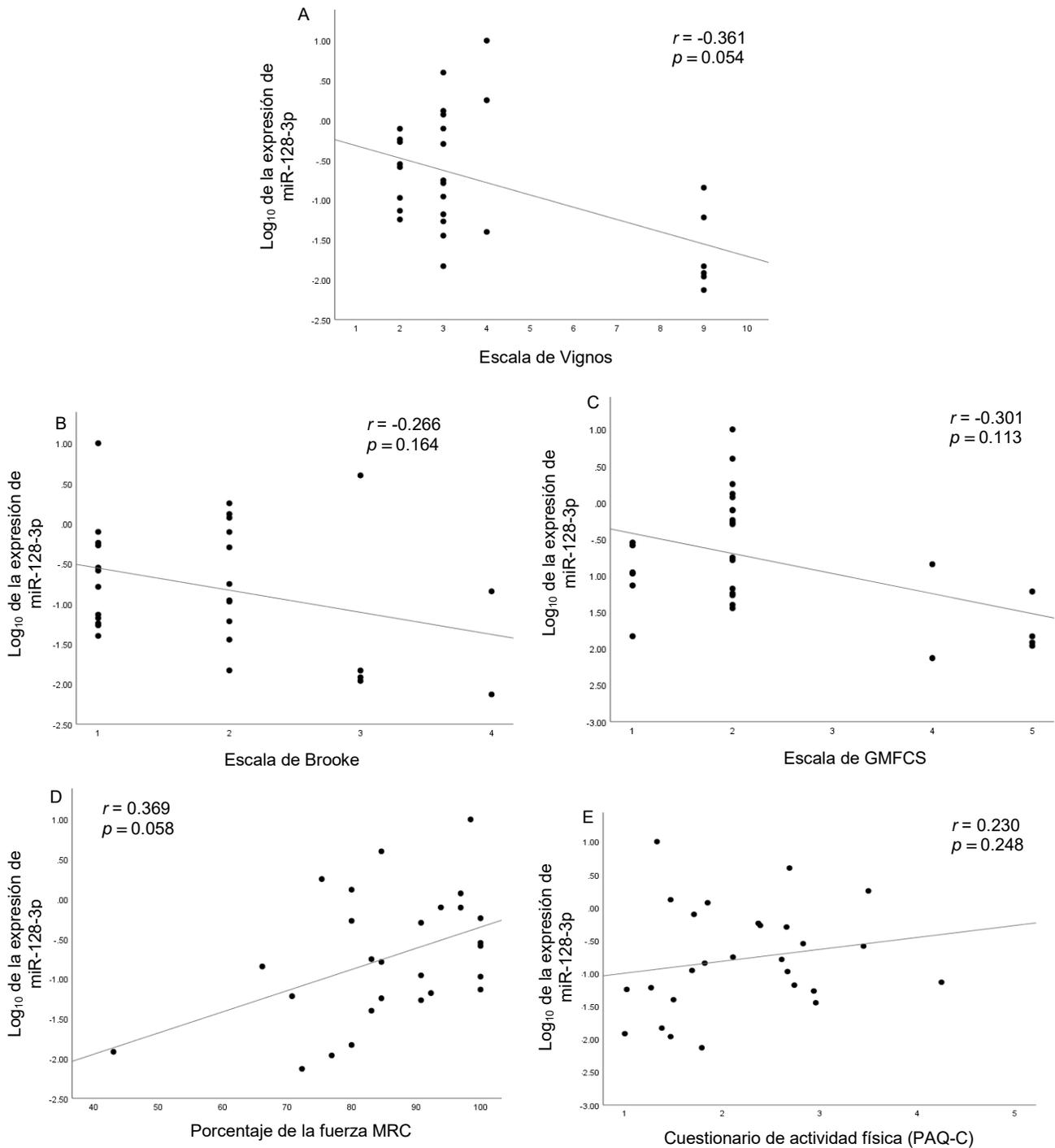
En el mismo sentido, se identificó una correlación entre los niveles de expresión de miR-21-5p con el porcentaje de la fuerza muscular MRC, expresando mayores niveles de dicho miRNA mientras se presentaba un mayor porcentaje de la fuerza ( $r = 0.416$ , **Fig. 9 D**).

Al contrario, no se logró identificar una asociación entre la expresión de miR-21-5p con las escalas de Brooke, con la de GMFCS ni con el cuestionario de actividad física PAQ-C (**Fig. 9 B, 9 C y 9 E**).

De igual manera se realizó un análisis de correlación entre las escalas de función muscular con la expresión de miR-128-3p, sin embargo, no existió alguna correlación entre ambas variables (**Fig. 10**).



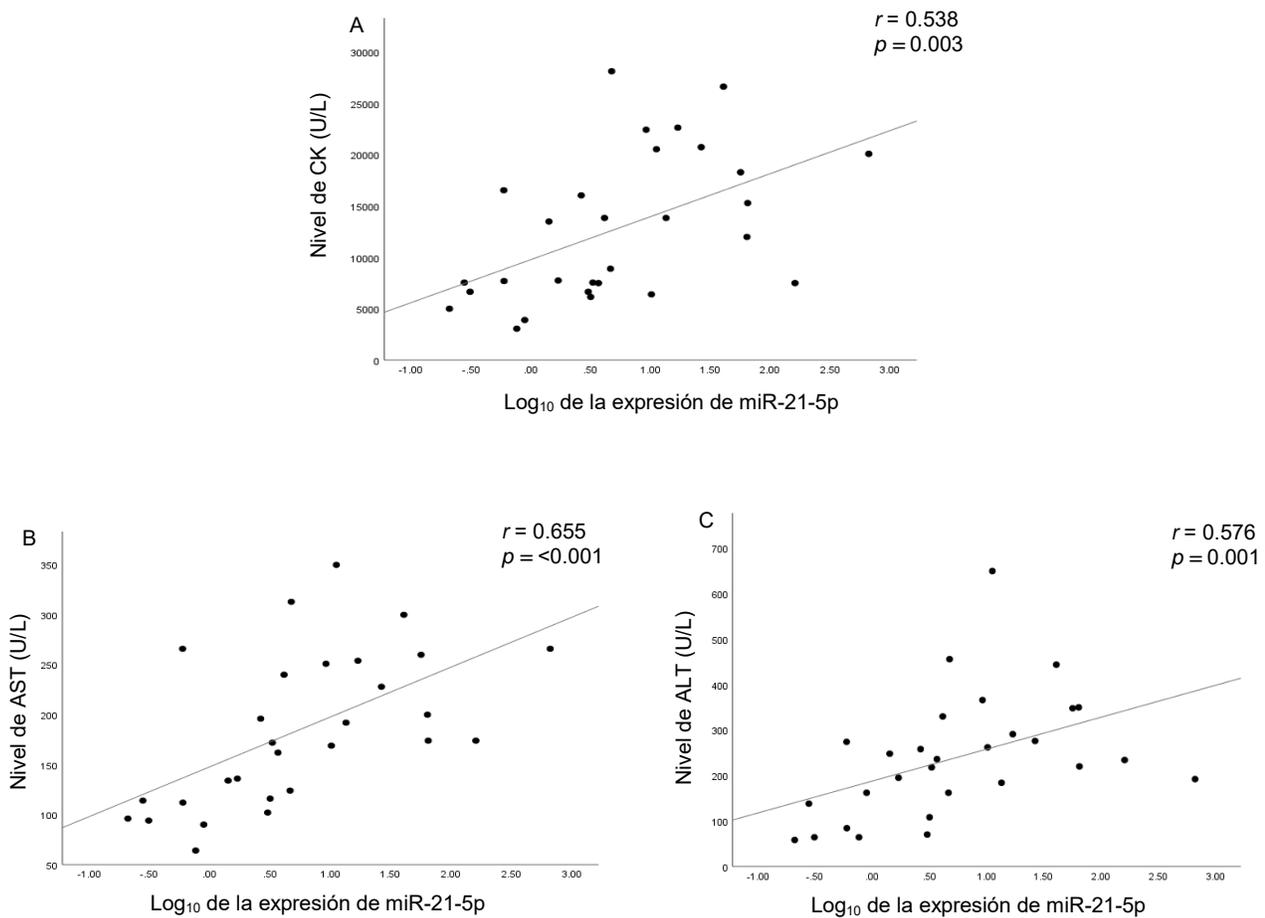
**Fig. 9** | Correlaciones entre las escalas de la fuerza muscular, evaluadas con la escala de Vignos (A), la escala de Brooke (B) la escala de GMFCS (C) y la escala de porcentaje de la fuerza MRC <sup>¶</sup> (D); además de la escala de actividad física PAQ-C <sup>¶</sup> (E) con el logaritmo de la expresión de miR-21-5p. La correlación se realizó a través de la prueba de Spearman ( $N = 29$ ). <sup>¶</sup> ( $n = 27$ ). GMFCS, sistema de clasificación de fuerza de motora gruesa. MRC, Medical Research Council. PAQ-C Cuestionario de actividad física para niños.



**Fig. 10 I** Correlaciones entre las escalas de la fuerza muscular, evaluadas con la escala de Vignos (A), con la escala de Brooke (B), la escala de GMFCS (C) y la escala de porcentaje de la fuerza MRC <sup>¶</sup> (D); además de la escala de actividad física PAQ-C <sup>¶</sup> (E) con el logaritmo de la expresión de miR-128-3p La correlación se realizó a través de la prueba de Spearman ( $N = 29$ ). <sup>¶</sup> ( $n = 27$ ). GMFCS, sistema de clasificación de fuerza de motora gruesa. MRC, Medical Research Council. PAQ-C Cuestionario de actividad física para niños.

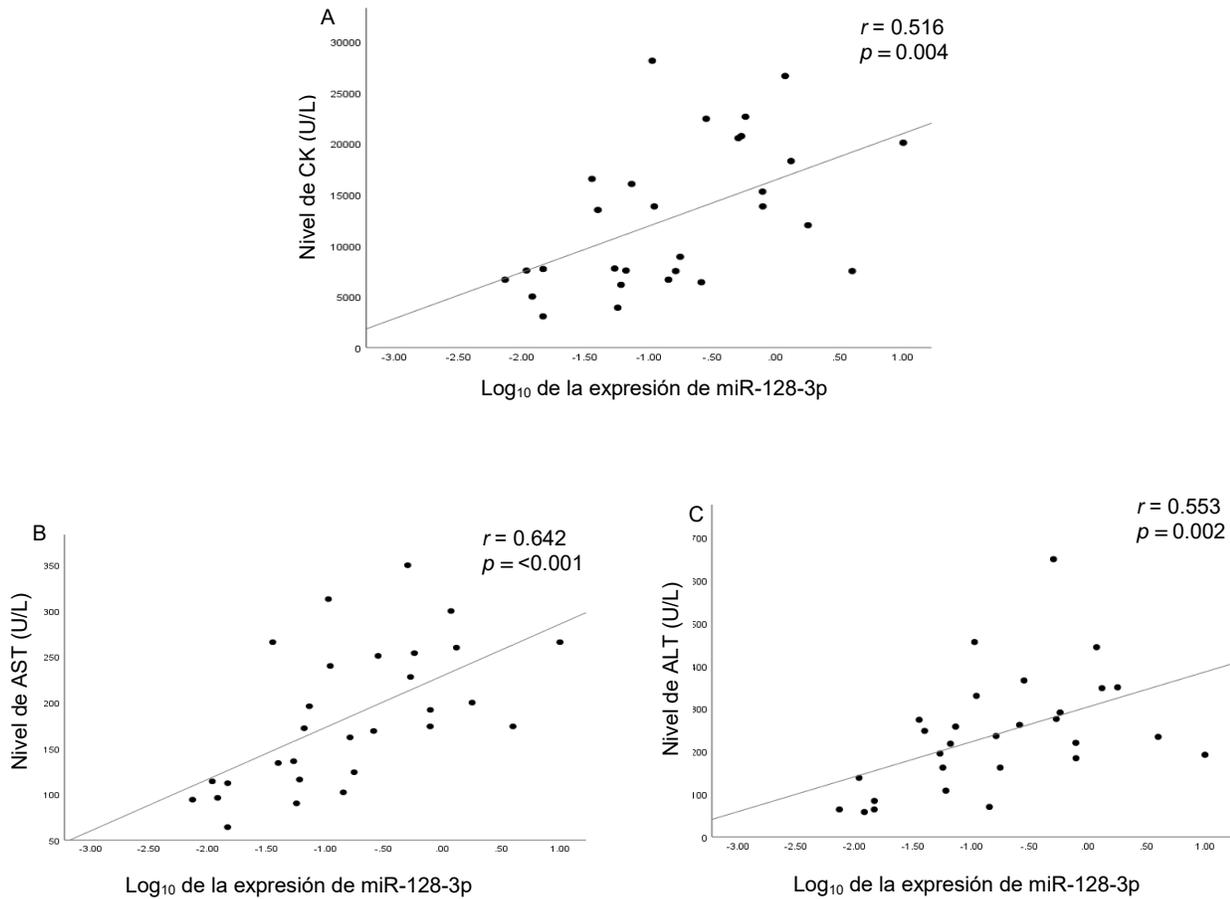
## 16.5 Correlación entre miR-21-5p y miR-128-3p con los marcadores enzimáticos de daño muscular.

Para identificar si existe alguna asociación entre los marcadores de daño muscular con los parámetros de expresión de los miRNAs de interés se realizaron análisis de correlación. En la **Fig. 11** se puede observar que existe una correlación directa entre los niveles de expresión de miR-21-5p y los marcadores de daño muscular (CK, AST y ALT).



