



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**MIRNAS CIRCULANTES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y SU ASOCIACIÓN CON EL DAÑO  
MUSCULAR EN LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. ALMEIDA BECERRIL TOMAS**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARICELA RODRÍGUEZ CRUZ**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. GUILLERMO AQUINO JARQUÍN**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**DR. FEDERICO ÁVILA MORENO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ENERO, 2024**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**MIRNAS CIRCULANTES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y SU ASOCIACIÓN CON EL DAÑO  
MUSCULAR EN LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. ALMEIDA BECERRIL TOMAS**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARICELA RODRÍGUEZ CRUZ**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. GUILLERMO AQUINO JARQUÍN**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**DR. FEDERICO ÁVILA MORENO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ENERO, 2024**

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ENTIDAD (FACULTAD DE MEDICINA)  
OFICIO: CGEP/CPCB/FMED/0780/2023  
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **08 de mayo de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **ALMEIDA BECERRIL TOMAS** con número de cuenta **307102908** con la tesis titulada **“MIRNAS CIRCULANTES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y SU ASOCIACIÓN CON EL DAÑO MUSCULAR EN LA Distrofia muscular de Duchenne”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARICELA RODRÍGUEZ CRUZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. CLARA ORTEGA CAMARILLO  
Vocal: DRA. DIANA BARRERA OVIEDO  
Vocal: DRA. ANA LILIA GARCÍA HERNÁNDEZ  
Vocal: DR. FAUSTO SÁNCHEZ MUÑOZ  
Secretario: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 27 de septiembre de 2023

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**

c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/RCHT/EARR/rcht



## *AGRADECIMIENTOS*

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por fortalecer mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado.

Este proyecto con número de registro R-2018-785-089 emitido por la Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), recibió el financiamiento FIS/IMSS/PROT/PRI0/19/117 del IMSS.

A la Dra. Maricela Rodríguez Cruz quien ha sido el pilar más importante en mi formación académica. He sido muy afortunado de ser guiado por una mujer investigadora admirable y con una gran calidez humana.

A los miembros del Comité tutor: Dr. Guillermo Aquino Jarquín y Dr. Federico Ávila Moreno por su compromiso con el proyecto y con mi formación académica a través de sus críticas y recomendaciones oportunas.

## ÍNDICE

Índice de figuras.

Índice de tablas.

Abreviaturas.

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	3
3. Introducción.....	5
3.1. Características clínicas de la distrofia muscular de Duchenne (DMD).....	5
3.2. Evaluación del daño muscular en los pacientes con DMD.....	5
3.2.1. <i>Escala de Vignos</i> .....	5
3.2.2. <i>Escala del Sistema de Clasificación de la Función Motora Gruesa (SCFMG)</i> .....	6
3.2.3. <i>Escala de Brooke</i> .....	6
3.2.4. <i>Escala del Medical Research Council (MRC)</i> .....	6
3.3. Etiología.....	6
3.4. Tratamiento.....	7
3.5. Fisiopatología de la DMD.....	7
3.6. Inflamación, degeneración y regeneración muscular en la DMD.....	8
3.7. Estrés oxidativo (EO).....	10
3.8. Mecanismos propuestos de regulación del EO en la DMD.....	11
3.8.1. <i>Enzimas del EO</i> .....	11
3.8.1.1. <i>Sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS)</i> .....	11
3.8.1.2. <i>Superóxido dismutasa (SOD)</i> .....	12
3.8.2. <i>El calcio intracelular en el EO</i> .....	12
3.8.3. <i>Los microRNAs en el EO</i> .....	13
3.8.4. <i>Los factores de transcripción Nrf1 y Nrf2 en el EO</i> .....	14
4. Antecedentes.....	15
4.1. MiRNAs y EO a nivel muscular.....	15
4.2. MiRNAs del EO y la DMD.....	16
4.3. Establecimiento de los distromiRs en la DMD.....	17
4.4. Liberación de miRNAs a circulación en la DMD.....	19
5. Justificación.....	20
6. Objetivos.....	21
6.1. Objetivo general.....	21
6.2. Objetivos particulares.....	21

7. Metodología.....	22
7.1. Características del estudio.....	22
7.2. Sujetos de estudio.....	22
7.3. Criterios de inclusión de los sujetos de estudio.....	22
7.4. Procedimientos el día de la cita del paciente.....	22
7.5. Grupos de estudio.....	23
7.6. Extracción y cuantificación de los miRNAs circulantes.....	23
7.6.1. <i>Extracción del RNA total</i> .....	23
7.6.2. <i>Síntesis del cDNA</i> .....	24
7.6.3. <i>Ensayos de Amplificación por PCR</i> .....	24
7.7. Parámetros de daño muscular.....	25
7.7.1. <i>Función y fuerza muscular</i> .....	25
7.7.2. <i>Parámetros enzimáticos de daño muscular</i> .....	26
7.8. Parámetros antropométricos.....	26
7.9. Indicadores metabólicos.....	26
7.10. Parámetros de actividad física.....	27
7.11. Frecuencia del consumo de alimentos antioxidantes.....	27
7.12. Análisis <i>in silico</i> de la predicción de los genes blancos relacionados con estrés oxidativo (REO).....	28
7.13. Marcadores circulantes de respuesta antioxidante.....	28
7.13.1. <i>Glutation</i> .....	28
7.13.2. <i>Nrf2</i> .....	29
7.14. Marcadores circulantes de daño oxidativo.....	29
7.14.1. <i>Malondialdehído</i> .....	29
7.14.2. <i>Proteínas carboniladas</i> .....	29
7.15. Análisis estadísticos.....	30
7.16. Aspectos éticos.....	30
7.17. Tipo de riesgo.....	31
7.18. Beneficios de participación.....	31
7.19. Principios éticos.....	31
7.19.1. <i>Carta de consentimiento y carta de asentimiento</i> .....	31
7.19.2. <i>Confidencialidad de la información de los pacientes</i> .....	31
7.19.3. <i>Riesgos</i> .....	32
7.20. Aspectos de bioseguridad.....	32
8. Resultados.....	33



8.1. Diagnóstico clínico y molecular de la DMD.....	33
8.2. Comparación de la edad, los parámetros clínicos y la frecuencia del consumo de entre los pacientes ambulatorios y no ambulatorios con DMD.....	36
8.3. DistromiRs y miRNAs REO circulantes en pacientes ambulatorios y no ambulatorios DMD y su correlación con el daño muscular.....	39
8.3.1. <i>DistromiRs</i> .....	39
8.3.2. <i>MiRNAs REO</i> .....	41
8.4. DistromiRs y miRNAs REO circulantes, y su correlación con los parámetros antropométricos, metabólicos, de actividad física y con la frecuencia del consumo de alimentos de los pacientes con DMD.....	43
8.5. Correlación entre los distromiRs y los miRNAs REO circulantes de los pacientes DMD.....	48
8.6. Marcadores circulantes de EO en los pacientes ambulatorios y no ambulatorios con DMD.....	49
8.6.1. <i>Marcadores circulantes antioxidantes</i> .....	49
8.6.2. <i>Marcadores circulantes de daño oxidativo</i> .....	49
8.7. Correlación de los marcadores circulantes del EO con los parámetros clínicos, los parámetros de actividad física y la frecuencia del consumo de alimentos antioxidantes pacientes con DMD.....	51
8.8. Correlación entre los marcadores de respuesta antioxidante y los marcadores de daño oxidativo circulantes de los pacientes con DMD.....	53
8.9. Correlación entre los marcadores del EO y la expresión de los miRNAs circulantes pacientes con DMD.....	54
8.10. Evaluación de las variables predictoras de la expresión de los miRNAs y de los marcadores del EO.....	55
9. Discusión.....	58
10. Conclusiones.....	66
11. Referencias bibliográficas.....	67
12. Anexos.....	78
12.1. Anexo 1. Artículo requisito para obtener el grado.....	78
12.2. Anexo 2. Carta de consentimiento informado.....	91
12.3. Anexo 3. Carta de asentimiento.....	95
12.4. Anexo 4. Escala de evaluación clínica para pacientes con DMD.....	97
12.5. Anexo 5. Antropometría.....	99
12.6. Anexo 6. Cuestionario de actividad física para niños (PAQ-C).....	100

12.7. Anexo 7. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos.....	104
12.8. Anexo 8. Tablas suplementarias.....	105

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> MiRNAs asociados con el proceso de regeneración muscular y el EO en la DMD.....	18
<b>Figura 2.</b> Variantes patogénicas del gen <i>DMD</i> de la población de estudio.....	35
<b>Figura 3.</b> DistromiRs circulantes en pacientes con DMD con diferente grado de daño muscular.....	40
<b>Figura 4.</b> MiRNAs REO circulantes de pacientes con DMD con diferente grado de daño Muscular.....	42
<b>Figura 5.</b> Marcadores circulantes del EO de pacientes con DMD con diferente grado de daño muscular.....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> MiRNAs circulantes analizados.....	24
<b>Tabla 2.</b> Características clínicas de los pacientes con DMD.....	34
<b>Tabla 3.</b> Comparación de la edad, los parámetros clínicos y la frecuencia de consumo de alimentos entre los pacientes ambulatorios y no ambulatorios con DMD.....	37
<b>Tabla 4.</b> Correlación de la edad, los parámetros clínicos y la frecuencia del consumo de alimentos con la expresión de los miRNAs circulantes de los pacientes con DMD.....	45
<b>Tabla 5.</b> Matriz de correlaciones entre los distromiRs y los miRNAs REO circulantes de los pacientes con DMD.....	48
<b>Tabla 6.</b> Correlación de la edad, los parámetros clínicos y la frecuencia del consumo de alimentos antioxidantes con los marcadores circulantes de EO de los pacientes con DMD.....	52
<b>Tabla 7.</b> Matriz de correlaciones entre los marcadores de respuesta antioxidante y los marcadores de daño oxidativo circulantes de los pacientes con DMD.....	54
<b>Tabla 8.</b> Correlación de la expresión de los miRNAs con la concentración de los marcadores de EO circulantes de los pacientes con DMD.....	55
<b>Tabla 9.</b> MLGU para evaluar las variables predictoras de la expresión del distromiR circulante miR-1-3p de los pacientes con DMD.....	56
<b>Tabla 10.</b> MLGU para evaluar las variables predictoras de Nrf2 circulante de los pacientes con DMD.....	57

## ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferasa.
Amb	Ambulatorio.
AST	Aspartato aminotransferasa.
CDC	Centro para el control y prevención de las enfermedades, significado en español.
CDG	Complejo distrofina-glicoproteína.
CPK	Creatina fosfocinasa.
C-VLDL	Colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad, significado en español.
Dup	Duplicación.
Eli	Eliminación
EO	Estrés oxidativo.
ERO	Especie reactivas de oxígeno.
FCAA	Frecuencia del consumo de alimentos antioxidantes.
HOMA-IR	Modelo homeostático de evaluación de resistencia a la insulina, significado en español.
IMC	Índice de masa corporal.
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social.
INF- $\gamma$	Interferón- $\gamma$
IL-1	Interleucina-1 $\beta$ .
IL-4	Interleucina-4.
IL-6	Interleucina-6.
IL-10	Interleucina-10.
MAFG	Oncogén homólogo G de fibrosarcoma aviar músculo apaneurótico.
MDA	Malondialdehído.
mg/dL	Miligramos sobre decilitro.
$\mu$ U/mL	Micro unidades sobre mililitro.
MLGU	Modelo lineal general univariado.
MLPA	Amplificación de sondas múltiples ligadas, significado en español.
mPCR	Reacción en cadena de la polimerasa multiplex, significado en español.
MPO	Mieloperoxidasa.

MRC	Medical Research Council.
NFκB	Factor de transcripción nuclear kappa B.
nNOS	Sintasa de óxido nítrico neural.
NO	Óxido nítrico.
NOD2	NADPH oxidasa 2.
Nrf2	Factor nuclear eritroide 2, significado en español.
PAQ-C	Cuestionario de actividad física.
REO	Relacionados con estrés oxidativo.
SCFMG	Sistema de Clasificación de Función Motora Gruesa.
Sec	Secuenciación.
SOD2	Superóxido dismutasa 2.
SOD3	Superóxido dismutasa 3.
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, significado en español.
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α.
U/L	Unidades sobre litro.
UIMN	Unidad de Investigación Médica en Nutrición.
UMAЕ	Unidad Médica de Alta Especialidad

## 1. RESUMEN

---

### *Introducción.*

La distrofia muscular de Duchenne es la distrofia muscular de mayor severidad en la niñez, como resultado de las mutaciones genéticas presentes en el gen *DMD* conduciendo a la ausencia de la proteína distrofina. La falta de la proteína distrofina provoca daño al sarcolema y degeneración muscular, dando lugar a la pérdida de la capacidad de ambulación entre los 9 y 12 años con muerte prematura durante la tercera década de vida por falla cardíaca o respiratoria.

Durante la historia natural de la DMD, el daño muscular provoca inflamación crónica y estrés oxidativo (EO). Además, entre las diferentes aberraciones moleculares, se ha descrito la presencia de patrones de miRNAs participando también en la fisiopatología de la DMD (distromiRs); sin embargo, los distromiRs circulantes no han sido evaluados en función del daño muscular a nivel clínico.

### *Objetivos.*

El objetivo de este trabajo fue evaluar si los distromiRs (miR-1-3p, miR-133a-3p y miR-206), los miRNAs relacionados a estrés oxidativo (REO) (miR-21-5p, miR-31-5p, miR-128-3p y miR-144-3p), así como un grupo de marcadores de EO (Nrf2, glutation, malondialdehído y proteínas carboniladas) se asocian con el daño muscular y con parámetros metabólicos en pacientes con DMD.

### *Materiales y métodos.*

Veintinueve pacientes con DMD fueron incluidos en el presente estudio de manera transversal y comparativa. Las escalas clínicas para evaluar el daño muscular fueron la escala de Vignos, del SCFMG, de Brooke y del Medical Research Council. Se midieron parámetros enzimáticos de daño muscular tales como CPK, ALT y AST, parámetros antropométricos, indicadores metabólicos, actividad física, distromiRs (miR-1-3p, miR-133a-3p y miR-206), miRNAs REO (miR-21-5p, miR-31-5p, miR-128-3p y miR-144-3p), Así como marcadores de EO (Nrf2, glutation, malondialdehído y proteínas carboniladas) en pacientes ambulatorios y no ambulatorios con DMD.

### *Resultados.*

Los niveles de distromiRs y miRNAs REO fueron menores en pacientes no ambulatorios en contraste de pacientes ambulatorios; la expresión de dichos miRNAs correlacionó con el puntaje de la escala de Vignos, así como con la escala de función y fuerza muscular, además de las concentraciones bioquímicas de CPK, AST y ALT. Por otro lado, nuestro análisis *in silico* arrojó que 97 genes se encuentran relacionados con el EO como potenciales genes blancos de los miRNAs evaluados en el presente trabajo.

Respecto al análisis bioquímico del EO, la concentración de Nrf2 fue menor, mientras que la concentración de malondialdehído fue mayor en los pacientes no ambulatorios comparados con los pacientes ambulatorios. La concentración de Nrf2 correlacionó con la edad y con la escala de Vignos, así como con la escala de SCFMG y el puntaje de la escala de Brooke. Por último, la concentración de MDA correlacionó con los puntajes de la escala de Vignos y de Brooke.

### *Conclusiones.*

Los pacientes no ambulatorios con DMD mostraron menores niveles de los distromiRs y los miRNAs REO en circulación en comparación con los pacientes ambulatorios. El daño muscular progresivo se asoció con la disminución en la expresión de los miRNAs estudiados evidenciando el progreso de la DMD. Por otro lado, los pacientes con menor función muscular poseen un mayor daño oxidativo y menor capacidad antioxidante comparados con los pacientes con mejor función muscular. Estos resultados aportan información molecular nueva sobre la historia natural de la DMD.

**Palabras clave:** Distrofia muscular de Duchenne, miRNAs, estrés oxidativo, daño muscular.



## 2. ABSTRACT

---

### *Introduction.*

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most severe dystrophy in childhood because of genetic mutations in the *DMD* gene leading to the absence of protein dystrophin. The lack of dystrophin triggers sarcolemmal breakage and muscle degeneration giving rise to loss of ambulation between 9 and 12 years of age, with death in the late 20s caused by respiratory or heart failure.

During the natural history of DMD, muscle injury provokes chronic inflammation and oxidative stress (OS). In addition, between the molecular aberrations, there have been described the presence of different miRNAs involved in DMD pathophysiology (distromiRs); however, circulating distromiRs miRNAs have not been evaluated in terms of muscle injury at a clinical level.

### *Objectives.*

This study aimed to evaluate whether the circulating distromiRs (miR-1-3p, miR-133a-3p, and miR-206), a group of oxidative stress-related (OS-R) miRNAs (miR-21-5p, miR-31-5p, miR-128-3p, and miR-144-3p) and OS markers (Nrf2, glutation, malondialdehyde, and protein carbonyl) are associated with muscle injury and circulating metabolic parameters in DMD patients.

### *Material and Methods.*

Twenty-nine DMD patients were included in this cross-sectional study. Clinical scales to evaluate muscle injury (Vignos, GMFCS, Brooke, and Medical Research Council), enzymatic muscle injury parameters (CPK, ALT, and AST), anthropometry, metabolic indicators, physical activity, serum dystromiRs (miR-1-3p, miR-133a-3p, and miR-206), OS-R miRNAs (miR-21-5p, miR-31-5p, miR-128-3p, and miR-144-3p) and OS markers (Nrf2, glutation, malondialdehyde, and protein carbonyl) were measured in ambulatory and non-ambulatory DMD patients.

### *Results.*

The levels of dystromiRs and OS-R miRNAs were lower in the non-ambulatory group than in the ambulatory group; the expression of these miRNAs correlated with the Vignos scale score, and

with other muscle strength and function scale scores, CPK, AST and ALT concentration. Additionally, our *in silico* analysis showed that 97 genes are related to OS as potential target genes of miRNAs evaluated in this study.

Regarding the biochemical analysis of OS, Nrf2 concentration was lower and MDA concentration was higher in non-ambulatory patients than in ambulatory patients. Nrf2 concentration correlated with age, Vignos scale, GMFCS scale, and Brooke scale scores. MDA concentration correlated with Vignos and Brooke scale scores.

### *Conclusions.*

Non-ambulatory DMD patients showed lower levels of circulating dystromiRs and OS-R miRNAs levels than ambulatory DMD patients. The progressive muscle injury is associated with a decrease in the expression of those miRNAs studied, evidencing DMD progress. On the other hand, patients with lower muscle function have higher oxidative damage and lower antioxidant capacity than DMD patients with better muscle function. These findings add new information about the natural history of DMD.

**Key words:** Duchenne muscular dystrophy, miRNAs, oxidative stress, muscle damage.

### 3. INTRODUCCIÓN

---

#### 3.1. Características clínicas de la distrofia muscular de Duchenne.

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad hereditaria músculo degenerativa y es la distrofia más común en la niñez con una incidencia de 1 en 3600 varones con esperanza promedio de vida de hasta 30 años (Emery, 1998; Bushby *et al.*, 1991).

En un contexto general, la manifestación clínica más importante en la DMD es la debilidad en los músculos de la cadera y los proximales a esta. Los primeros síntomas empiezan a partir de la edad preescolar (2-5 años) y consisten en dificultad para caminar (pasos cortos con movimientos suaves de lado a lado, marcha en puntas y posición lordótica). Durante el progreso de la enfermedad se presenta pseudohipertrofia en pantorrillas, signo de Gowers (el paciente no logra levantarse sin apoyo, para hacerlo debe ayudarse con los brazos sobre las rodillas para incorporarse en posición vertical), caídas frecuentes y dificultad para subir las escaleras (Verma *et al.*, 2010).