**Fig. 11** | Correlación entre la expresión de miR-21-5p y los niveles séricos de CK (A), AST (B) y ALT (C) en pacientes con DMD. Coeficiente de correlación rho obtenido por la prueba de Spearman ( $N = 29$ ). AST, aspartato aminotransferasa. ALT, Alanina aminotransferasa. CK, Creatinina cinasa. DMD, Distrofia muscular de Duchenne.

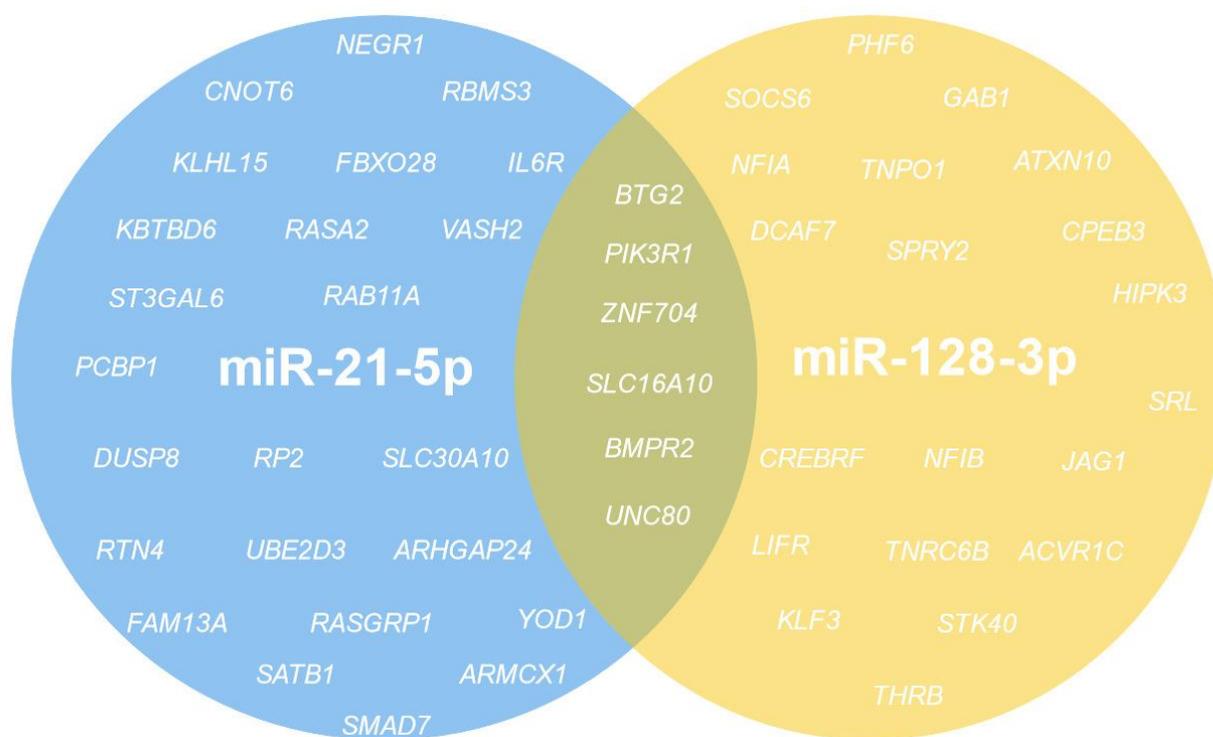
De igual manera, como se aprecia en la **Fig. 12**, el miR-128-3p mostró una correlación con los marcadores de daño muscular, existiendo una mayor expresión sérica de miR-128-3p cuando se presentan mayores niveles de la CK, AST y ALT.



**Fig. 12** | Correlación entre la expresión de miR-128-3p y los niveles séricos de CK (A), AST (B) y ALT (C) en pacientes con DMD. Coeficiente de correlación rho obtenido por la prueba de Spearman ( $N = 29$ ). AST, aspartato aminotransferasa. ALT, Alanina aminotransferasa. CK, Creatinina cinasa. DMD, Distrofia muscular de Duchenne.

## 16.6 Análisis *in silico* de los genes blanco de miR-21-5p y miR-128-3p

Con el objetivo de identificar a los genes blanco de miR-21-5p y de miR-128-3p se realizó un análisis *in silico* a través de las plataformas miRDB, DIANA y Target Scan 8 para reconocer a los potenciales genes blanco de miR-21-5p y de miR-128-3p. Se identificó que miR-21-5p tiene como blanco a 30 genes que coincidieron en las 3 plataformas utilizadas para este análisis. De igual manera se detalló que un total de 26 genes coincidieron en las 3 plataformas como potenciales blancos de miR-128-3p (**Fig.13**) A su vez se identificó que existen 6 genes en común que son regulados tanto por miR-21-5p como por miR-128-3p.



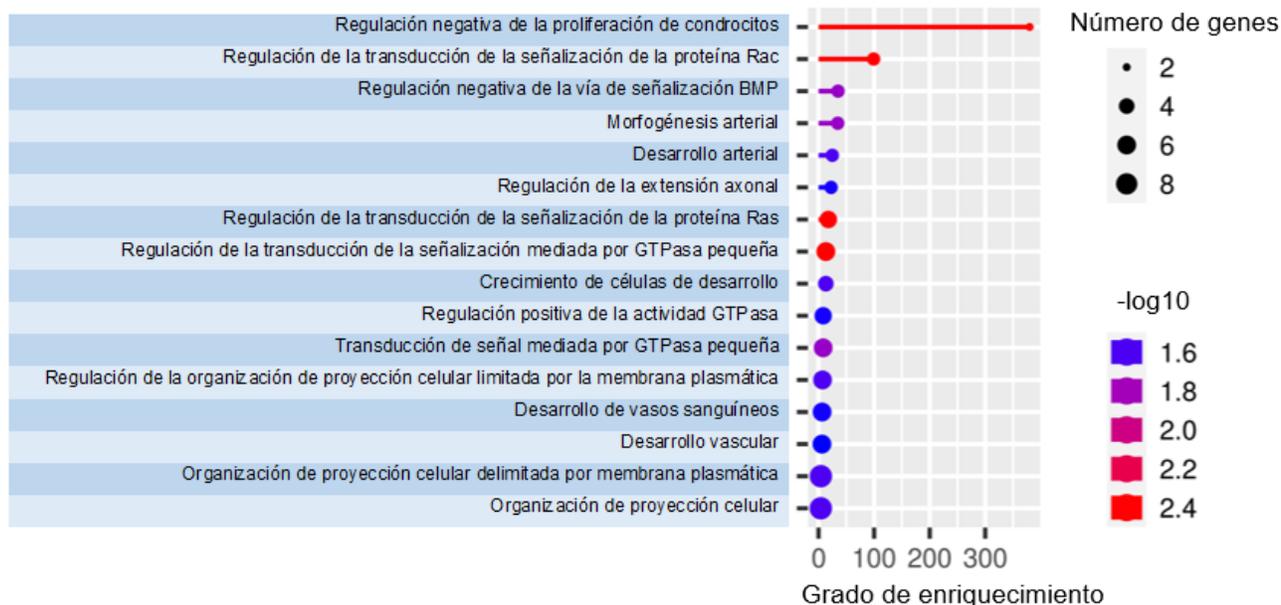
**Fig. 13 |** Diagrama de Venn que muestra los genes blancos de miR-21-5p, miR-128-3p así como los genes blancos en común de ambos miRNAs. Los datos fueron obtenidos a través del análisis *in silico* realizados en las bases bioinformáticas miRDB, DIANA y Target Scan 8.

Para identificar cuáles son las vías en las que participan los genes blanco de miR-21-5p se introdujo una lista con los 30 genes regulados por miR-21-5p en el software de ShinyGO v 0.76 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) en donde se reconoció como las vías con mayor nivel de enriquecimiento a la regulación negativa de la proliferación de condrocitos, a la regulación de la transducción de la señalización de la proteína Rac, así como la regulación negativa de la vía de la señalización BMP, siendo esta un grupo de moléculas de señalización que pertenece a la superfamilia de proteínas de TGF- $\beta$ . En total la plataforma identificó a 16 vías con alto nivel de enriquecimiento, relacionándose cuatro de ellas con el desarrollo de vasos sanguíneos (25%). De igual manera 3 de ellas se relacionan con GTPasa, la cual corresponde a una superfamilia de enzimas que se une a GTP y lo hidrolizan a GDP (18%) (**Tabla 4, Fig. 14**).

**Tabla 4.** Genes blanco regulados por miR-21-5p y las vías con mayor grado de enriquecimiento de estos. Tabla modificada del programa ShinyGO v 0.76.

Vía	Nivel de Enriquecimiento	Gen
Regulación negativa de la proliferación de condrocitos	379.93	<i>SMAD7 BMPR2</i>
Regulación de la transducción de la señalización de la proteína Rac	99.11	<i>RTN4 ARHGAP24 KBTBD6</i>
Regulación negativa de la vía de señalización BMP	35.07	<i>SMAD7 UBE2D3 BMPR2</i>
Morfogénesis arterial	34.53	<i>SMAD7 RTN4 BMPR2</i>
Desarrollo arterial	24.77	<i>SMAD7 RTN4 BMPR2</i>
Regulación de la extensión axonal	22.57	<i>RAB11A RTN4 BMPR2</i>
Regulación de la transducción de la señalización de la proteína Ras	17.67	<i>RTN4 ARHGAP24 RASA2 BTBD6 RASGRP1</i>
Regulación de la transducción de la señalización mediada por GTPasa pequeña	13.1	<i>RTN4 ARHGAP24 FAM13A RASA2 KBTBD6 RASGRP1</i>
Crecimiento de células de desarrollo	13.1	<i>SMAD7 RAB11A RTN4 BMPR2</i>
Regulación positiva de la actividad GTPasa	8.31	<i>RP2 ARHGAP24 FAM13A RASA2 RASGRP1</i>
Transducción de señal mediada por GTPasa pequeña	8.24	<i>RTN4 ARHGAP24 FAM13A RASA2 KBTBD6 RASGRP1</i>

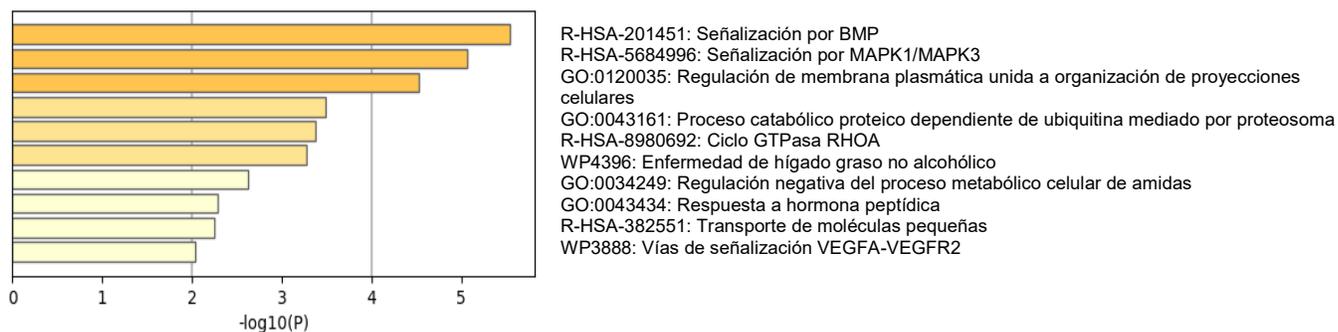
Regulación de la organización de proyección celular limitada por la membrana plasmática	7.07	<i>RAB11A RTN4 ARHGAP24 PIK3R1 NEGR1 BMPR2</i>
Desarrollo de vasos sanguíneos	6.35	<i>SMAD7 RTN4 ARHGAP24 VASH2 IL6R BMPR2</i>
Desarrollo vascular	6.09	<i>SMAD7 RTN4 ARHGAP24 VASH2 IL6R BMPR2</i>
Organización de proyección celular delimitada por membrana plasmática	4.14	<i>RP2 RAB11A RTN4 ARHGAP24 VASH2 PIK3R1 BTG2 NEGR1 BMPR2</i>
Organización de proyección celular	4.04	<i>RP2 RAB11A RTN4 ARHGAP24 VASH2 PIK3R1 BTG2 NEGR1 BMPR2</i>



**Fig. 14 I** Vías con mayor grado de enriquecimiento de los 30 genes blanco regulados por miR-21-5p. El tamaño del círculo se relaciona con el número de genes incluidos en la vía, mientras que el color del círculo se relaciona con el logaritmo base 10 del grado del enriquecimiento. Gráfica modificada de programa ShinyGO v 0.76. El cálculo del enriquecimiento es basado en el valor nominal del valor de p obtenido de la prueba hipergeométrica. El grado de enriquecimiento se define como el porcentaje de genes de la lista introducida que pertenecen a una vía, dividido entre el resto de los genes de dicha vía. Debido a un poder estadístico incrementado, vías con un mayor número de genes tienden a tener menor grado de enriquecimiento. Después de que se realizó el análisis las vías se filtran y clasifican según el grado del enriquecimiento. La información de las vías se obtiene de ENSEMBL, de STRING-db, así como de otras plataformas.

Con la finalidad de contrastar los resultados de la plataforma ShinyGO, se introdujo la lista de los 30 mRNAs regulados por miR-21-5p en el software de metascap.

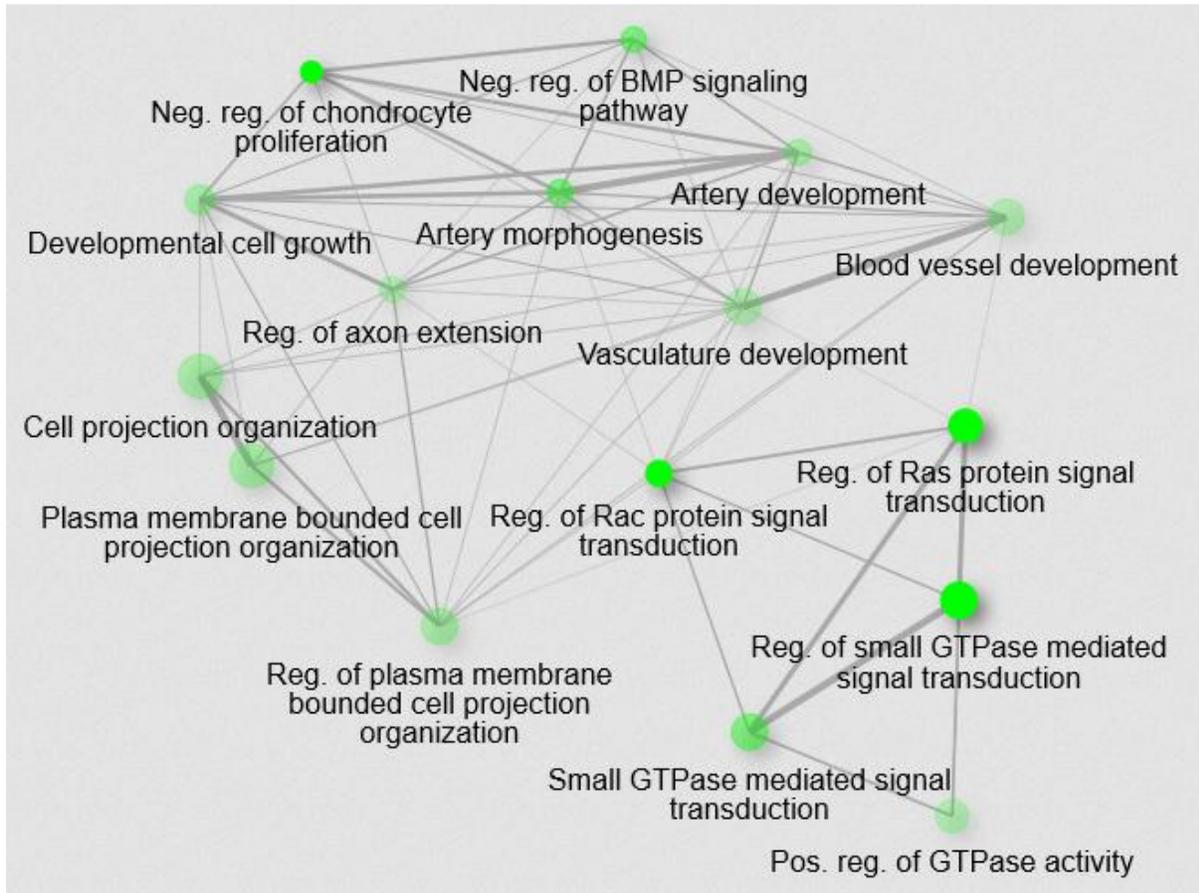
En los resultados que arrojó dicha plataforma se identificó que el término con mayor grado de enriquecimiento es el de la señalización por BMP, vía mencionada en la plataforma anterior, mientras que, en segundo lugar, se encuentra la señalización por MAPK1/MAPK3 y en tercer lugar se encuentra la regulación de la membrana plasmática unida a organización de proyecciones celulares. También se identificaron a vías mencionadas en la plataforma anterior, como lo son las proyecciones celulares unida a membrana plasmática, relacionadas a GTPasa, así como la vía de señalización relacionada con vasculogénesis VEGFA-VEGFR2. El resto de los principales términos enriquecidos se muestran en la **Fig. 15**.



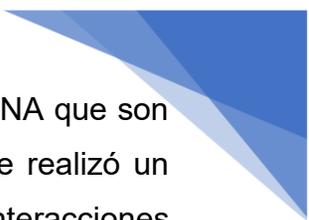
**Fig.15** | Gráfico de barras de términos enriquecidos de los 30 mRNA de miR-21-5p obtenidos mediante el análisis *in silico*, coloreados por valores *p*. GO Número identificador de ontología genica. R-HSA Número de identificación de la plataforma reactome. WP Número identificador de Wikipath. Gráfica realizada en <https://metascape.org>.

De igual manera, con el objetivo de analizar la presencia de genes que se encuentren en dos o más vías, se realizó un análisis el cual es representado mediante una red de interacción la cual muestra la existencia de un mismo gen en dos o más vías, representándolas a través de un nodo y uniéndolas a través de líneas. Se puede observar como aquellos genes que participan en la regulación negativa de la vía de señalización BMP también se encuentran en otras vías como lo son la regulación negativa de la proliferación de condrocitos, en el desarrollo de vasos sanguíneos, entre otras. Aquellos genes que se encuentran en el crecimiento de células de desarrollo también se encuentran en las vías de

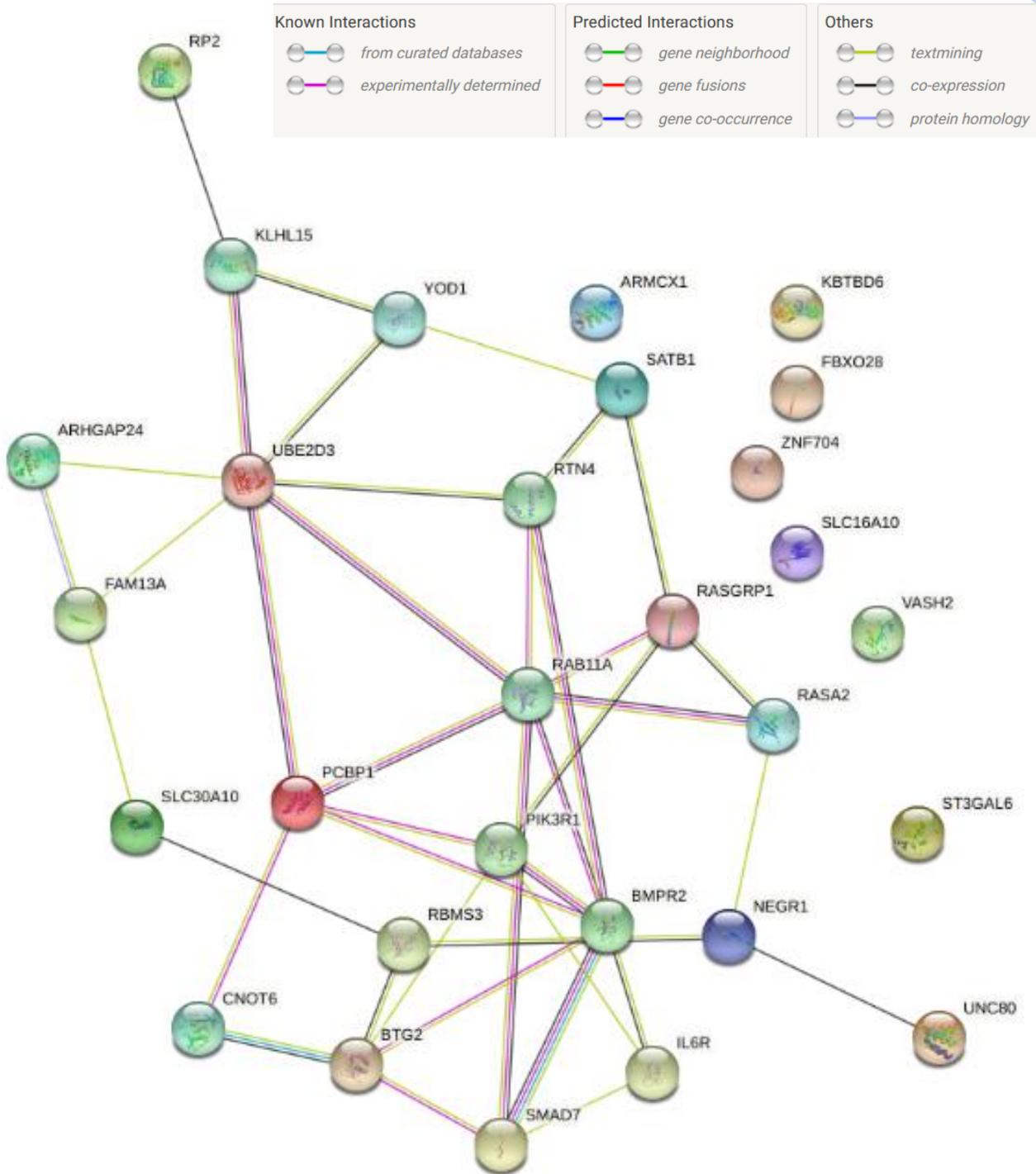
crecimiento vascular, de la regulación negativa de condrocitos y en la regulación de la extensión axonal, entre otros. De igual manera existe un agrupamiento de genes en las vías de señalización Ras y Rac, las cuales son reguladoras del crecimiento y desarrollo celular. El resto de las interacciones se muestran en la **Figura 16**.



**Fig. 16 |** Gráfica que muestra la relación entre las vías enriquecidas de los genes blanco regulados por miR-21-5p. Los nodos representan a las vías. Los nodos más oscuros representan que los genes en esa vía se encuentran con mayor grado de enriquecimiento, mientras que aquellos de mayor tamaño representan a un mayor número de genes en esa vía. Dos nodos se conectan entre si comparten el 20 % o más de los genes en dichas vías. Las conexiones son más gruesas si se comparten mayor cantidad de genes entre los nodos. La imagen se obtuvo en la plataforma ShinyGO v 0.76.



Para identificar si existe interacción entre las proteínas codificadas por los mRNA que son blancos de miR-21-5p, independientemente de la vía en la que participen, se realizó un análisis en la plataforma de ShinyGO. Dicho análisis toma en cuenta las interacciones proteicas conocidas en bases de datos curadas o a través de una determinación experimental, así como una predicción de interacciones como lo son la fusión génica, la proximidad génica, la coocurrencia génica, entre otros parámetros. Entre las principales interacciones, las cuales se pueden observar por la cantidad de líneas que conectan a los 2 nodos, se encuentra la de SMAD7 con BMPR2, dichas proteínas encontrándose en la vía de TGF- $\beta$ . Una proteína que interactúa tanto con SMAD7 como con BMPR2 es IL6R, la cual tiene función como receptor de interleucinas y tiene una participación en reacciones de fase aguda. El resto de las interacciones se muestran en la **Fig. 17**.



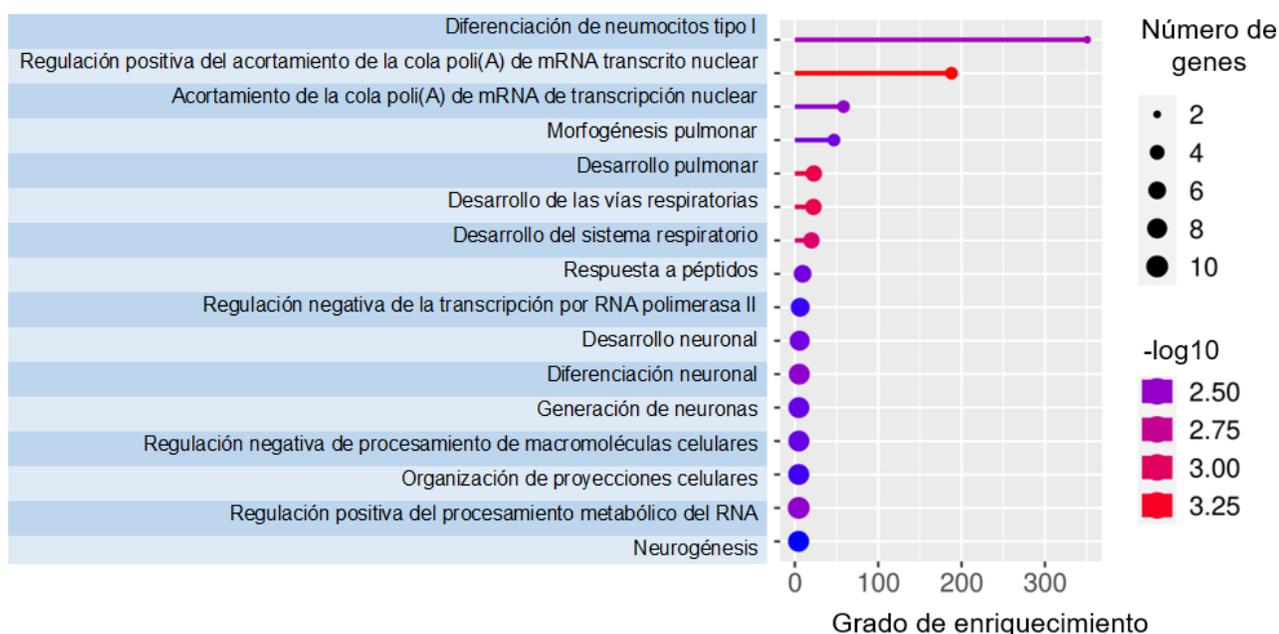
**Fig. 17 |** Gráfico que muestra la interacción entre las proteínas codificadas por los genes blanco cuya expresión es regulada por miR-21-5p. Cada nodo representa a una proteína. Cada línea representa una asociación proteína-proteína. Las asociaciones necesitan ser específicas y representativas. Cada color en las líneas representa a algún tipo de interacción entre las proteínas. Gráfico obtenido de Shiny Go el cual a su vez envió la lista de genes al sitio de STRING, de donde la información se regresa a la primera plataforma, y en donde se calcula un enriquecimiento proteína-proteína.