De los 6 a los 8 años, el deterioro muscular de los pacientes con esta distrofinopatía se vuelve más evidente, y entre los 9 y 12 años empieza a manifestarse escoliosis y pérdida de ambulación (Wong y Christopher, 2002; Verma *et al.*, 2010). El constante daño muscular conduce al deceso de estos pacientes por insuficiencia respiratoria o cardíaca como consecuencia del debilitamiento de músculos que participan en ambas funciones (Hwa *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2010).

#### 3.2. Evaluación del daño muscular en los pacientes con DMD.

La progresión de la enfermedad se evalúa mediante diversas herramientas clínicas que tienen como objetivo medir la fuerza y función muscular en los pacientes con DMD. Entre estas herramientas se encuentran las escalas que se describen a continuación y que son las más empleadas en la práctica clínica.

##### 3.2.1. Escala de Vignos.

La escala de Vignos incluye diez grados (1-10) de función muscular; el grado 1 se refiere a que el paciente es capaz de caminar y subir las escaleras sin asistencia; mientras que el grado 10, de menor función muscular, significa que el paciente está postrado en la cama (Vignos y Archibald, 1960).

### 3.2.2. Escala del Sistema de Clasificación de la Función Motora Gruesa (SCFMG).

La escala del SCFMG tiene un puntaje mínimo de 1 y un puntaje máximo de 5. El puntaje mayor representa el peor grado de función muscular (Palisano *et al.*, 1997).

### 3.2.3. Escala de Brooke.

La escala de Brooke evalúa seis grados (1-6) de función muscular; el grado 1 se refiere a que el paciente es capaz de levantar los brazos realizando un círculo completo hasta que éstos se toquen por arriba de la cabeza; mientras que el grado 6 que es el nivel más bajo de función muscular en esta escala, significa que el paciente no tiene una función útil con sus manos; por ejemplo, es incapaz de llevar éstas hacia la boca (Brooke *et al.*, 1981).

### 3.2.4. Escala del Medical Research Council (MRC).

La escala del MRC permite explorar la intensidad del déficit muscular valorando cualitativamente la fuerza muscular mediante la observación de la contracción de algunos músculos. Esta escala otorga una puntuación de 0 a 5 según la fuerza desarrollada por el paciente (Compston, 1942), donde el valor máximo corresponde a una mayor intensidad de fuerza muscular.

## 3.3. Etiología.

La DMD es una enfermedad con un patrón de herencia de tipo recesivo ligado al cromosoma X, donde se presentan mutaciones en el gen de la distrofina que pueden ser eliminaciones, duplicaciones o mutaciones puntuales y generan un fenotipo casi totalmente (>97%) carente de la proteína llamada distrofina (Hoffman *et al.*, 1987; Nicholson *et al.*, 1990; Emery, 1998; Singh *et al.*, 2006; Grounds *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2013).

El gen de la distrofina (*DMD*) se encuentra en el *locus* Xp21.2, es el gen más grande del humano con un tamaño de 2.6 Mb, contiene 79 exones, codifica para un mRNA de 14 kb y se traduce a una proteína de 427 kDa (Nowak y Davies, 2004; Singh *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2013).

El gen *DMD* tiene dos regiones llamadas “*hot spots*” en las cuales las eliminaciones y las duplicaciones se presentan con mayor frecuencia. El “*hot spot*” menor incluye a los exones 2 al 20 (30% de los casos con DMD), mientras que el “*hot spot*” mayor incluye a los exones 44 al 53 (70% de los casos con DMD) (Forrest *et al.*, 1988; den Dunnen *et al.*, 1989; Koenig *et al.*, 1989; Hu *et al.*, 1990). Las eliminaciones genéticas en el gen *DMD* pueden cambiar (posterior al *splicing*) el marco de lectura abierto de la traducción del mRNA formando un codón de paro prematuro evitando la síntesis completa de la proteína distrofina (Monaco *et al.*, 1988).

### **3.4. Tratamiento.**

El tratamiento integral de los pacientes diagnosticados con DMD incluye terapia con glucocorticoides (Prednisolona y Deflazacort, principalmente), rehabilitación cardíaca, respiratoria y ortopédica. Esto para mejorar la calidad, salud y esperanza de vida de los pacientes (Bushby *et al.*, 2009).

Los glucocorticoides representan la única intervención farmacológica para disminuir la progresión del debilitamiento muscular, escoliosis, insuficiencia respiratoria, el proceso inflamatorio y retrasar la pérdida de la ambulación por aproximadamente dos años (Ricotti *et al.*, 2013; Bushby *et al.*, 2009). Sin embargo, dichos fármacos se asocian a varios efectos secundarios adversos como desarrollo de obesidad (Bonifati *et al.*, 2000), desmineralización ósea (Khalid, 2011), retardo en el crecimiento (Foster *et al.*, 2004), cambios en el comportamiento (Stuart *et al.*, 2005), hipertensión (Balaban *et al.*, 2005), intolerancia a la glucosa, gastritis, reflujo gastroesofágico (Bushby *et al.*, 2009), úlcera péptica (Brunton *et al.*, 2005) y mioglobinuria (Garrood *et al.*, 2008).

### **3.5. Fisiopatología de la DMD.**

La distrofina se localiza debajo del sarcolema, hacia el citoplasma de la célula muscular, manteniendo la unión entre el resto del complejo distrofina-glicoproteína (CDG) con las fibras de actina. El CDG es una estructura que proporciona estabilidad mecánica al sarcolema del músculo estriado durante la contracción y la relajación ya que forma una conexión directa entre las miofibrillas (maquinaria contráctil), el sarcolema y la matriz extracelular (Hoffman *et al.*, 1987; Grounds *et al.*, 2005; Kosek y Bamman, 2008; Prins *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2013).

La distrofina mantiene la fuerza, la flexibilidad y la estabilidad de las fibras musculares (Davies y Nowak, 2006). Si la distrofina está ausente a consecuencia de una mutación en el gen *DMD*, la miofibrilla se vuelve frágil y su sarcolema se rompe fácil y aceleradamente por efecto del estrés mecánico; particularmente, después de las contracciones sostenidas (Grounds *et al.*, 2005; Deconinck y Dan, 2007). Así que, se considera que dicha ruptura del sarcolema es el evento primario que desregula el metabolismo celular en la DMD (Grounds *et al.*, 2008).

La ausencia de la distrofina y la ruptura del sarcolema provoca desorganización de la matriz extracelular, la entrada descontrolada de calcio a la célula muscular, la salida de creatina fosfoquinasa (CPK), ausencia de sitios de anclaje para la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS, por sus siglas en inglés), generación exacerbada de especies reactivas de oxígeno (ERO) e inflamación crónica (Andrews, 2005; Deconinck y Dan, 2007; Han, 2011; Shin *et al.*, 2013).

Lo anterior desencadena dos procesos claves en la fisiopatología de la DMD; inflamación y estrés oxidativo (EO), que en conjunto contribuyen a generar ciclos repetidos de necrosis en el tejido muscular y de regeneración muscular a partir de las células satélite, este último como mecanismo compensatorio. Sin embargo, con el tiempo disminuye el número de células satélites musculares y la capacidad regenerativa se reduce de manera importante reemplazando el tejido muscular dañado por tejido adiposo y conectivo (Emery 1990; Grounds *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2015; Guiraud *et al.*, 2015).

Al ser la inflamación y el EO los procesos clave en el progreso de la DMD, es importante la identificación de moléculas o genes que participen en la regulación de dichos eventos lo cual podría repercutir clínicamente en la generación y eficacia de terapias que impacten en tales mecanismos.

### **3.6. Inflamación, degeneración y regeneración muscular en la DMD.**

La regeneración del músculo esquelético está mediada principalmente por células satélites que están localizadas debajo de la lámina basal de las miofibras (Mauro 1961; Relaix y Zammit, 2012).

Las células satélites se encuentran normalmente en un estado quiescente y pueden ser activadas para dar origen a mioblastos que serán diferenciados a miocitos para reparar el músculo dañado en la DMD (Emery 2002; Morgan y Zammit, 2010). En el músculo carente de proteína distrofina se desencadenan ciclos repetidos de degeneración y regeneración, ambos procesos controlados por células del sistema inmunológico y las citocinas secretadas (Madaró y Bouché, 2014). Durante el proceso degenerativo, el músculo dañado en la DMD libera citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interferón gama (IFN-  $\gamma$ ), interleucina -1 $\beta$  (IL-1) e interleucina-4 (IL-4) entre otras. Dichas citocinas ocasionan el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos hacia el músculo dañado (Shireman *et al.*, 2007).

La función de los neutrófilos radica en la actividad fagocítica para remover la *debris* generada por el daño muscular, además de liberar grandes concentraciones de la citocina TNF- $\alpha$  como estímulo de activación del sistema inmunológico entre otros hacia células T cooperadoras (Th1), producción de mieloperoxidasa (MPO) y la producción de anión superóxido promoviendo daño al sarcolema el cual se incrementa de manera progresiva debido a estos dos últimos eventos (Nguyen *et al.*, 2005; Hodgetts *et al.*, 2006).

Por otro lado, se han identificado dos poblaciones de macrófagos presentes en el proceso de degeneración y regeneración muscular, identificados como M1 y M2. En este sentido, la población M1 poseen capacidad proinflamatoria, caracterizados por secretar diferentes citocinas, entre otras tales como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e interleucina-6 (IL-6), las cuales son reguladas por el factor de transcripción nuclear kappa B (NF $\kappa$ B). Así mismo, dichas citocinas son capaces de promover la fagocitosis de células musculares generando especies reactivas de oxígeno (ERO) induciendo lisis celular (Brack *et al.*, 2007; Reid y Li, 2001).

Mientras que la población de macrófagos M2 posee capacidad antiinflamatoria y se caracterizan por secretar diferentes citocinas antiinflamatorias, entre otras como interleucina-10 (IL-10) que promueve la transición de macrófagos M1 a macrófagos M2 promoviendo la respuesta inmunológica antiinflamatoria e induciendo la proliferación de células satélite musculares para promover la regeneración muscular (Brack *et al.*, 2007; Reid y Li, 2001).

Otros tipos celulares asociados a la DMD son los eosinófilos, los cuales se han observado infiltrados en el músculo distrófico empleando el modelo animal de la DMD (Ratón *mdx*), como en el tejido muscular de pacientes con DMD (Wehling-Henricks *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2000).

Debido a la permanencia del daño muscular, la respuesta inmune proinflamatoria contribuye hacia la necrosis. Siendo esta última, la cual se asocia a la constante regeneración muscular hasta que se agota la capacidad regenerativa y el músculo es reemplazado por tejido fibroso y adiposo (Villalta *et al.*, 2009; Morgan y Zammit, 2010).

La información anterior demuestra que en la DMD se genera inflamación crónica, aumentando el daño muscular, reflejado en el debilitamiento del tejido muscular sugiriendo que las citocinas circulantes podrían contribuir al daño muscular (Bowie y O'Neill, 2000; Tidball y Wehling-Henricks, 2007).

Esta hipótesis se basa en un estudio realizado por nuestro grupo de investigación, en donde se detectó que los pacientes con DMD que presentan mejor función muscular poseen concentraciones más elevadas de las citocinas IL-1 y TNF- $\alpha$  comparados con el grupo de pacientes con menor función muscular. Lo anterior revela que los pacientes en la etapa temprana de la enfermedad poseen mayor inflamación sistémica en comparación con la etapa tardía de la enfermedad (Cruz *et al.*, 2015). Con base en dicho estudio, se demuestra que la respuesta inflamatoria crónica se establece desde la etapa temprana de la DMD, en la cual participa el EO de acuerdo con las diferentes evidencias que se mencionan a continuación.

### **3.7. Estrés oxidativo (EO).**

Una de las características más importantes de la fisiopatología de la DMD es la generación de ERO. En este sentido, las ERO representan moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, otorgándoles una configuración altamente reactiva o inestable a las moléculas (Mayor, 2010). Las ERO se producen durante una gran variedad de procesos metabólicos que participan en mantener la homeostasis celular. Sin embargo, un exceso en su producción resulta dañino para los componentes biológicos celulares, principalmente para las macromoléculas como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos (Terrill *et al.*, 2013).



Cuando las ERO aumentan ocasionan un desbalance en relación con las moléculas antioxidantes y se presenta un proceso bioquímico conocido como estrés oxidativo (EO) (Kim *et al.*, 2013), condición que se ha observado en diferentes patologías como la DMD (Haycock *et al.*, 1996; Rodríguez y Tarnopolsky, 2003) así como en su modelo animal; es decir el modelo *mdx* (Kaczor *et al.*, 2007; Hauser *et al.*, 1995; Ragusa *et al.*, 1997). Esta evidencia generó estudios enfocados en analizar el EO en la DMD. En este sentido los hallazgos demuestran que la deficiencia de distrofina está relacionada con el incremento del daño oxidativo de macromoléculas. Por ejemplo, se ha observado un incremento de peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y DNA oxidado en pacientes con DMD, así como en el ratón *mdx* (Kim *et al.*, 2013), lo que conduce hacia un estado de debilidad muscular (Terrill *et al.*, 2013).

### **3.8. Mecanismos propuestos de regulación del EO en la DMD.**

La información mostrada sugiere que el EO contribuye de manera importante en la fisiopatología de la DMD a través de diferentes mecanismos, en los cuales participan diferentes enzimas entre las cuales destacan nNOS y superóxido dismutasa (Kozakowska *et al.*, 2015), el calcio intracelular (Peng y Jou, 2010), microRNAs como miR-144 y miR-128 (Banerjee *et al.*, 2017) y factores de transcripción (Petrillo *et al.*, 2017) que se describen a continuación.

#### *3.8.1. Enzimas del EO.*

##### *3.8.1.1. Sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS).*

La sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS, por sus siglas en inglés) forma parte del complejo distro-glicano (CDG) y se ancla directamente a este complejo en dominios de la distrofina. Así que, en ausencia de la distrofina, la nNOS se encuentra deslocalizada del CDG y bajo esta condición, la concentración de nNOS en músculo es <20% comparada con la cantidad presente en el músculo sano. Lo anterior marca el inicio de la generación de EO (Brenman *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1996) ya que la producción de óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés) mediada por esta enzima, está reducida, lo cual conduce a un aumento de superóxido ya que el NO inhibe la actividad de la NADPH oxidasa (NOX2); por lo que, a bajas concentraciones de NO, se reduce la inhibición enzimática, provocando la generación constante de anión superóxido (Chang *et al.*, 1996; Cave *et al.*, 2005).

### 3.8.1.2. *Superóxido dismutasa (SOD).*

La enzima superóxido dismutasa se encarga de la reducción del anión superóxido e incluye a tres variantes: la superóxido dismutasa 1 (SOD1) que se localiza en el citoplasma, la superóxido dismutasa 2 (SOD2) en la mitocondria y la superóxido dismutasa 3 (SOD3) extracelular (Cristiana *et al.*, 2014). Se ha observado que la baja actividad muscular, como es el caso de los pacientes con DMD, incrementa la actividad de la superóxido dismutasa SOD2, la cual convierte al superóxido en peróxido de hidrógeno, asociado con la peroxidación lipídica y agravando el daño a las membranas lipídicas de células musculares en la DMD (Tidball y Wehling-Henricks, 2007; Lawler *et al.*, 2003; Rando *et al.*, 1998).

Adicionalmente a la generación de ERO por parte de los miocitos, las células del sistema inmune circulantes como los neutrófilos y los macrófagos que llegan al músculo dañado también producen ERO a través de NADPH oxidasa (NOX) y el desacople de nNOS causando así el daño de las fibras musculares e impactando probablemente en su función (Whitehead *et al.*, 2008; Williams y Allen, 2007). Esta propuesta es apoyada por resultados previos de nuestro grupo de investigación, en donde sugerimos que el nivel de EO podría tener un impacto en la función muscular. Los hallazgos muestran que los pacientes no ambulatorios con DMD presentan mayor daño oxidativo debido a la mayor concentración plasmática de NO y malondialdehído (MDA) como indicador de lipoperoxidación y menor concentración de grupos tiol como indicador de oxidación proteica, comparado con pacientes con DMD en condición ambulatoria (Almeida-Becerril *et al.*, 2021).

### 3.8.2. *El calcio intracelular en el EO.*

Como se explicó anteriormente, la ausencia de la distrofina conduce a ruptura del sarcolema aumentando el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en citoplasma y posteriormente en mitocondria, lo que estimula la producción de ERO (Rando, 2002). Aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual el  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial estimula la producción de ERO, se ha propuesto que lo hace a través de la estimulación de la tasa metabólica, activándose la producción de óxido nítrico y el efecto de este último sobre los complejos respiratorios aumentando la producción de anión superóxido y de peróxido de hidrógeno lo que conduce a la disociación del citocromo C y lipoperoxidación de la cardiolipina (Peng y Jou *et al.*, 2010).

### 3.8.3. *Los microRNAs en el EO.*

Los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNAs no codificantes que en su versión madura alcanzan una extensión de 18-23 nucleótidos capaces de regular negativamente los niveles del transcrito sintetizados durante la transcripción y, por consiguiente, interviene en el patrón de expresión final de genes que codifican para diferentes vías intracelulares, entre otras, como las metabólicas contribuyendo en el mantenimiento de la homeostasis celular. Sin embargo, esta homeostasis se pierde en algunas patologías como en la DMD (Baker *et al.*, 2016).

Debido a que el EO se relaciona con el daño a tejidos en diferentes enfermedades, han surgido cada vez más estudios enfocados a explorar las interacciones que regulan la señalización intracelular óxido-reducción y con la presencia de miRNAs asociados a diferentes enfermedades (Banerjee *et al.*, 2017). No obstante, a la fecha no existen reportes enfocados al conocimiento de estas interacciones en la DMD.

Dada la participación de los miRNAs en el metabolismo celular, ha surgido el interés de estudiarlos en diferentes fluidos como suero y plasma desde hace aproximadamente 10 años. El primer estudio reportado en el 2008 demostró por primera vez que los miRNAs extracelulares están presentes en biofluidos como suero y plasma (Mitchel *et al.*, 2008).

En este sentido, el análisis de biofluidos es ampliamente utilizado en la práctica clínica contribuyendo al diagnóstico y el monitoreo de enfermedades en humanos. La molécula detectable más común para el diagnóstico en los pacientes con DMD es la isoforma músculo específica de la enzima creatina fosfocinasa (CPK, por sus siglas en inglés). La concentración más elevada de CPK se detecta en el suero de pacientes con DMD a edades tempranas y disminuye en concentración con la edad como consecuencia de la degeneración e inactividad progresiva del músculo (Zatz *et al.*, 1991; Burch *et al.*, 2015). Aunque, la CPK se emplea como un biomarcador en este tipo de distrofia, no necesariamente se asocia con la función muscular (Kim *et al.*, 2010).

Si bien, se ha demostrado experimentalmente que los niveles elevados de ERO provocan daño intracelular, también actúan como moléculas de señalización intracelular en procesos como diferenciación celular, crecimiento, muerte celular y senescencia. Esto hace importante la regulación de los niveles de ERO, por lo que es indispensable conocer los mecanismos que

mantiene dicha homeostasis como la participación de los miRNAs; como ejemplo, la desregulación de niveles fisiológicamente normales de miRNAs circulantes podrían conducir a daño oxidativo (Banerjee *et al.*, 2017).