A su vez para identificar a las principales vías en las que participan los 26 genes blancos de miR-128-3p se introdujo la lista de genes en la plataforma ShinyGO v 0.76, donde se apreció que las principales vías enriquecidas son la de diferenciación de neumocitos, así como la del acortamiento de la cola de Poli (A) del mRNA transcrito nuclear. Notablemente, de las 17 principales vías enriquecidas, 5 de ellas tienen que ver directamente con la morfogénesis de las vías aéreas (29.4%), mientras que 4 de ellas se relacionan al desarrollo del sistema nervioso (23.5%). No se identificó a través de análisis un enriquecimiento de alguna vía relacionada con fibrosis o con TGF- $\beta$  (**Tabla 5, Fig. 18**).

**Tabla 5.** Genes blanco regulados por miR-128-3p y las vías con mayor grado de enriquecimiento de estos. Tabla modificada del programa ShinyGO v 0.76

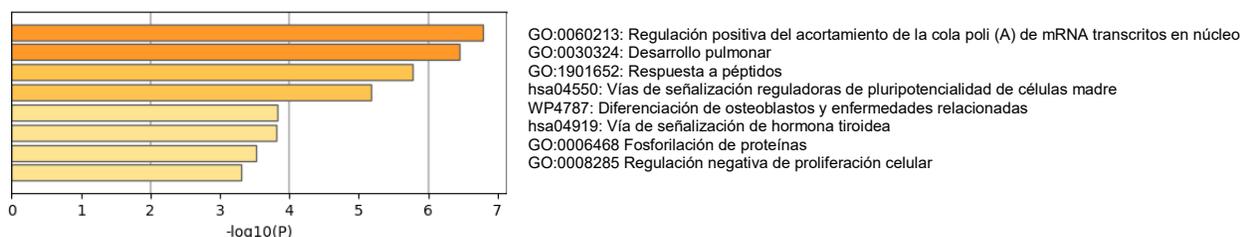
Vía	Nivel de enriquecimiento	Gen
Diferenciación de neumocitos tipo I	350.7	<i>NFIB THR B</i>
Regulación positiva del acortamiento de la cola poli(A) de mRNA transcrito nuclear	187.87	<i>TNRC6B CPEB3 BTG2</i>
Acortamiento de la cola poli(A) de mRNA de transcripción nuclear	58.45	<i>TNRC6B CPEB3 BTG2</i>
Morfogénesis pulmonar	46.96	<i>SPRY2 NFIB STK40</i>
Desarrollo pulmonar	22.83	<i>SPRY2 NFIB THR B STK40 BMPR2</i>
Desarrollo de las vías respiratorias	22.36	<i>SPRY2 NFIB THR B STK40 BMPR2</i>
Desarrollo del sistema respiratorio	19.92	<i>SPRY2 NFIB THR B STK40 BMPR2</i>
Respuesta a péptidos	9.36	<i>JAG1 GAB1 KLF3 ACVR1C PIK3R1 BTG2</i>
Regulación negativa de la transcripción por RNA polimerasa II	6.41	<i>CPEB3 KLF3 NFIB THR B PHF6 BTG2 CREBRF</i>
Desarrollo neuronal	5.83	<i>CPEB3 GAB1 ATXN10 PIK3R1 NFIB THR B BTG2 BMPR2</i>
Diferenciación neuronal	5.35	<i>JAG1 CPEB3 GAB1 ATXN10 PIK3R1 NFIB THR B BTG2 BMPR2</i>
Generación de neuronas	4.85	<i>JAG1 CPEB3 GAB1 ATXN10 PIK3R1 NFIB THR B BTG2 BMPR2</i>
Regulación negativa de procesamiento de macromoléculas celulares	4.83	<i>TNRC6B CPEB3 KLF3 NFIB THR B PHF6 BTG2 CREBRF BMPR2</i>

Organización de proyecciones celulares	4.66	<i>TNPO1 CPEB3 GAB1 ATXN10 SPRY2 PIK3R1 NFIB BTG2 BMPR2</i>
Regulación positiva del procesamiento metabólico del RNA	4.62	<i>TNRC6B JAG1 CPEB3 PIK3R1 NFIB THRB BTG2 NFIA CREBRF BMPR2</i>
Neurogénesis	4.49	<i>JAG1 CPEB3 GAB1 ATXN10 PIK3R1 NFIB THRB BTG2 BMPR2</i>



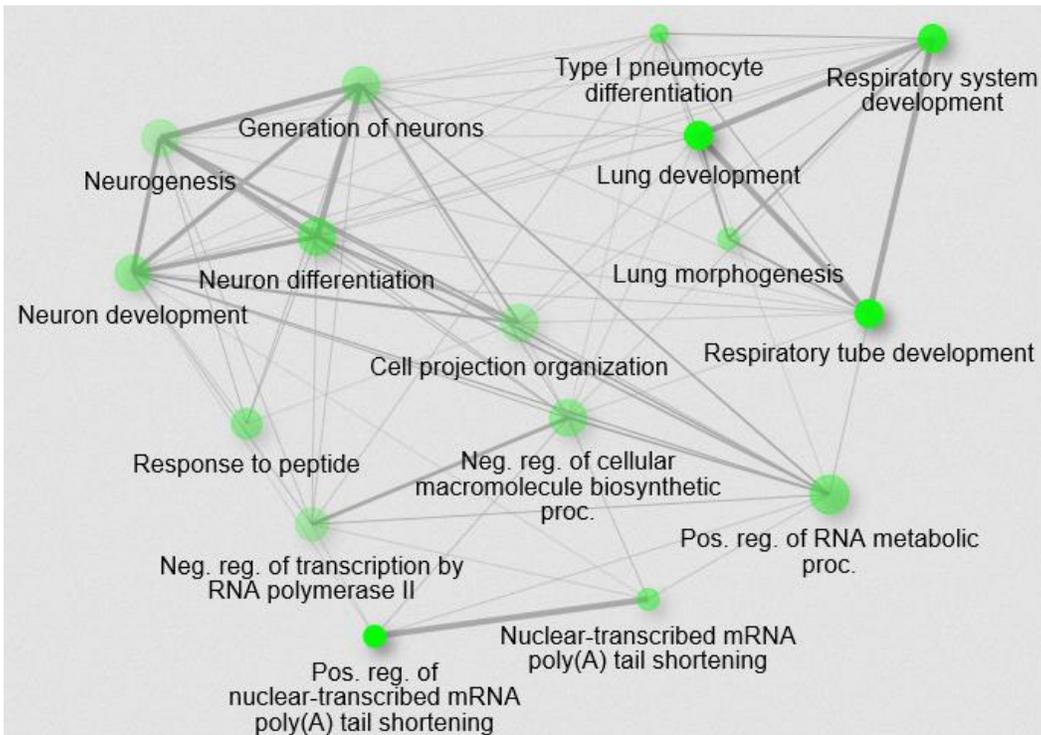
**Fig. 18 |** Vías con mayor grado de enriquecimiento de los 26 genes blanco regulados por miR-128-3p. El tamaño del círculo se relaciona con el número de genes incluidos en la vía, mientras que el color del círculo se relaciona con el logaritmo base 10 del grado del enriquecimiento. Gráfica modificada de programa ShinyGO v 0.76. El cálculo del enriquecimiento es basado el valor nominal del valor de P obtenido de la prueba hipergeométrica. El grado de enriquecimiento se define como el porcentaje de genes de la lista introducida que pertenecen a una vía, dividido entre el resto de los genes de dicha vía. Debido a un poder estadístico incrementado, vías con un mayor número de genes tienden a tener menor grado de enriquecimiento. Después de que se realizó el análisis las vías se filtran y clasifican según el grado del enriquecimiento. La información de las vías se obtiene de ENSEMBL, de STRING-db, así como de otras plataformas

De igual manera se realizó el análisis de las principales vías enriquecidas en la plataforma de metascape, donde se reconoció a los términos con un mayor enriquecimiento de los mRNA blanco de miR-128-3p, existiendo una concordancia con lo descrito en la plataforma anterior, siendo el término con mayor enriquecimiento la regulación positiva del acortamiento de la cola poli (A) de transcritos de mRNA en el núcleo, mientras que el segundo con mayo enriquecimiento fue el de desarrollo pulmonar, y el tercero fue el de respuesta a péptidos. El resto de los términos enriquecidos se muestran en la misma figura (Fig.19).



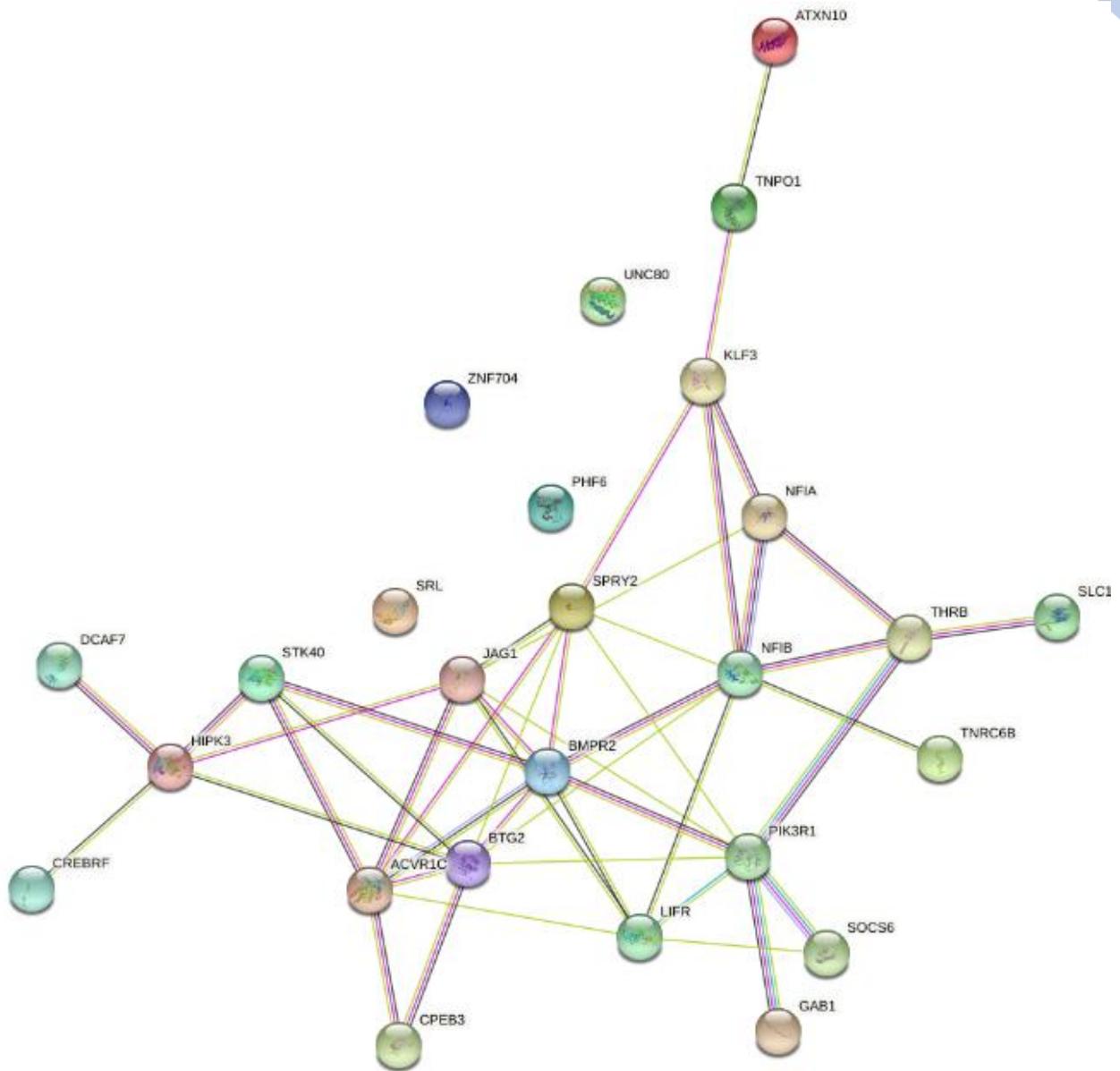
**Fig.19** | Gráfico de barras de términos enriquecidos de los 26 mRNA blanco de miR-128-3p obtenidos mediante el análisis *in silico*, coloreados por valores *p*. GO Número identificador de ontología génica. hsa Número de identificación de la plataforma reactome. WP Número identificador de Wikipath. Gráfica obtenida de metascape.org.

En concordancia con estos hallazgos, se identificó que existen genes que participan en 2 o más vías, presentándose 2 grandes agrupamientos, aquellos que participan en vías relacionadas con el desarrollo de vías aéreas y aquellos relacionados con el proceso de neurogénesis. De igual manera se aprecia que aquellos genes relacionados con la regulación negativa de la transcripción por la RNA polimerasa II se encuentran también en la vía de la regulación negativa del procesamiento de macromoléculas. De igual modo se puede apreciar que las vías con mayor grado de enriquecimiento son los que tienen que ver con la morfogénesis de vías aéreas, así como los del acortamiento de la cola de poli (A) **Fig. 20.**



**Fig. 20 |** Gráfica que muestra la relación entre las vías enriquecidas de los genes blanco regulados por miR-128-3p. Los nodos representan a las vías. Nodos más oscuros representan que los genes en esa vía se encuentran con mayor grado de enriquecimiento. Nodos de mayor tamaño representan a un mayor número de genes en esa vía. Dos nodos se conectan entre si comparten el 20 % o más de los genes en dichas vías. Las conexiones son más gruesas si se comparten mayor cantidad de genes entre los nodos. La imagen se obtuvo en la plataforma ShinyGO v 0.76.