#### 3.8.4. *Los factores de transcripción Nrf1 y Nrf2 en el EO.*

Los factores transcripcionales nuclear eritroide 1 (Nrf1) y nuclear eritroide 2 (Nrf2) son capaces de controlar de manera indirecta la generación de ERO regulando la expresión genética de diferentes enzimas antioxidantes; sin embargo, Nrf1 es capaz de regular la respuesta antioxidante en la mitocondria (Sangocoya *et al.* (2010). A pesar de que estos factores son reguladores maestros del EO, existen pocos estudios en la DMD. La poca evidencia sugiere su asociación con algunos miRNAs que se describen a continuación en los antecedentes.

## 4. ANTECEDENTES

---

### 4.1. MiRNAs y EO a nivel muscular.

Existe evidencia científica de que algunos miRNAs se encuentran en el músculo sano del humano y que participan en la regulación del EO. Un ejemplo de estos miRNAs es el miR-144 que participa en la regulación del factor de transcripción maestro Nrf2, como se describe a continuación.

En un estudio realizado por Sangocoya *et al.* (2010) se encontró que el miR-144 regula directamente la expresión del gen *NRF2*. Dicha contribución se basa en sus observaciones sobre cultivo celular de reticulocitos en donde se mutaron los dominios de *NRF2* a los cuales se une miR-144 lo que disminuyó la transcripción de *NRF2* impactando en las enzimas antioxidantes reguladas por este factor transcripcional. Interesantemente este miRNA también se ha identificado en músculo esquelético de humano, en el músculo cardíaco y en circulación en modelo de ratón *mdx*.

Otro miRNA que participa en la regulación del EO es el miR-128. Caggiano *et al.* (2017) estudiaron este miRNA en músculo esquelético encontrando que dicho miRNA inhibe al oncogen homólogo G de fibrosarcoma aviar músculo aponeurótico (MAFG, por sus siglas en inglés) regulador transcripcional de respuesta antioxidante. Los resultados de este estudio demostraron que la mutación del sitio de unión en MAFG bloquea la unión del miR-128 activándose la expresión de MAFG. Dado que MAFG forma un heterodímero con NFR2 para incrementar la capacidad antioxidante de las células, los autores de este estudio proponen que el miR-128 es un regulador del EO a través de MAFG.

Otro miRNA que posee función en el evento del EO es el miR-21 capaz de inhibir la conversión de superóxido a peróxido de hidrógeno por la interacción directa con la proteína superóxido dismutasa 3 (SOD3) Zhang *et al.*, (2012). En un estudio realizado por Zanotti *et al.*, (2015) se cuantificó el miRNA-21 en biopsia muscular de sujetos con DMD de 1-8 años ( $n = 14$ ) y en un grupo de sujetos control pareados por edad ( $n = 11$ ), encontrando que los niveles del miR-21 se encuentran elevados en los pacientes con DMD, lo que indicaría un acumulo de superóxido; sin embargo, a la fecha no se sabe si este miRNA se encuentra en circulación.

Aunque se han propuesto otros miRNAs (miR-26b, miR-301b y miR-224) asociados al EO, no se ha demostrado de manera experimental su posible participación en el músculo esquelético. Basado en lo anterior, a continuación, solo decidimos describir a los miR-144, miR-128 y miR-21 ya que cuentan con la evidencia experimental que sustenta su presencia en el músculo esquelético. Sin embargo, a la fecha se desconoce si estos miRNAs guardan una relación con el daño muscular en los pacientes con DMD y si su expresión se modifica en los pacientes con diferente daño muscular de la distrofia. No obstante, el único miRNA asociado a EO, el cual se ha detectado desregulado en la DMD es el miR-31.

#### **4.2. MiRNAs del EO y la DMD.**

Greco *et al.*, (2009) realizaron un estudio para identificar los miRNAs expresados en biopsias de músculo esquelético. El estudio incluyó pacientes con DMD ( $n = 12$ ) en un rango de edad de  $1.6 \pm 1.2$  años, así como un grupo control de niños clínicamente sanos ( $n = 10$ ) en un rango de edad de  $2.1 \pm 2.5$  años. Los hallazgos de esta investigación mostraron que 11 miRNAs se encontraban desregulados, entre ellos miR-31, el cual se detectó sobre expresado en el tejido muscular de los pacientes con DMD.

Russell *et al.* (2013) encontraron una disminución del miR-31 en biopsias de músculo esquelético de sujetos sanos después de realizar actividad física. Además, observaron una asociación negativa entre la cantidad del miR-31 y la expresión proteica de NRF1.

El avance en el análisis de los miRNAs también ha tenido un impacto en la identificación de éstos en la DMD. Importantemente, la mayoría de los estudios en la DMD reportan la presencia (en biopsias musculares y/o en circulación) de algunos miRNAs asociados a regeneración y/o degeneración muscular, dichos miRNAs son principalmente miR-1, miR-133 y miR-206 y se han propuesto como biomarcadores, sin embargo, se requieren profundizar para consolidar las evidencias para describir un panel de miRNAs involucrados en el daño muscular en diferentes etapas de la enfermedad. Estos miRNAs han sido los más ampliamente estudiados en la DMD por lo cual se han denominado distromiRs y se describen a continuación.

### 4.3. Establecimiento de los distromiRs en la DMD.

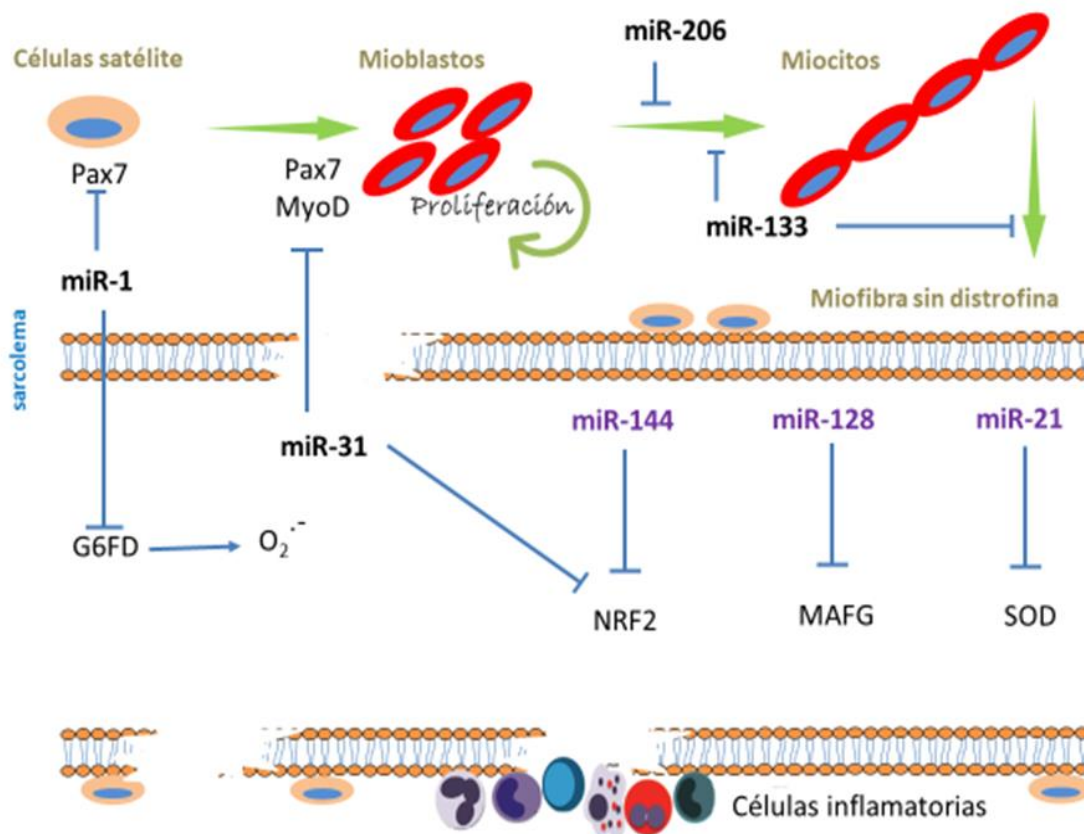
Las células satélites son la fuente principal de nuevos mionúcleos para el crecimiento de miofibras debido a su capacidad de proliferación y diferenciación (Zammit *et al.*, 2006). La formación de miofibras nuevas está regulada entre otras cosas por factores de transcripción maestros como Pax 7 y factores reguladores miogénicos (Von Matzahn *et al.*, 2013). Pax7 tiene motivos específicos para activar la expresión de genes asociados a la regulación de proliferación y diferenciación de las células satélite (Soleimani *et al.*, 2012). Pax7 es un gen blanco del miRNA-1 y miR-206, la unión de estos distromiRs a los *motivos* de Pax7 resulta en la disminución de la expresión de este factor de transcripción impactando en la correcta regeneración muscular, así que, la inhibición de ambos distromiRs incrementa los niveles de Pax7 y la proliferación de células satélite (Chen *et al.*, 2010).

Por otro lado, el distromiR-133 reprime la expresión de SRF, un factor de transcripción que aumenta la expresión de miR-1 y miR-133. miR-133 suprime la proliferación de mioblastos y promueve la diferenciación celular por regulación de MAPK (Liu *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2013).

Zaharieva *et al.*, (2013) analizaron los miRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206 y miR-31 en suero de 16 pacientes no ambulatorios con DMD de 10-17 años y de un grupo de 14 sujetos sanos de 3-16 años. Los resultados de este estudio mostraron niveles elevados de los distromiRs; miR-1, miR-206, miR-133a y miR-133b; pero miR-31 no alcanzó diferencias significativas en los pacientes con DMD en comparación con los sujetos sanos. Consistentemente, Matsuzaka *et al.*, (2014) y Hu *et al.*, (2014) también encontraron elevados estos miRNAs en el suero de 5 pacientes con DMD (5 a 18 años); sin embargo, no encontraron diferencias con respecto a su grupo control en los niveles de los miRNAs en 7 pacientes con DMD de mayor edad (27 a 31 años) (Figura 1).

En ese mismo año, otro grupo de investigación observó resultados similares en los miRNAs circulantes ya mencionados, siendo la edad de los sujetos de estudio de  $7.88 \pm 1.86$  años en un grupo de 39 pacientes con DMD y de  $7.79 \pm 2.12$  en el grupo de 6 sujetos control (Hu *et al.*, 2014). En este mismo estudio se observó una asociación inversa entre los niveles de los miRNAs miR-1 ( $r = -0.40$   $p = 0.02$ ) y miR-206 ( $r = -0.43$   $p = 0.01$ ) con la fuerza muscular medida por extensión de rodilla.

Asimismo, Li *et al.* (2014) además de comprobar que los miR-1, miR-133a y miR-206 están aumentados en suero de pacientes con DMD, encontraron otros tres miRNAs asociados a la proliferación, diferenciación, y regeneración muscular que también se encuentran aumentados en el suero de pacientes con DMD: el miR-499 (se encuentra en fibras musculares de contracción muscular lenta y en el músculo cardiaco) y el miR-208a (se localiza en el músculo cardiaco), y el miR-208b (se encuentra en fibras musculares de contracción muscular lenta), comparando un grupo de 52 pacientes con DMD menores de 6 años con un grupo control de 23 sujetos sanos menores de 6 años.



**Figura 1. MiRNAs asociados con el proceso de regeneración muscular y el EO en la DMD.** MAFG = oncogen homólogo G de fibrosarcoma aviar músculo aponeurótico; Nrf2 = Factor nuclear eritroide 2; SOD = Superóxido dismutasa; G6FD = Glucosa -6- fosfato deshidrogenasa; MyoD = Proteína 1 de diferenciación miogénica.



La información que hemos descrito indica que los distromiRs están asociados al proceso de regeneración muscular, por lo que, el análisis bioinformático (*in silico*) nos podría proporcionar información acerca de los posibles blancos de los distromiRs que participen en el EO. Actualmente se ha propuesto que los miRNAs son uno de varios factores importantes que regulan la fisiopatología de la enfermedad.

Aunque los miRNAs pueden tener varios genes blancos impactando en diferentes vías de señalización, en las bases de datos existen registros de la afinidad entre miRNAs y sus genes blancos, lo que permitiría seleccionar sólo aquellos involucrados en el EO (Bentwich, 2005).

#### **4.4. Liberación de miRNAs a circulación en la DMD.**

El proceso de liberación de miRNAs es importante para interpretar la relevancia clínica de sus niveles alterados en circulación. Inicialmente se asumía que los miRNAs circulantes eran liberados de fibras dañadas; sin embargo, se ha mostrado que no necesariamente todos los miRNAs se comportan de esa forma (Coenen-Stass *et al.*, 2017). Por ejemplo, la expresión del miR-1 y miR-133 disminuye en el músculo esquelético del ratón *mdx* y está elevado en suero, pero no se ha considerado si esta diferencia está dada por el daño muscular. Sin embargo, el miR-206 está elevado en músculo y también en el suero del ratón *mdx* (Roberts *et al.*, 2012). Lo anterior sugiere que la liberación podría ser selectiva para ejercer su función de manera endocrina, aunque esto no se ha confirmado (Coenen-Stass *et al.*, 2017).

Con base en la literatura sobre los miRNAs, se ha propuesto un modelo, en el cual se sugiere que los miotubos que se encuentran en diferenciación, secretan miRNAs para activar a células satélite y entonces amplificar la respuesta regenerativa e incluso facilitar la comunicación entre otro tipo de células como células de sistema inmune, miofibroblastos y progenitores fibroadipogénicos. Asimismo, los autores proponen que dichos miRNAs pueden ser liberados a circulación (Coenen-Stass *et al.*, 2017).

## 5. JUSTIFICACIÓN

---

Con base a la información anterior, proponemos primeramente identificar si la expresión de los distromiRs (miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-206) y los miRNAs REO (miR-21-5p, miR-31-5p, miR-128-3p, miR-144-3p) se asocian con el daño muscular. Dicho abordaje nos permitirá proponer si los miRNAs están relacionados con la fisiopatología de la enfermedad para saber si su expresión permite dar seguimiento al avance de la enfermedad. Además de que podrían proponerse como moléculas diana a nivel de regulación genética en intervenciones terapéuticas en pacientes con DMD.

Por otro lado, una de las observaciones más importantes reportada por diferentes grupos de investigación que proponen nuevos tratamientos para la DMD es que deben evaluar íntegramente la efectividad de los tratamientos en los diferentes mecanismos de la fisiopatología de la enfermedad; destacando como principal interés el patrón de miRNAs circulantes presentes en pacientes con DMD como lo señala Coenen-Stass *et al.* (2017).

Con base en todo lo anterior, las bases moleculares del EO en la DMD no se han dilucidado completamente por lo que contribuir en el estudio de las moléculas de EO en la DMD resulta de importancia para conocer más sobre dichos mecanismos en la fisiopatología de la enfermedad que permita generar evidencia solida para impactar de manera más eficiente sobre la terapia a nivel de antioxidantes en la DMD.

## 6. OBJETIVOS

---

### 6.1. Objetivo general.

Determinar si los distromiRs (miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-206), los miRNAs relacionados a estrés oxidativo (REO) (miR-21-5p, miR-31-5p, miR-128-3p, miR-144-3p) y los marcadores de estrés oxidativo circulantes se asocian con el daño muscular de los pacientes con DMD.

### 6.2. Objetivos particulares.

- Analizar si hay diferencias en la expresión de los distromiRs y los miRNAs REO circulantes en pacientes con DMD que presentan diferente grado de daño muscular y edad.
- Determinar si la expresión de los miRNAs está asociada con los parámetros de daño muscular.
- Determinar si la expresión de los miRNAs está asociada con los parámetros antropométricos, los indicadores metabólicos, la actividad física y la frecuencia del consumo de alimentos.
- Identificar mediante un análisis *in silico*, los genes blancos asociados al EO de los miRNAs de estudio.
- Analizar si hay diferencias en las concentraciones plasmáticas de los marcadores antioxidantes (Nrf2 y glutatión) y los marcadores de daño oxidativo (MDA y proteínas carboniladas) en pacientes con DMD diferente grado de daño muscular.
- Determinar si la concentración plasmática de los marcadores antioxidantes (Nrf2 y glutatión) así como de daño oxidativo (MDA y proteínas carboniladas) está asociada al daño muscular.
- Determinar si la concentración plasmática de los marcadores antioxidantes (Nrf2 y glutatión) así como de daño oxidativo (MDA y proteínas carboniladas) está asociada a los parámetros antropométricos, los parámetros metabólicos, la actividad física y la frecuencia de consumo de alimentos de los pacientes con DMD.

## **7. METODOLOGÍA**

---

### **7.1. Características del estudio.**

El estudio fue descriptivo, observacional, transversal y prospectivo. Se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Nutrición (UIMN) de la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund” del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN-SXXI), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

### **7.2. Sujetos de estudio.**

Veintinueve pacientes de 3 a 15 años con DMD fueron reclutados de 3 hospitales de la Ciudad de México: UMAE Hospital de Pediatría del CMN-Siglo XXI, UMAE Hospital General “Dr. Gaudencio González Garza” del CMN-La Raza (IMSS) y del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” de la Secretaría de Salud (SS).

### **7.3. Criterios de inclusión de los sujetos de estudio.**

Los criterios de inclusión fueron los siguientes: I) Pacientes con diagnóstico clínico y molecular de DMD, este último por reacción múltiple en cadena de la polimerasa (PCR multiplex, por sus siglas en inglés) o por amplificación de sondas dependientes de ligandos múltiples (MLPA, por sus siglas en inglés). II) Carta de consentimiento informado firmada por los padres de cada paciente, donde aceptan que su representado participe en el proyecto de investigación (Anexo 2). III) Asentimiento de los pacientes < 8 años o carta de asentimiento para los pacientes ≥ 8 años, donde el paciente señala que acepta participar en el proyecto de investigación (Anexo 3). IV) Que los pacientes no se encontraran en tratamiento con corticosteroides u otros antiinflamatorios. V) Que los pacientes no consumieran suplementos alimenticios antioxidantes.

### **7.4. Procedimientos el día de la cita del paciente.**

Se programó una cita en ayuno de 12 horas para cada paciente en la UIMN de la UMAE Hospital de Pediatría del CMN-SXXI, IMSS. Se colectó una muestra sanguínea de 3mL en un tubo Vacutainer™ con gel separador y otra muestra sanguínea de 3mL en un tubo Vacutainer™ con EDTA como anticoagulante.

Ambos tubos se centrifugaron a 3500 rpm (12 cm de radio del rotor) por 10 minutos a 5°C para la obtención del suero y del plasma, respectivamente en cada tubo. El plasma y suero sanguíneo se alicuotaron en tubos viales (AXYGEN® 1500µL, Reynosa, México) que se almacenaron a -70°C hasta su uso.

En el suero se midió la expresión de los distromiRs, la expresión de los miRNAs REO, los parámetros enzimáticos de daño muscular y los parámetros metabólicos. En el plasma se midieron los marcadores circulantes de daño oxidativo y antioxidantes.

Después de tomar la muestra de sangre, se midieron los parámetros clínicos de daño muscular (escalas de función y fuerza muscular), y se registraron las medidas antropométricas. Finalmente, los padres de los pacientes respondieron un cuestionario de datos generales, de actividad física y un cuestionario semicuantitativo de frecuencia de consumo de alimentos. Los detalles de la información anterior se describen más adelante.