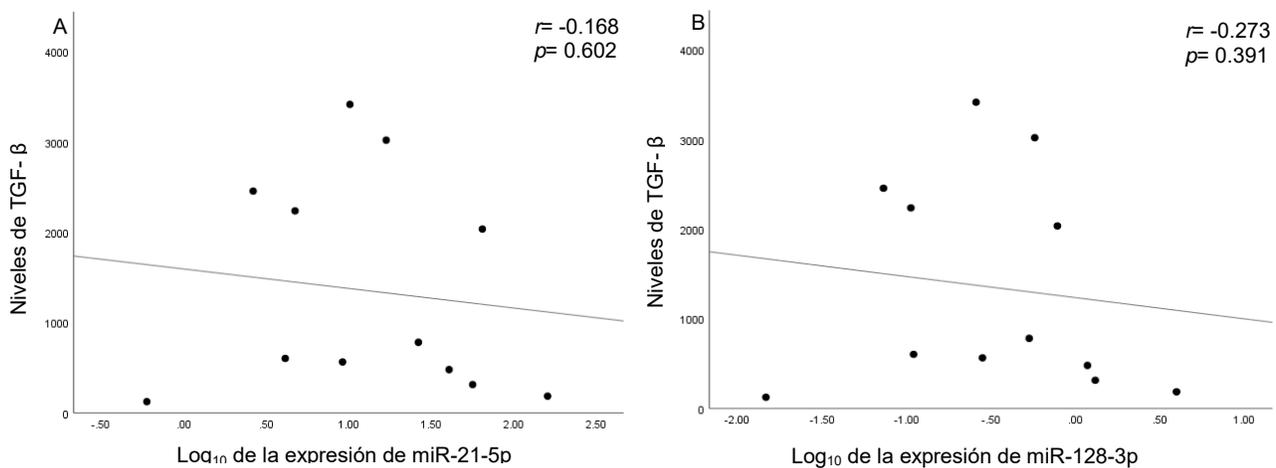
De igual manera se analizó la interacción entre las proteínas que son codificadas por los genes blancos de miR-128-3p. Se observó que las interacciones proteína-proteína con mayor peso son aquellas entre PIK3R1, la cual codifica para una subunidad reguladora de la cinasa fosfatidilinositol-3 cinasa, con GAB1, la cual codifica para una proteína adaptadora que tiene un rol en cascadas de señalización intracelular activadas por distintas cinasas. De igual manera se aprecia como BMPR2, tiene altos niveles de interacción con PIK3R1, con STK40, la cual es una cinasa serina treonina 40 que puede actuar como regulador negativo de NF-Kappa-B y de p53; así como NFIB, así como con ACVR1C, la cual es una cinasa serina-treonina la activa a los reguladores transcripcionales SMAD2 y SMAD3, involucrados en procesos de diferenciación celular, arresto celular y apoptosis (**Fig. 21**).



**Fig. 21** | Gráfico que muestra la interacción entre las proteínas codificadas por los genes blanco cuya expresión es regulada por miR-128-3p. Cada nodo representa a una proteína. Cada línea representa una asociación proteína-proteína. Las asociaciones necesitan ser específicas y representativas. Cada color en las líneas representa a algún tipo de interacción entre las proteínas. Gráfico obtenido de Shiny Go el cual a su vez envió la lista de genes al sitio de STRING, de donde la información se regresa a la primera plataforma, y en donde se calcula un enriquecimiento proteína-proteína.

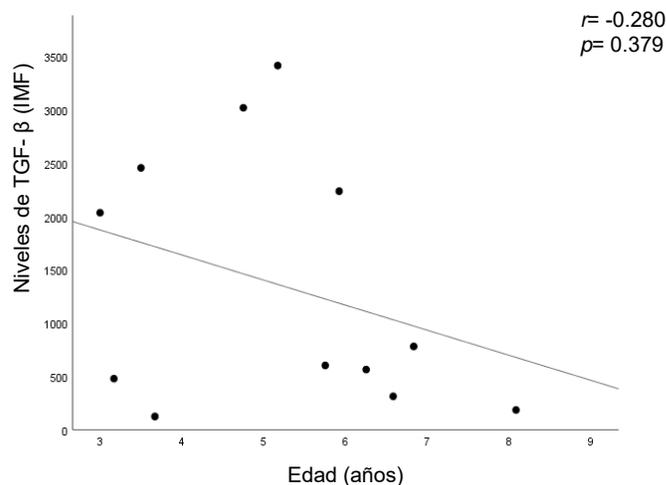
## 16.7 Correlación de TGF- $\beta$ con miR-21-5p, miR-128-3p y la edad

Debido a que en nuestros antecedentes se menciona a miR-21-5p y a miR-128-3p como reguladores de la vía de TGF-  $\beta$ , como primer objetivo secundario se planteó analizar si existe alguna asociación entre la expresión de miR-21-5p y miR-128-3p con los niveles séricos de TGF-  $\beta$ , por lo que se llevó a cabo un análisis de correlación, sin lograr demostrarse una asociación significativa como se demuestra en la **Fig. 22**. Es necesario comentar que sólo se contaba con los niveles de TGF-  $\beta$  de 12 pacientes de entre 3 y 8 años de edad, además de que todos ellos preservaban un estado ambulatorio independiente.



**Fig. 22 |** Correlación entre los niveles séricos de TGF- $\beta$  y la expresión de miR-21-5p (A) y miR-128-3p (B) en pacientes con DMD. Coeficiente de correlación rho obtenido por la prueba de Spearman ( $N = 12$ ). DMD Distrofia muscular de Duchenne. IMF Intensidad media de fluorescencia. TGF-  $\beta$  Factor de crecimiento transformante beta.

De igual manera, con la finalidad de poder responder al segundo objetivo secundario, el de reconocer si existe alguna asociación entre los niveles séricos de la proteína TGF-  $\beta$  con la edad de los pacientes, se realizó un análisis de correlación, el cual no demostró una significancia. Es necesario mencionar que sólo se contaba con los niveles de TGF-  $\beta$  de 12 pacientes, los cuales se encontraban en un rango de 3 a 8 años de edad, los cuales todos preservaban la marcha independiente **Fig. 23**.



**Fig. 23 I** Correlación entre los niveles séricos de TGF-β con la edad de pacientes con DMD. Coeficiente de correlación rho obtenido por la prueba de Spearman ( $N = 12$ ). DMD Distrofia muscular de Duchenne. IMF Intensidad media de fluorescencia. TGF- β Factor de crecimiento transformante beta.

### 16.8 Comparación de los parámetros enzimáticos de daño muscular y de los parámetros metabólicos entre los pacientes ambulatorios y no ambulatorios con DMD

En cuanto a los estudios metabólicos evaluados, que fueron glucosa, insulina, el índice de la resistencia a la insulina, el colesterol total, el colesterol VLDL y los triglicéridos, se encontraban dentro de parámetros normales en la población total con DMD. De igual manera, cuando se realizó una estratificación entre ambos grupos se observó que no hay una diferencia entre ellos, a excepción de los niveles de colesterol sérico total, el cual fue mayor en los pacientes con marcha independiente (**Tabla 6**).

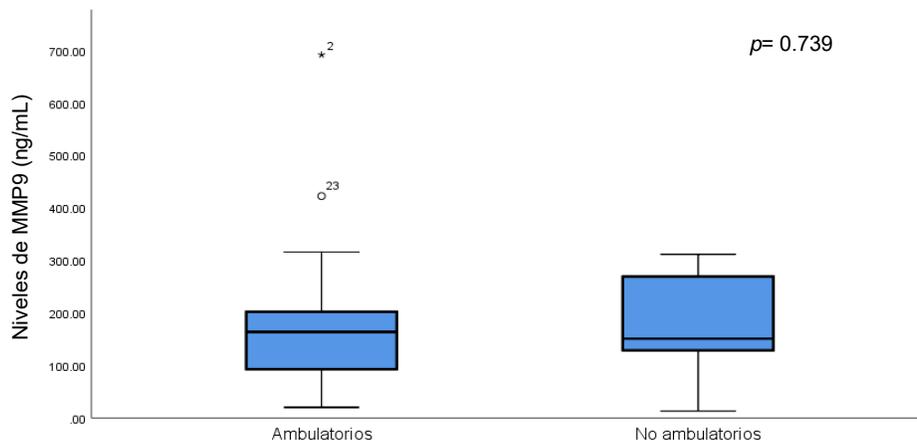
**Tabla 6** | Comparación de los parámetros de daño muscular, función muscular y actividad física de pacientes ambulatorios y no ambulatorios con DMD.

Variable	Población total DMD (N=29)	Ambulatorio (n=23)	No ambulatorio (n=6)	Valor de p
Parámetros metabólicos				
Glucosa (mg/ dL)	85.41 ± 7.54	84.96 ± 7.30	87.17 ± 8.90	0.59 <sup>a</sup>
Insulina (μU/ mL)	5.65 (5, 23) <sup>‡</sup>	5.65 (5, 23) <sup>‡</sup>	5.70 (5, 8)	0.547 <sup>b</sup>
Índice Homa-IR	1.20 (1, 5) <sup>‡</sup>	1.20 (1, 5) <sup>‡</sup>	1.20 (1, 2)	0.890 <sup>b</sup>
Colesterol total (mg/ dL)	154.45 ± 31.85	162.91 ± 29.28	122 ± 17.84	0.001 <sup>a</sup>
Colesterol VLDL (mg/dL)	26.8 (11.2, 65.2)	26.8 (11.2, 65.2)	23.9 (16, 58)	0.726 <sup>b</sup>
Triglicéridos (mg/ dL)	134 (56, 326)	134 (56, 326)	119.50 (80, 290)	0.726 <sup>b</sup>

Los datos se muestran como media ± desviación estándar (DE) o mediana (mínimo, máximo) en función de la distribución de los datos. DMD, Distrofia muscular de Duchenne. Índice Homa-IR, modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina. VLDL, Lipoproteína de muy baja densidad <sup>a</sup> Prueba de *t-student*. <sup>b</sup> Mann-Whitney U test <sup>‡</sup> n = 24, <sup>‡</sup> n= 18.

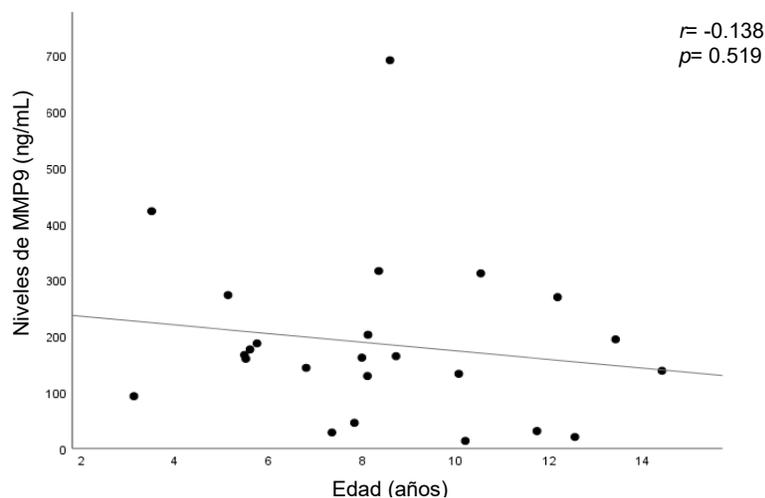
## 16.9 Análisis de la expresión de MMP9 en pacientes con DMD

Debido a que las metaloproteinasas son remodeladoras de la matriz extracelular y se han identificado como desreguladas en la DMD, en específico, la MMP-9, enzima que degrada a la colágena 4, se ha encontrado sobre expresada en pacientes con DMD, se planteó detallar cual es el patrón de expresión de la MMP9 según el estado ambulatorio de los pacientes con DMD se realizó un análisis de correlación. Como se puede apreciar en la **Fig. 24**, no hubo cambios en el nivel de expresión de acuerdo con la presencia o ausencia del estado ambulatorio independiente ( $p = 0.739$ ). Los niveles de la expresión de la MMP9 se obtuvieron de otro grupo de pacientes con DMD distinto del que se obtuvieron el resto de las mediciones que se comentan en este estudio.



**Fig. 24 I** Comparación de la expresión de los niveles séricos de MMP9 entre los pacientes con DMD en estado ambulatorio y no ambulatorios. Prueba de U Mann de Whitney. Pacientes ambulatorios  $n = 23$ , pacientes no ambulatorios  $n = 6$ . MMP-9 Metaloproteínasa de matriz 9.

Para identificar si los niveles de expresión mostraban patrones distintos de expresión independientemente de su estado ambulatorio, pero con relación a la edad de los pacientes con DMD se realizó un análisis de correlación, sin mostrarse una asociación significativa (**Fig. 25**).



**Fig. 25 I** Correlación entre los niveles de expresión de MMP9 con la edad de pacientes con DMD. Coeficiente de correlación rho obtenido por la prueba de Spearman ( $N = 24$ ). DMD Distrofia muscular de Duchenne. MMP-9 Metaloproteínasa de matriz 9.

## 17 DISCUSIÓN

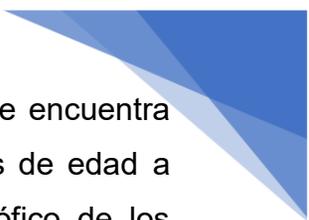
A últimas fechas la epigenética ha cobrado importancia en el entendimiento de diversos procesos fisiológicos, así como en el entendimiento de distintas entidades patogénicas.