## **7.5. Grupos de estudio.**

Para alcanzar los objetivos propuestos, los pacientes con DMD se clasificaron de dos maneras: En función de la ambulación (pacientes ambulatorios y pacientes no ambulatorios) y en función de la edad (<9 años y >9 años).

## **7.6. Extracción y cuantificación de los miRNAs circulantes.**

### *7.6.1. Extracción del RNA total.*

El RNA total se extrajo de una muestra de 200 µL de suero mediante el kit miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN®, Hilden, Alemania). El RNA total fue cuantificado en un espectrofotómetro EPOCH 2 Microplate (BioTek Instruments, Inc. Vermont, EUA) que utiliza el Software Gen5™ (BioTek Instruments, Inc. Vermont, EUA) para la colección de datos y el análisis de estos.

### 7.6.2. Síntesis del cDNA.

El cDNA se sintetizó por retrotranscripción con el Kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®, California, EUA) utilizando *primers* individuales de tipo “stem-loop” para los distromiRs hsa-miR-1-3p, hsa-miR-133a-3p y hsa-miR-206, los miRNAs REO hsa-miR-21-5p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-128-3p, hsa-miR-144-3p y para el control de normalización U6 snRNA (Applied Biosystems® California, EUA) (Tabla 1). Las reacciones se realizaron en un termociclador MultiGene OptiMax Thermocycler (Labnet International, Inc. Nueva Jersey, EUA) con las siguientes instrucciones de programación: 30 minutos a 16 °C, 30 minutos a 42 °C, 5 minutos a 85 °C y 5 minutos a 4 °C.

**Tabla 1.** MiRNAs circulantes analizados.

<b>Identificador del ensayo en Applied Biosystems®</b>	<b>Identificador en miRBase</b>	<b>Número de acceso en miRBase</b>
<b>MiRNAs analizados</b>		
2222	hsa-miR-1-3p	MIMAT0000416
0397	hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076
2279	hsa-miR-31-5p	MIMAT0000089
2216	hsa-miR-128-3p	MIMAT0000424
2246	hsa-miR-133a-3p	MIMAT0000427
2676	hsa-miR-144-3p	MIMAT0000436
0510	hsa-miR-206	MIMAT0000462
<b>Control de normalización</b>		
1973/ U6 snRNA	-	-

### 7.6.3. Ensayos de Amplificación por PCR.

La amplificación de la PCR fue realizada a partir de 1.33µL de cDNA, 10µL de TaqMan® universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®, California, EUA), 7.67µL de agua libre de nucleasas y 1µL del *primer* TaqMan® MicroRNA Assay (20X) específico para cada miRNA analizado.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador LightCycler® Nano (Roche® Indianapolis, EUA) con las siguientes instrucciones de programación: Incubación a 50°C por 2 min, activación de la DNA polimerasa a 95°C por 10 min, desnaturalización del material genético a 95°C por 15s y la extensión a 60°C por 60s (40 ciclos).

Para la normalización de los datos se utilizó como control al snRNA U6 y para el análisis de expresión de los miRNAs de estudio se aplicó la fórmula de  $2^{-DCt}$ .

## **7.7. Parámetros de daño muscular.**

### *7.7.1. Función y fuerza muscular.*

Los genetistas colaboradores de esta investigación realizaron las mediciones de la función y la fuerza muscular en los pacientes utilizando diferentes escalas (Anexo 4). La función muscular de las extremidades inferiores fue estimada con la escala de Vignos (Vignos & Archibald, 1960) y la escala del Sistema de Clasificación de la Función Motora Gruesa (SCFMG) (Palisano *et al.*, 1997). La escala de Vignos tiene un puntaje mínimo de 1 y un puntaje máximo de 10; mientras que la escala del SCFMG tiene un puntaje mínimo de 1 y un puntaje máximo de 5. Para ambas escalas, el puntaje mayor representa el peor grado de función muscular.

La función muscular de las extremidades superiores fue estimada con la escala de Brooke que tiene un puntaje de 1-6 (Brooke *et al.*, 1981). El puntaje mayor de esta escala representa el peor grado de función muscular.

Para estimar la fuerza muscular se utilizó la escala del Medical Research Council (MRC, por sus siglas en inglés) (Compston, 1942) que considera la fuerza de 13 grupos musculares. La escala considera un puntaje de 0-5 para cada grupo muscular evaluado siendo el puntaje mayor el que indica una mayor fuerza muscular. El porcentaje total de fuerza muscular se obtuvo con la siguiente ecuación referida por Scott *et al.* (1982):

$$\text{Fuerza muscular total (\%)} = \frac{(\text{Sumatoria de los puntajes de fuerza muscular})(100)}{(\text{Número de grupos músculos evaluados})(5)}$$

### 7.7.2. *Parámetros enzimáticos de daño muscular.*

Se determinó la concentración de la creatina fosfoquinasa (CPK, por sus siglas en inglés) (U/L) por ensayo inmunométrico quimioluminiscente con un kit comercial (SPINREACT, Girona, España). La concentración de las transaminasas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) se determinó con kits enzimáticos colorimétricos (SPINREACT, Girona, España). Las tres moléculas se midieron en un analizador clínico SPIN 120 (SPINREACT, Girona, España).

### 7.8. **Parámetros antropométricos.**

Un nutriólogo colaborador de esta investigación registró la edad (años) y realizó las mediciones antropométricas de talla y peso (Anexo 5). La talla (cm) de los pacientes ambulatorios se midió con un estadiómetro de pared calibrado (Seca<sup>®</sup>) y la talla de los pacientes no ambulatorios se determinó con una cinta ergonómica (Seca<sup>®</sup> 201) en posición decúbito supino (Adams *et al.*, 2010). El peso de todos los pacientes fue medido con una báscula silla (Seca<sup>®</sup> 954). Con estos datos se calculó el percentil del índice de masa corporal (IMC) con base a las curvas de crecimiento para niños (2-20 años) de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) (CDC, 2000).

### 7.9. **Indicadores metabólicos.**

La concentración circulante de la glucosa (mg/dL), del colesterol total (mg/dL) y de los triacilglicerolos (mg/dL) se cuantificó mediante ensayos inmunométricos quimioluminiscentes con kits comerciales (SPINREACT, Girona, España) en un analizador clínico SPIN 120 (SPINREACT, Girona, España). La concentración de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-C, por sus siglas en inglés) fue estimada con la ecuación de Friedewald (Hata y Nakajima, 1986).

La concentración de la insulina ( $\mu\text{U/mL}$ ) se midió con un kit comercial (Linco Research, Missouri, EUA) y el modelo homeostático de evaluación de resistencia a la insulina (HOMA-IR, por sus siglas en inglés) (Matthews *et al.*, 1985) se calculó utilizando la siguiente ecuación:



$$HOMA - IR = \frac{(\mu U/mL \text{ de insulina en ayuno})(mmol/L \text{ de glucosa en ayuno})}{22.5}$$

#### **7.10. Parámetros de actividad física.**

Los parámetros de actividad física que se registraron fueron la frecuencia de las sesiones de la terapia física (sesiones / semana) y la actividad física durante los 7 últimos días previos a la cita. Para este último parámetro, se aplicó el cuestionario de actividad física (PAQ-C, por sus siglas en inglés) (Kowalski *et al.*, 2004).

El PAQ-C se adaptó a la población infantil mexicana con DMD ya que no existía en la literatura una herramienta diseñada previamente (Anexo 6). El cuestionario es un recordatorio de 7 días compuesto de 9 *items* que adquieren un puntaje del 1 al 5. El cuestionario fue respondido por los padres o tutores. Para disminuir el sesgo de la información, se aclaró previamente a los tutores y a los pacientes que el cuestionario no era una examinación con fin médico si no de investigación.

El puntaje final del cuestionario PAQ-C se obtuvo a partir de la media del valor asignado a cada uno de los 9 *items* que conforman el cuestionario. Dicho puntaje final puede adquirir un valor del 1 al 5. Donde 1 indica actividad física baja mientras que 5 indica actividad física elevada.

#### **7.11. Frecuencia de consumo de alimentos antioxidantes.**

Para la evaluación de la frecuencia de consumo de alimentos antioxidantes (FCAA) se utilizó un cuestionario de frecuencia del consumo de alimentos que aplicó un nutriólogo del equipo de trabajo a los tutores de los pacientes. El cuestionario fue diseñado por el Instituto Nacional de Salud Pública de México (ENSANUT, 2016). Durante la aplicación del cuestionario, se les pidió a los padres de los pacientes recordar la frecuencia de consumo de 188 alimentos que sus hijos hayan ingerido. Los alimentos están categorizados en 12 grupos: 23 vegetales, 27 frutas, 14 productos de leche y productos lácteos, 9 pescados y mariscos, 14 carnes rojas, 9 carnes blancas, 7 leguminosas, 26 cereales y tubérculos, 19 aceites y grasas, 15 azúcares, 12 bebidas y 13 antojitos mexicanos y comida rápida (Anexo 7).

La frecuencia de consumo de cada alimento (veces/día) se calculó de acuerdo con Zotor *et al.*, (2012). Las veces de consumo/día fueron transformados semi cuantitativamente de la siguiente manera: ninguna o pocas veces/año se convirtió a 0 veces/día, una vez/mes se convirtió a 0.033 veces/día, 2-3 veces/mes se convirtió a 0.083 veces/día, una vez/semana se convirtió a 0.143 veces/día, 2-4 veces a la semana se convirtió a 0.429 veces/día, 5-6 veces por semana se convirtió a 0.786 veces/semana, 1 vez/día se mantuvo igual y 2 o más veces/día fue convertido a 2 veces/día.

Para la selección de los alimentos con capacidad antioxidante se tomó en cuenta su capacidad antioxidante total reportada en la literatura (Carlsen *et al.*, 2010).