En este contexto, los miRNAs, pequeños ncRNAs de un tamaño aproximado de 22 nt, clásicamente han sido descritos como un mecanismo de regulación postranscripcional negativo, siendo cada uno de ellos capaz de regular a varios mRNAs blancos, favoreciendo al silenciamiento de la traducción del mRNA o incluso, a la degradación de este.

Los miRNAs cuentan con la ventaja de que se pueden obtener en distintos tipos de tejidos, como lo es a nivel muscular, en orina o en suero. Existen diversos estudios que han analizado al patrón de expresión de distintos miRNAs en DMD. Por ejemplo, fue en el 2011 cuando Mizuno y colaboradores describieron en modelo murino y canino de DMD, la desregulación de 3 miRNAs (miR-1, miR-133a y miR-206) a nivel sérico, encontrándose sobre expresados a comparación de controles, nombrando a los mismos como distromiRNAs (49).

El presente trabajo se muestran datos obtenidos del análisis del perfil de expresión de miR-21-5p y miR-128-3p en el suero de pacientes con distrofia muscular de Duchenne, dos microRNAs que a la fecha de la realización de la presente tesis no se ha descrito cuál es su nivel de expresión en el suero de los pacientes con DMD.

De la población total de 29 pacientes con DMD, 23 de ellos aún preservaban la capacidad de ambulación independiente, mientras que 6 de ellos la habían perdido. De igual manera, y conforme a lo esperado, aquellos pacientes que había perdido la marcha independiente puntuaron más alto en las escalas de fuerza muscular, lo cual refleja una menor fuerza tanto de extremidades superiores como de las inferiores. En el presente trabajo se identificó una desregulación en la expresión de dos miRNAs, miR-21-5p y miR-128-3p, demostrándose que aquellos individuos que habían perdido la marcha independiente presentaban una menor expresión de ambos miRNAs.



En el trabajo publicado por Zanotti en el 2015 se identificó que miR-21-5p se encuentra sobre expresado en el músculo de pacientes con DMD de entre 1 y 8 años de edad a comparación de controles sanos (47). Es posible que en el músculo distrófico de los pacientes afectados por DMD se presente una sobreexpresión del miR-21-5p, sin embargo, es sabido que etapas avanzadas de la enfermedad como lo es cuando se pierde la capacidad de la marcha independiente, el tejido muscular es reemplazado por tejido fibroso y tejido adiposo, lo cual explicaría el origen en la disminución de los niveles séricos de miR-21-5p en pacientes que han perdido la deambulaci3n independiente.

Es necesario considerar que la membrana celular del músculo distr3fico se vuelve permeable, lo que permite que los miRNAs escapen al espacio extracelular y se encuentre a nivel sérico. Otra posibilidad que existe es que el principal origen de miR-21-5p en el suero de los pacientes con DMD no sean las células musculares maduras sino los precursores de estas, los mioblastos, como se comenta en el trabajo realizado en el 2019 por Morgoulis, donde miR-21 se encuentra sobre expresado en los mioblastos de pacientes con DMD a comparación de mioblastos de controles (46).

En concordancia con nuestros hallazgos, Catapano y colaboradores reportaron que miR-21 se encuentra sub expresado en la orina de individuos DMD no ambulatorios en comparación de aquellos ambulatorios (45). Siguiendo a nuestros resultados, ya que los pacientes que han perdido la marcha independiente presentan menor expresi3n del miR-21-5p en suero, existiría un menor filtrado del mismo a nivel renal lo que ocasionaría a su vez menores niveles en orina.

Conforme a trabajos previos y al presente, está claro que miR-21-5p requiere de más estudios, ya que los niveles de expresi3n de este se relacionan al momento de la enfermedad en los pacientes con DMD.

De igual manera se identificó que miR-128-3p se encuentra sub expresado en el suero de los pacientes que habían perdido la marcha independiente a comparación de aquellos que aún la preservaban. Estudios previos han reportado que miR-128-3p se encuentra relacionado, entre otros procesos, al de regeneraci3n muscular, como lo reporta Shang en el 2021 (41). Esto se encuentra en concordancia con lo descrito por Gurinder en el 2020 el



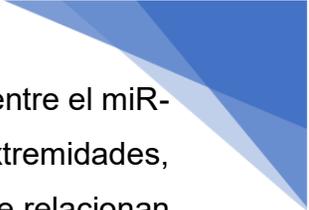
cual reportó que miR-128-3p favorece la diferenciación de los mioblastos a través de la regulación de una vía insulínica (57).

De igual manera en Shen en el 2019 en células derivadas de pollo demostró que miR-128-3p promueve la diferenciación de células satélite hacia células musculares maduras, logrando este proceso a través de la inhibición de la miostatina (48). Tomando en cuenta estos antecedentes, existe una concordancia con nuestro hallazgo de como en etapas tardías de la enfermedad, donde la regeneración muscular se encuentra disminuida debido al reemplazo de tejido muscular por tejido fibroso y adiposo, miR-128-3p se encuentra sub expresado. Existe la necesidad de estudiar con mayor profundidad a miR-128-3p en otro tipo de tejidos en pacientes con DMD, como lo es a nivel de células musculares, mioblastos o incluso en orina, para contar con más evidencia que explique el comportamiento de este miRNA en pacientes con DMD.

A su vez se realizó un análisis entre los niveles de expresión sérica de miR-21-5p y miR-128-3p con la edad de los pacientes, la cual se encontraba entre 3 y 15 años de edad, esto con la finalidad de evaluar la expresión de estos miRNAs etapas intermedias de la enfermedad e independientemente de su estado ambulatorio, identificando que a mayor edad los niveles séricos de ambos miRNAs tienden a disminuir. Esto concuerda con el análisis realizado con el estado ambulatorio, ya que son los individuos de mayor edad los que pierden la capacidad de la marcha.

Al momento de buscar una asociación entre las escalas que evalúan a la fuerza muscular y los miRNAs, se identificó que a mayores niveles de expresión de miR-21-5p se conservaba mayor fuerza en las extremidades inferiores a través de la escala de Vignos.

Es de llamar la atención que no se logró identificar una correlación significativa entre la expresión de miR-21-5p con la escala de GMFCS, la cual también evalúa la fuerza muscular de las extremidades inferiores, probablemente secundario a que dicha escala contiene menos categorías en su puntaje. Tampoco se identificó una relación con la escala de Brooke, probablemente debido a que la afectación de las extremidades superiores se suele presentar en individuos de mayor edad. Idealmente en estudios posteriores se debe de identificar una relación dicha escala con la expresión de miR-21-5p en pacientes de mayor edad.



Donde sí se logró identificar una correlación estadísticamente significativa fue entre el miR-21-5p con el de la fuerza muscular de la MRC, la cual evalúa la fuerza de las 4 extremidades, lográndose apreciar que unos mayores niveles de la expresión de miR-21-5p se relacionan con una mayor fuerza muscular, reflejando la relación previamente mencionada de fuerza muscular de miembros inferiores con miR-21-5p. No se halló una asociación entre las escalas de fuerza y función muscular con los niveles de expresión de miR-128-3p.

Estos datos muestran que es miR-21-5p el que se correlaciona de mejor manera con las escalas, sobre todo con las de la función de extremidades inferiores y de la fuerza, a comparación de miR-128-3p. Podemos hipotetizar que es miR-21-5p presenta, al menos en cierto grado, un mayor grado de tropismo por el músculo esquelético, y que su expresión se relaciona en mayor medida con la fuerza y funciones musculares; mientras que, a pesar de que miR-128-3p disminuye su concentración sérica con la evolución de la enfermedad, puede ser que su origen no solamente provenga de músculo sino también de algún otro tipo de tejido.

De igual manera se analizaron marcadores de daño muscular, como lo son la CK, la AST y la ALT, detectando mayores concentraciones séricas en aquellos individuos que preservaban la capacidad de deambulación independiente. Actualmente los niveles de CK se han utilizado como parte del abordaje diagnóstico de la DMD, sin embargo las concentraciones de la CK se pueden ver modificadas por la edad, la actividad física, el uso de fármacos o incluso enfermedad renal (50).

Los niveles de AST y la ALT son estudios que se utilizan rutinariamente para demostrar la función hepática. Consecuentemente, en niños sanos, el análisis de estas enzimas hepáticas se realiza más frecuentemente que el análisis de la CK, la cual resulta ser un marcador más específico de daño muscular. En un estudio realizado en el 2015 en una población de 120 pacientes con DMD se identificó que hasta el 97% de ellos presentaban una elevación de los niveles séricos de ALT y AST. Aunque dichas enzimas presentan una elevación sérica con el daño muscular también pueden encontrarse elevadas con el daño hepatocelular, lesión cardíaca, renal, de eritrocitos o incluso lesión pulmonar (51). Debido a que las 3 moléculas son marcadores de daño muscular, al existir una mayor cantidad de este tejido en las primeras etapas de la enfermedad, podría explicar porque la expresión de



las 3 moléculas tiende a disminuir con la edad, al existir un reemplazo de tejido muscular por tejido fibroso y adiposo.

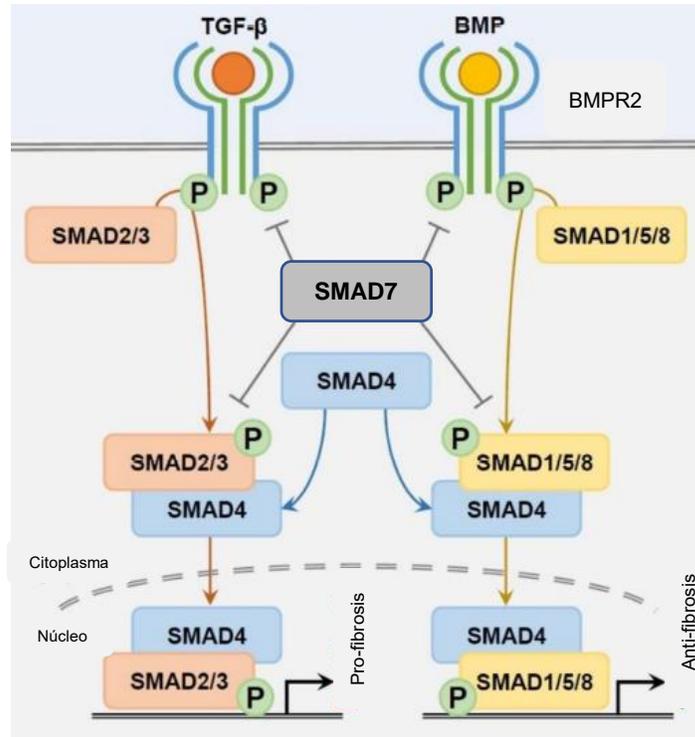
Se logró identificar que tanto miR-21-5p como miR-128-3p se correlacionan con los marcadores enzimáticos de daño muscular, probablemente secundario a que existir mayor tejido muscular existe una mayor liberación hacia suero de los marcadores enzimáticos y de ambos miRNAs.

Para lograr una comprensión con mayor profundidad sobre el papel de miR-21-5p y miR-128-3p como probables reguladores de la fibrosis, se realizó un análisis *in silico*, en primer lugar, para lograr identificar a los genes blanco de ambos miRNAs y posteriormente para identificar a las vías de los mRNA blanco que contaran con un mayor grado de enriquecimiento.

Se logró identificar que miR-21-5p tiene como blanco a 30 mRNA los cuales coincidieron en 3 distintas plataformas, mientras que miR-128-3p tiene como blancos a 26 mRNA. También se observó que 6 mRNAs se encontraban regulados por ambos miRNAs. Entre los mRNA que se encontraban regulados por ambos miRNAs se encuentra a BMPR2 el cual codifica para una cinasa serina/treonina transmembrana.

Hipotetizamos que, al menos en cierto grado, la regulación de la vía de TGF- $\beta$  por parte de miR-21-5p y miR-128-3p se realiza a través de BMPR2. Se ha demostrado que las vías de señalización TGF- $\beta$  y de BMP presentan cierta redundancia biológica, activando a moléculas en común río abajo. Aunque ambas vías son activadas por diferentes ligandos y diferentes receptores tienen en común a SMAD4, la cual se transloca al núcleo en conjunto con complejos proteicos SMAD favoreciendo la expresión génica (**Fig. 26**) (52).

En el estudio realizado por Zhang en el 2020 menciona que la vía de BMP actúa como contrapeso de TGF- $\beta$ , siendo una vía anti fibrótica. Una posibilidad que existe que explicaría el mecanismo de como miR-21-5p y miR-128-3p potencia a la vía de TGF- $\beta$  es que al existir una inhibición de la vía BMP las moléculas SMAD4 que normalmente sería utilizadas en esta vía permanezcan libres para ser utilizadas por la vía de TGF- $\beta$ , potenciando a esta vía y la fibrosis.



**Fig. 26 I** Esquema sobre las vías TGF-  $\beta$  y BMP Tomada y modificada de Zhang, 2020.

Posteriormente a través de la plataforma ShinyGO se buscó identificar a los procesos biológicos y la función molecular con mayor grado de enriquecimiento de los mRNA blancos regulados por miR-21-5p y miR-128-3p. En términos generales, aquellos mRNA blancos de ambos miRNAs participa simultáneamente en distintos procesos biológicos, lo que significa que tienen un rango amplio de funcionalidad biológica.

Aquellas vías enriquecidas de los mRNA blancos regulados por miR-21-5p son muy variadas en cuanto a sus funciones. Interesantemente, la tercera vía con mayor grado de enriquecimiento es la regulación negativa de la vía de señalización BMP. Llama la atención que dentro de los mRNA que participan en esa vía se encuentra al previamente mencionado BMPR2, además de UBE2D3 y SMAD7. SMAD7 actúa como un regulador negativo de la vía de TGF-  $\beta$ , como lo describe Cui en el 2019, donde identifica que miR-21-5p como un regulador de la fibrosis en modelo tendinoso (53).

Secundario al silenciamiento de SMAD7 debido a la acción de miR-21-5p, existiría una disminución en la inhibición de la vía de TGF-  $\beta$ , favoreciendo la expresión de los genes de



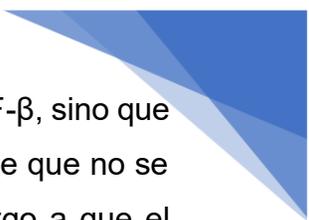
esa vía. La regulación de la vía BMP por parte de miR-21-5p fue contrastada en plataforma de análisis *in silico*, como lo es metascape, la cual la identificó como vía con el mayor grado de enriquecimiento.

Por su parte las vías en la que participan los mRNA regulados por miR-128-3p con un mayor grado de enriquecimiento fueron las relacionadas con el desarrollo pulmonar. Es probable que el desarrollo pulmonar sea regulado por gran cantidad de moléculas la participación de miR-128-3p sea relativamente pequeña. De igual manera llama la atención que se menciona al proceso de neurogénesis y desarrollo neuronal como vías enriquecidas, teniendo en cuenta que entre un 20-30% de los pacientes con DMD pueden tener alteraciones de perfil cognitivo (53). Será importante identificar en estudios posteriores cuales son los mecanismos fisiopatológicos de esta relación de los pacientes con DMD y alteraciones cognitivas.

Como se ha mencionado uno de los principales actores en el proceso de fibrosis son los fibroblastos, los cuales producen a distintos componentes de matriz extracelular. Entre las principales moléculas que actúan como reguladoras de la activación de fibroblastos se encuentra TGF-  $\beta$ , la cual ha sido estudiada en diversos procesos patogénicos, entre los que se encuentra la DMD (28,30,31).

Existen a su vez distintas moléculas reguladoras de TGF-  $\beta$ , entre las que se encuentran diversos miRNAs, entre ellos a miR-21-5p (70,71) y miR-128-3p (72). Contrario con lo reportado por Morgoulis en el 2019 no se logró identificar una asociación directa entre la expresión sérica de miR-21-5p con los niveles de TGF- $\beta$ . Una de posibles orígenes de esto es que Morgoulis estudió la expresión tanto de miR-21-5p como de TGF-  $\beta$  en células musculares, mientras que nuestro estudio lo realizó a nivel sérico, pudiendo ser que la influencia de miR-21-5p sobre TGF-  $\beta$  sea mayor a nivel muscular de lo que lo es a nivel sistémico.

Será necesario evaluar la expresión de ambas moléculas en una población de mayor tamaño, así como en distintos momentos de la enfermedad. Tampoco se identificó una asociación entre la expresión de TGF- $\beta$  con la expresión de miR-128-3p. Hipotetizamos que, aunque diversos estudios han encontrado una participación de miR-128-3p en la vía de



TGF-  $\beta$  (58, 59, 61), no ejerce su efecto directamente sobre la expresión de TGF- $\beta$ , sino que lo realice sobre moléculas que se encuentran río abajo en dicha vía. A pesar de que no se halló que TGF-  $\beta$  se relacione con la edad puede ser secundario este hallazgo a que el rango de edad de los pacientes en los que se estudió esta molécula fue pequeño, encontrándose entre los 3 y los 8 años. Otra posibilidad es que debido a que esta molécula no es específica del tejido muscular, sintetizándose en otros tejidos como el óseo, adiposo y fibrótico; por lo que la disminución de la masa muscular tendría poca influencia en las concentraciones séricas de TGF- $\beta$ .

Es de llamar la atención como el único parámetro metabólico que presentaba una diferencia significativa entre el grupo de pacientes ambulatorios y aquellos no ambulatorios es el del colesterol total, teniendo una mediana de hasta 40 mg/dL mayor en el grupo de aquellos ambulatorios. Amor y colaboradores en el 2021 estudiaron el perfil de expresión de miRNAs en el suero de 54 pacientes afectados por DMD, logró identificar que los mRNAs blancos que eran regulados por los miRNAs desregulados se identificó que el metabolismo lipídico puede ser una alteración clave en la DMD. En dicho estudio, al investigar el músculo esquelético de modelo murino mdx se reconoció una desregulación de los factores de transcripción del colesterol y de ácidos grasos (SREBP1 y SREBP2), alteración de la vía del mevalonato y un acúmulo de colesterol en el músculo estriado (54).

Será interesante que en estudios posteriores se corrobore este hallazgo en pacientes afectados por DMD. Hipotetizamos que si las células musculares de individuo DMD también presentan un acumulo de colesterol, al haber daño de la membrana de estas podría existir una liberación del colesterol al espacio extracelular, lo que explicaría por qué las concentraciones son mayores en etapas en donde el tejido muscular es mayor.

Nadarajah y colaboradores identificaron que la MMP-9, proteína remodeladora de la matriz extracelular, muestra una disregulación a nivel sérica en los pacientes con DMD, encontrándose más elevada en el suero de pacientes con DMD a comparación de controles sanos. Ellos igual reportaron que los pacientes no ambulatorios mostraban mayores niveles a comparación de aquellos ambulatorios (25). Sin embargo, en nuestra población no identificamos una diferencia de la expresión de MMP-9 según el estado ambulatorio ni una asociación con la edad, por lo que se necesitan estudios a futuro de dicha molécula.

## 18 CONCLUSIONES

Los niveles séricos de miR-21-5p y miR-128-3p son menores en el suero de los pacientes con distrofia muscular de Duchenne que han perdido la capacidad de marcha independiente a comparación de aquellos que aún preservan la marcha independiente.

A su vez los niveles séricos de miR-21-5p y miR-128-3p disminuyen con la edad en los pacientes con distrofia muscular de Duchenne independientemente de su estado ambulatorio.

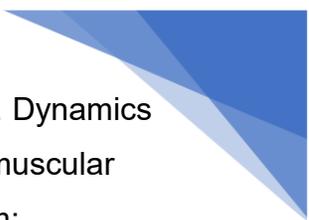
La expresión de miR-21-5p circulante se encuentra elevada en aquellos pacientes con mayor fuerza muscular, asociándose con la escala de Vignos y con el porcentaje del MRC. La elevación de los marcadores enzimáticos de daño muscular CK, AST y ALT se correlacionan con el incremento a nivel sérico de miR-21-5p y miR-128-3p.

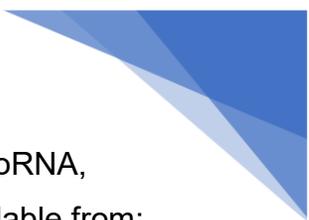
miR-21-5p y miR-128-3p comparten como blanco en común a BMPR2, molécula que participa en la vía de señalización de BMP, la cual comparte con la vía de TGF- $\beta$  moléculas en común río abajo en su señalización. miR-21-5p tiene como blanco a SMAD7, molécula inhibidora de la vía TGF- $\beta$ . No se identificó asociación entre los niveles séricos de TGF- $\beta$  con miR-21-5p y miR-128-3p.

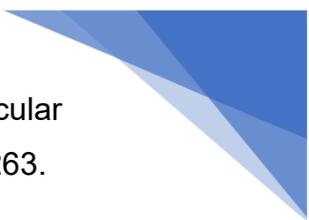
## 19 REFERENCIAS

1. Thangarajh M. The Dystrophinopathies. *Contin Lifelong Learn Neurol* [Internet]. 2019 Dec;25(6):1619–39. Available from: <http://journals.lww.com/00132979-201912000-00008>
2. Duan D, Goemans N, Takeda S, Mercuri E, Aartsma-Rus A. Duchenne muscular dystrophy. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2021 Dec 18;7(1):13. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41572-021-00248-3>
3. Nakamura A, Fueki N, Shiba N, Motoki H, Miyazaki D, Nishizawa H, et al. Deletion of exons 3–9 encompassing a mutational hot spot in the DMD gene presents an asymptomatic phenotype, indicating a target region for multiexon skipping therapy. *J Hum Genet* [Internet]. 2016 Jul 24;61(7):663–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/jhg201628>
4. Verma S, Anziska Y, Cracco J. Review of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) for the Pediatricians in the Community. *Clin Pediatr (Phila)* [Internet]. 2010 Nov 19;49(11):1011–7. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0009922810378738>
5. Servais L, Aubert G. Muscular Dystrophy. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 Dec 4;371(23):e35. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMicm1007790>
6. Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* [Internet]. 2016 Mar;53(3):145–51. Available from: <https://jmg.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jmedgenet-2015-103387>
7. Saito T, Kawai M, Kimura E, Ogata K, Takahashi T, Kobayashi M, et al. Study of Duchenne muscular dystrophy long-term survivors aged 40 years and older living in specialized institutions in Japan. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2017 Feb;27(2):107–14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960896616308471>
8. Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, Apkon SD, Blackwell A, Brumbaugh D, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *Lancet Neurol* [Internet]. 2018 Mar;17(3):251–67. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442218300243>
9. Grounds MD, Terrill JR, Al-Mshhdani BA, Duong MN, Radley-Crabb HG, Arthur PG.

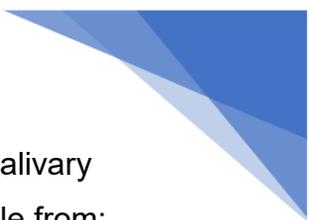
- 
- Biomarkers for Duchenne muscular dystrophy: myonecrosis, inflammation and oxidative stress. *Dis Model Mech* [Internet]. 2020 Feb 1;13(2):dmm043638. Available from: <http://dmm.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dmm.043638>
10. Starosta A, Konieczny P. Therapeutic aspects of cell signaling and communication in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2021 Apr 7; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-021-03821-x>
  11. Allen DG, Whitehead NP, Froehner SC. Absence of Dystrophin Disrupts Skeletal Muscle Signaling: Roles of Ca<sup>2+</sup>, Reactive Oxygen Species, and Nitric Oxide in the Development of Muscular Dystrophy. *Physiol Rev* [Internet]. 2016 Jan;96(1):253–305. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00007.2015>
  12. Millay DP, Sargent MA, Osinska H, Baines CP, Barton ER, Vuagniaux G, et al. Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy. *Nat Med* [Internet]. 2008 Apr 16;14(4):442–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm1736>
  13. Evans NP, Misyak SA, Robertson JL, Bassaganya-Riera J, Grange RW. Immune-Mediated Mechanisms Potentially Regulate the Disease Time-Course of Duchenne Muscular Dystrophy and Provide Targets for Therapeutic Intervention. *PM&R* [Internet]. 2009 Aug;1(8):755–68. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.pmrj.2009.04.010>
  14. Tidball JG, Welc SS, Wehling-Henricks M. Immunobiology of Inherited Muscular Dystrophies. In: *Comprehensive Physiology* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2018. p. 1313–56. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c170052>
  15. Zhou L, Lu H. Targeting Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2010 Aug 1;69(8):771–6. Available from: <https://academic.oup.com/jnen/article-lookup/doi/10.1097/NEN.0b013e3181e9a34b>
  16. Smith LR, Barton ER. Regulation of fibrosis in muscular dystrophy. *Matrix Biol* [Internet]. 2018 Aug;68–69:602–15. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X17304110>
  17. Kemaladewi DU, 't Hoen PA, ten Dijke P, van Ommen GJ, Hoogaars WM. TGF- $\beta$  signaling in Duchenne muscular dystrophy. *Future Neurol* [Internet]. 2012 Mar;7(2):209–24. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fnl.12.3>

- 
18. Malecova B, Gatto S, Etxaniz U, Passafaro M, Cortez A, Nicoletti C, et al. Dynamics of cellular states of fibro-adipogenic progenitors during myogenesis and muscular dystrophy. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Dec 10;9(1):3670. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-018-06068-6>
  19. Xu D, Li S, Wang L, Jiang J, Zhao L, Huang X, et al. TAK1 inhibition improves myoblast differentiation and alleviates fibrosis in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* [Internet]. 2021 Feb 25;12(1):192–208. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcsm.12650>
  20. Feder D, Rugollini M, Santomauro Jr A, Oliveira LP, Lioi VP, dos Santos R, et al. Erythropoietin reduces the expression of myostatin in mdx dystrophic mice. *Brazilian J Med Biol Res* [Internet]. 2014 Sep 5;47(11):966–71. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2014001100966&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2014001100966&lng=en&tlng=en)
  21. Kharraz Y, Guerra J, Pessina P, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P. Understanding the Process of Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014;2014:1–11. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/965631/>
  22. Chen X, Li Y. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle. *Cell Adh Migr* [Internet]. 2009 Oct 27;3(4):337–41. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cam.3.4.9338>
  23. Ogura Y, Tajrishi MM, Sato S, Hindi SM, Kumar A. Therapeutic potential of matrix metalloproteinases in Duchenne muscular dystrophy. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2014 Apr 1;2. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2014.00011/abstract>
  24. von Moers A, Zwirner A, Reinhold A, Brückmann O, van Landeghem F, Stoltenburg-Didinger G, et al. Increased mRNA expression of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and -2 in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2005 Apr 23;109(3):285–93. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00401-004-0941-0>
  25. Nadarajah VD, van 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). *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2011 Aug;21(8):569–78. Available from:

- 
- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960896611001489>
26. Gan J, Qu Y, Li J, Zhao F, Mu D. An evaluation of the links between microRNA, autophagy, and epilepsy. *Rev Neurosci* [Internet]. 2015 Jan 1;26(2). Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/revneuro-2014-0062/html>
  27. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell* [Internet]. 2018 Mar;173(1):20–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867418302861>
  28. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2018 Aug 3;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2018.00402/full>
  29. Sohn W, Kim J, Kang SH, Yang SR, Cho J-Y, Cho HC, et al. Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Med* [Internet]. 2015 Sep 18;47(9):e184–e184. Available from: <http://www.nature.com/articles/emm201568>
  30. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2015 Jun 22;15(6):321–33. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc3932>
  31. Hrach HC, Mangone M. miRNA Profiling for Early Detection and Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Sep 19;20(18):4638. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/18/4638>
  32. Cacchiarelli D, Legnini I, Martone J, Gazzella V, D'Amico A, Bertini E, et al. miRNAs as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2011 May 21;3(5):258–65. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/emmm.201100133>
  33. Llano-Diez M, Ortez CI, Gay JA, Álvarez-Cabado L, Jou C, Medina J, et al. Digital PCR quantification of miR-30c and miR-181a as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2017 Jan;27(1):15–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960896616302905>
  34. Zanotti S, Gibertini S, Blasevich F, Bragato C, Ruggieri A, Saredi S, et al. Exosomes and exosomal miRNAs from muscle-derived fibroblasts promote skeletal muscle fibrosis. *Matrix Biol* [Internet]. 2018 Dec;74:77–100. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X18301070>
  35. Zaharieva IT, Calissano M, Scoto M, Preston M, Cirak S, Feng L, et al. Dystromirs as

- 
- Serum Biomarkers for Monitoring the Disease Severity in Duchenne Muscular Dystrophy. Mouly V, editor. PLoS One [Internet]. 2013 Nov 25;8(11):e80263. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0080263>
36. Bica-Pop C, Cojocneanu-Petric R, Magdo L, Raduly L, Gulei D, Berindan-Neagoe I. Overview upon miR-21 in lung cancer: focus on NSCLC. Cell Mol Life Sci [Internet]. 2018 Oct 20;75(19):3539–51. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-018-2877-x>
  37. Cui H, He Y, Chen S, Zhang D, Yu Y, Fan C. Macrophage-Derived miRNA-Containing Exosomes Induce Peritendinous Fibrosis after Tendon Injury through the miR-21-5p/Smad7 Pathway. Mol Ther - Nucleic Acids [Internet]. 2019 Mar;14:114–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2162253118303007>
  38. Ardite E, Perdiguero E, Vidal B, Gutarra S, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P. PAI-1-regulated miR-21 defines a novel age-associated fibrogenic pathway in muscular dystrophy. J Cell Biol [Internet]. 2012 Jan 9;196(1):163–75. Available from: <https://rupress.org/jcb/article/196/1/163/36687/PAI1regulated-miR21-defines-a-novel-ageassociated>
  39. Li W, Yu X, Chen X, Wang Z, Yin M, Zhao Z, et al. HBV induces liver fibrosis via the TGF- $\beta$ 1/miR-21-5p pathway. Exp Ther Med [Internet]. 2020 Dec 25;21(2):169. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2020.9600>
  40. Dai Y, Zhang WR, Wang YM, Liu XF, Li X, Ding X Bin, et al. microRNA-128 regulates the proliferation and differentiation of bovine skeletal muscle satellite cells by repressing Sp1. Mol Cell Biochem [Internet]. 2016 Mar 1;414(1–2):37–46. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11010-016-2656-7>
  41. Shang Q, Shen G, Chen G, Zhang Z, Yu X, Zhao W, et al. The emerging role of miR-128 in musculoskeletal diseases. J Cell Physiol [Internet]. 2021 Jun 25;236(6):4231–43. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.30179>
  42. Singh GB, Cowan DB, Wang D-Z. Tiny Regulators of Massive Tissue: MicroRNAs in Skeletal Muscle Development, Myopathies, and Cancer Cachexia. Front Oncol [Internet]. 2020 Nov 23;10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.598964/full>
  43. Wang Y, Cai H, Li H, Gao Z, Song K. Atrial overexpression of microRNA-27b attenuates angiotensin II-induced atrial fibrosis and fibrillation by targeting ALK5. Hum Cell [Internet]. 2018 Jul 18;31(3):251–60. Available from:

- 
- <http://link.springer.com/10.1007/s13577-018-0208-z>
44. Cao F, Li Z, Ding W, Yan L, Zhao Q. LncRNA PVT1 regulates atrial fibrosis via miR-128-3p-SP1-TGF- $\beta$ 1-Smad axis in atrial fibrillation. *Mol Med* [Internet]. 2019 Dec 20;25(1):7. Available from: <https://molmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s10020-019-0074-5>
  45. Catapano F, Domingos J, Perry M, Ricotti V, Phillips L, Servais L, et al. Downregulation of miRNA-29, -23 and -21 in urine of Duchenne muscular dystrophy patients. *Epigenomics* [Internet]. 2018 Jul;10(7):875–89. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/epi-2018-0022>
  46. Morgoulis D, Berenstein P, Cazacu S, Kazimirsky G, Dori A, Barnea ER, et al. sPIF promotes myoblast differentiation and utrophin expression while inhibiting fibrosis in Duchenne muscular dystrophy via the H19/miR-675/let-7 and miR-21 pathways. *Cell Death Dis* [Internet]. 2019 Feb 28;10(2):82. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41419-019-1307-9>
  47. Zanotti S, Gibertini S, Curcio M, Savadori P, Pasanisi B, Morandi L, et al. Opposing roles of miR-21 and miR-29 in the progression of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2015 Jul;1852(7):1451–64. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443915001192>
  48. Shen X, Liu Z, Cao X, He H, Han S, Chen Y, et al. Circular RNA profiling identified an abundant circular RNA circTMTTC1 that inhibits chicken skeletal muscle satellite cell differentiation by sponging miR-128-3p. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2019;15(10):2265–81. Available from: <http://www.ijbs.com/v15p2265.htm>
  49. Mizuno H, Nakamura A, Aoki Y, Ito N, Kishi S, Yamamoto K, et al. Identification of Muscle-Specific MicroRNAs in Serum of Muscular Dystrophy Animal Models: Promising Novel Blood-Based Markers for Muscular Dystrophy. Pfeffer S, editor. *PLoS One* [Internet]. 2011 Mar 30;6(3):e18388. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0018388>
  50. Anaya-Segura M, García-Martínez F, Montes-Almanza L, Díaz B-G, Ávila-Ramírez G, Alvarez-Maya I, et al. Non-Invasive Biomarkers for Duchenne Muscular Dystrophy and Carrier Detection. *Molecules* [Internet]. 2015 Jun 17;20(6):11154–72. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/6/11154>
  51. Zhu Y, Zhang H, Sun Y, Li Y, Deng L, Wen X, et al. Serum Enzyme Profiles Differentiate Five Types of Muscular Dystrophy. *Dis Markers* [Internet]. 2015;2015:1–

- 
7. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/dm/2015/543282/>
52. Zhang X, Yun JS, Han D, Yook JI, Kim HS, Cho ES. TGF- $\beta$  Pathway in Salivary Gland Fibrosis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Nov 30;21(23):9138. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/23/9138>
53. Battini R, Chieffo D, Bulgheroni S, Piccini G, Pecini C, Lucibello S, et al. Cognitive profile in Duchenne muscular dystrophy boys without intellectual disability: The role of executive functions. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2018 Feb;28(2):122–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960896617313615>
54. Amor F, Vu Hong A, Corre G, Sanson M, Suel L, Blaie S, et al. Cholesterol metabolism is a potential therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* [Internet]. 2021 Jun 26;12(3):677–93. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcsm.12708>

## 20 ANEXOS

### 20.1 Sistema de clasificación en la escala de Vignos

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 las 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 férulas largas en 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.

## 20.2 Sistema de clasificación en la escala de Brooke

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 por encima de la cabeza solo si flexiona los codos (disminuyendo la circunferencia total del movimiento) o mediante el uso de los músculos 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 llevar las manos a la boca.
5. No puede llevar la mano a la boca, pero puede sostener una pluma o moneda de la mesa.
6. Sin función de manos.

### 20.3 Sistema de clasificación de la función motora gruesa (GMFCS, Gross Motor Function Classification Sytem)

Nivel 1. Camina sin limitación.

Nivel 2. Camina con limitación.

Nivel 3. Camina usando un aparato de movilidad de manos o pies (férulas).

Nivel 4. Movilidad personal con dificultad

Nivel 5. Transportado en silla de ruedas manual.

## 20.4 Escala Medical Research Council

Grado 5: Normal.

Grado 5 -: Debilidad perceptible.

Grado 4 +: Debilidad leve pero definitiva.

Grado 4: Mueve articulación contra la gravedad y poca resistencia.

Grado 4 -: Pone mínima resistencia.

Grado 3 +: Resistencia transitoria, pero colapsa abruptamente.

Grado 3: Movimiento activo contra la gravedad,

Grado 3 -: Puede mover contra gravedad, pero no en el rango total de movilidad.

Grado 2: Puede mover si la gravedad es eliminada

Grado 1: Se puede apreciar o palpar movimiento o contracción leve en el músculo

Grado 0: Ausencia total de movimiento

La fórmula para calcular el porcentaje de fuerza muscular mediante la escala MRC es la siguiente:

$\% \text{ MRC} = \text{Suma total del puntaje} \times 100 / \text{número de músculos valorados} \times 5$

## 20.5 Cronograma de actividades

	2021											2022										
	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	
Elección del tema	X	X																				
Revisión bibliográfica		X	X	X																		
Elaboración del protocolo				X	X																	
Protocolo enviado a SIRELCIS					X																	
Solicitud de autorización						X	X															
Recopilación de datos								X	X	X	X	X	X	X								
Análisis de resultados													X	X	X							
Elaboración de la tesis															X	X	X	X	X			
Presentación de examen																						X
Aprobación de examen																						X



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

**HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS  
R-2021-3603-039**

---

UMAE Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI, IMSS

---

FOLIO: \_\_\_\_\_ EDAD: \_\_\_\_\_

**DATOS DE LA EXPLORACIÓN FÍSICA**

Puntaje del Sistema de clasificación en la escala de Vignos.....\_\_\_\_\_

**DIAGNOSTICO MOLECULAR**

Variante patogénica\_\_\_\_\_

Metodología utilizada\_\_\_\_\_

**RESULTADO DE EXPRESIÓN DE miRNAs:**

miR-21-5p\_\_\_\_\_

miR-128-3p\_\_\_\_\_

## **CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

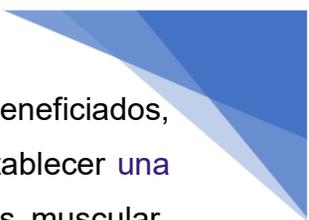
R-2021-3603-039

### **Aspectos éticos y legales**

Para realizar el presente proyecto de investigación hemos considerado las pautas de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos la cual fue adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial en Helsinki, Finlandia en junio 1964 y enmendada por la 64ª Asamblea General, en Fortaleza, Brasil de octubre 2013, en base a que todos participantes involucrados en este proyecto contamos con la formación y las calificaciones científicos y éticas apropiadas. Así mismo establecemos que los participantes en este estudio no serán afectados de manera adversa en su salud dado que tomaremos los datos que se encuentran anonimizados manteniendo de esa manera su confidencialidad. A su vez nos basamos también en la Ley General de Salud en el Título III, Capítulo III artículo 41bis, fracción II y el Título Quinto, Capítulo único, Artículo 100 y en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud en el Título II, Capítulo I, Artículos 13, 14, 16 y 17.

**Riesgo de la investigación.** Tomando en cuenta el artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud, consideramos que nuestro proyecto es una investigación sin riesgo dado que haremos una revisión de una base de datos que se encuentra anonimizada a manera de una investigación documental retrospectiva sin identificar a los sujetos ni tratar aspectos sensitivos de su conducta, dado que en dicha base de datos no existen identificadores personales pues cada paciente fue codificado con un folio.

**Confidencialidad y privacidad.** Los datos que pudieran ser utilizados para la identificación precisa del paciente (Nombre, número de seguridad social, dirección, teléfono) no serán registrados en este estudio, sino que serán substituidos por un sistema de codificación mediante folio por lo cual se mantendrán la confidencialidad y la privacidad de cada paciente. La información recopilada permanecerá en poder de los investigadores durante cinco años en sus dispositivos electrónicos posteriormente será eliminada.



**Beneficios posibles.** Los pacientes participantes en este estudio no se verán beneficiados, sin embargo, con la realización de este trabajo de investigación se busca establecer una relación entre los niveles séricos de los miRNAs con el proceso de fibrosis muscular, pudiendo utilizarse a los mismos en un futuro como biomarcadores de este mismo, esto con la finalidad de conocer la evolución de la enfermedad.

**Balance riesgo beneficio.** Debido a que se trata de un estudio descriptivo, el riesgo para los pacientes con su realización es prácticamente nulo considerando por una parte que se tomarán las medidas antes mencionadas para proteger la confidencialidad y la privacidad de cada uno de ellos. Y por otra parte, dado la naturaleza observacional del estudio no se les someterá a ninguna maniobra que pudiera comprometer su integridad de alguna manera. Los beneficios a futuro para otros pacientes se esperan que sean mayores al establecer dichos miRNAs como posibles biomarcadores del proceso de fibrosis muscular.

Por todo lo anterior se solicita la exención de la carta de consentimiento informado.