### **7.12. Análisis *in silico* de la predicción de los genes blancos relacionados con estrés oxidativo (REO).**

Para la identificación de los genes blanco REO, primeramente, se generó una lista de los genes blanco de los 7 miRNAs de interés desde la plataforma miRDB <http://mirdb.org/> (Wong & Wang, 2015) considerando solo las interacciones de los genes blanco-miRNAs con un valor de target score  $\geq 80$ . Posteriormente, de la lista generada de genes blanco, se identificó exclusivamente a los genes asociados a EO a través de la plataforma Mouse Genome Database (<http://www.informatics.jax.org/>) considerando como criterios de búsqueda: respuesta a EO, actividad antioxidante y especies reactivas de oxígeno.

### **7.13. Marcadores circulantes de respuesta antioxidante.**

Como marcadores circulantes de respuesta antioxidante se midió la concentración de glutathion y del factor de transcripción de respuesta antioxidante Nrf2.

#### **7.13.1. Glutathion.**

La determinación de la concentración de glutathion ( $\mu\text{M}$ ) se realizó en un volumen de 50  $\mu\text{L}$  de plasma sanguíneo a través del ensayo colorimétrico Glutathione Assay Kit (Cayman Chemical Company, Michigan, EUA) que utiliza una curva estándar (0 - 16  $\mu\text{M}$ ) para calcular la concentración del glutathion a partir de la medición de la absorbancia de las muestras a 410 nm. El coeficiente de variación del ensayo es de 1.6%.

### 7.13.2. *Nrf2*.

La determinación de la concentración de N (pg/mL) se realizó en un volumen de 100  $\mu$ L de plasma sanguíneo a través del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) Human NRF2 ELIZA Kit (RayBiotech, Inc, Atlanta, EUA) que utiliza una curva estándar (0 - 10 000 pg/mL). La medición de la absorbancia de las muestras se realizó a 450 nm. El coeficiente de variación del ensayo es <1.6%.

## 7.14. Marcadores circulantes de daño oxidativo.

Como marcador de oxidación lipídica se midió la concentración de malondialdehído (MDA) y de las proteínas carboniladas.

### 7.14.1. *Malondialdehído*.

La determinación de la concentración de MDA ( $\mu$ M) se realizó en un volumen de 100  $\mu$ L de muestra de plasma sanguíneo a través del ensayo colorimétrico de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés) TBARS (TCA Method) Assay Kit (Cayman Chemical Company, Michigan, EUA) que emplea una curva estándar (0 - 50  $\mu$ M) para calcular la concentración de MDA a partir de la medición de la absorbancia de las muestras a 535 nm. El coeficiente de variación del ensayo es de 2.5%.

### 7.14.2. *Proteínas carboniladas*.

La determinación de la concentración de las proteínas carboniladas (nmol/mL) se realizó en un volumen de 200  $\mu$ L de plasma sanguíneo a través del ensayo colorimétrico Protein Carbonyl Colorimetric Assay Kit (Cayman Chemical Company, Michigan, EUA) que utiliza una muestra problema y una muestra control para calcular la concentración de proteínas carboniladas a partir de la absorbancia medida en las muestras a 370 nm. El coeficiente de variación del ensayo es de 8.5%.

### **7.15. Análisis estadísticos.**

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS versión 24 (Nueva York, EUA) y un valor de  $p \leq 0.05$  se aceptó como estadísticamente significativo. La distribución de los datos de cada una de las variables se evaluó con la prueba de Shapiro-Wilk. Los datos que mostraron una distribución normal se presentan como media  $\pm$  desviación estándar (DE) y los datos que no mostraron una distribución normal se presentaron como mediana (mínimo, máximo).

La comparación de las variables de interés entre los pacientes ambulatorios y los pacientes no ambulatorios se realizó mediante unas pruebas  $t$  de Student para los datos que mostraron una distribución normal o mediante unas pruebas de  $U$  de Mann Whitney para los datos con distribución no normal. Las correlaciones bivariadas se realizaron a partir de los coeficientes  $\rho$  de las correlaciones de Spearman en función de la distribución no normal de los datos.

Los modelos lineales generales univariados (MLGU) se realizaron para cada uno de los miRNAs de estudio para conocer si los parámetros de daño muscular, los parámetros antropométricos, los parámetros metabólicos, la actividad física y la frecuencia del consumo de alimentos son predictores de los niveles circulantes de los miRNAs analizados. La significancia estadística está representada por (\*) para valores de  $p < 0.05$ , (\*\*) para valores de  $p < 0.01$  y (\*\*\*) para los valores de  $p < 0.001$ .

### **7.16. Aspectos éticos.**

Este protocolo fue diseñado por la Dra. Maricela Rodríguez Cruz y el M en C. Tomas Almeida Becerril y autorizado el 14 de agosto de 2018 por el Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS (R-2018-785-089). La planeación y la ejecución del proyecto de estudio se apegaron a la Declaración de Helsinki en relación con la investigación médica en humanos y las guías del Comité de Investigación Científica del IMSS.

### **7.17. Tipo de riesgo.**

Con base en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Título segundo: De los aspectos éticos de la investigación en Seres Humanos, Capítulo 1, Artículo 17, este estudio se encuentra en categoría de riesgo mínimo debido a que la intervención clínica de mayor riesgo que se realizará en la población de estudio es la extracción de sangre por punción venosa que no rebasa el 2% del volumen circulante y se realizó en una población con DMD de 2 a 15 años (Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, en Línea).

### **7.18. Beneficios de participación.**

Los beneficios fueron: 1) El diagnóstico molecular de la DMD, 2) Las pruebas bioquímicas (glucosa y perfil de lípidos) y 3) Diagnóstico del estado de nutrición y recomendación dietaria con base a los resultados de las medidas antropométricas del paciente con DMD.

### **7.19. Principios éticos.**

#### *7.19.1. Carta de consentimiento y carta de asentimiento.*

Se les explicó de manera detallada a los pacientes y padres/tutores, en qué consistió el estudio, las maniobras que se realizarían a los sujetos de estudio el día de la cita en el laboratorio, los riesgos y los beneficios otorgados; con un lenguaje entendible y se aclaró cualquier duda que ellos tenían. Si aceptaban la participación de su hijo en el estudio, se les solicitaba que firmaran la carta de consentimiento (Anexo 2) y que el paciente firmara la carta de asentimiento (Anexo 3).

#### *7.19.2. Confidencialidad de la información de los pacientes.*

Toda la información personal se manejó bajo estricta confidencialidad y privacidad siendo utilizada exclusivamente para fines de este estudio. Las muestras biológicas fueron etiquetadas con un código alfanumérico para que las etiquetas no revelaran el nombre del paciente.

### 7.19.3. *Riesgos.*

Los riesgos durante la toma de muestra de sangre que se pudieron haber presentado fueron el dolor y la formación de un hematoma en el sitio de la punción. Durante la toma de muestra sanguínea se contó con un médico para atender potenciales eventos respiratorios, náuseas o mareos.

### **7.20. Aspectos de bioseguridad.**

Debido a que en esta investigación se tomaron muestras de sangre se considera que tiene implicaciones de bioseguridad ya que se corría el riesgo de que dichas muestras pudieran ser material infectocontagioso. Así que, se tiene el conocimiento del manejo de los residuos biológicos generados en la investigación y se realizaron los procedimientos adecuados para su desecho en contenedores específicos para su retiro por parte del Instituto.

## 8. RESULTADOS

---







### 8.1. Diagnóstico clínico y molecular de la DMD.

Los médicos genetistas registraron la edad de la aparición de los primeros síntomas, la edad de la pérdida de la ambulación, los niveles de CPK circulantes, la presencia de pseudohipertrofia en gastrocnemios y la presencia o ausencia del signo de Gowers de los pacientes. Dicha información clínica, el análisis molecular del gen *DMD* o la expresión de la proteína distrofina así como la predicción de la pérdida del marco de lectura del gen *DMD* (Plataforma Reading-Frame Checker versión 1.9) (Aartsma *et al.*, 2006) permitieron el diagnóstico clínico y molecular de los 29 pacientes con DMD que participaron en esta investigación.

En lo que concierne al diagnóstico clínico, de los 29 pacientes, 23 eran ambulatorios y 6 no ambulatorios al momento del diagnóstico. Respecto a la CPK en circulación, todos los pacientes mostraron concentraciones mayores al límite superior del intervalo de la concentración normal de CPK (20-200 U/L) (Basheer *et al.*, 2017). Este marcador de daño muscular se encontró elevado desde 27 veces en el paciente 22 (5380 U/L) hasta 162 veces en el paciente 23 (32346 U/L). Además, todos los pacientes tenían pseudohipertrofia en gastrocnemios, así como un signo de Gowers positivo al momento del diagnóstico clínico (Tabla 2).

Respecto al diagnóstico molecular de los 29 pacientes, 4 tuvieron un diagnóstico por ausencia de la expresión de la proteína distrofina en biopsia muscular. En los otros 25 pacientes se identificó que 23 de ellos presentaban eliminación exónica como variante patogénica mientras que 2 pacientes mostraron duplicación exónica. La región del gen en la que predominaron las mutaciones se localiza entre los exones 45-55. Además, 23 pacientes mostraron pérdida del marco de lectura del gen *DMD* y 2 mostraron conservación (Fig. 2).

**Tabla 2.** Características clínicas de los pacientes con DMD.

Paciente	Edad (años) de		CPK (U/L)	Pseudohipertrofia de gastrocnemios	Signo de Gowers	
	Inicio de síntomas	Diagnóstico molecular				
P1	1	3	14300	+	+	
P2	2	2	20752	ni	+	
P3	4	4	14522	+	+	
P4	2	5	23352	ni	+	
P5	<1	6	15531	+	+	
P6	3	5	7784	+	+	
P7	2	2	12213	+	+	
P8	3	6	20100	+	ni	
P9	3	5	10736	ni	ni	
P10	1	2	11496	ni	+	
P11	<1	5	15670	ni	+	
P12		4	9	14265	+	+
P13		4	8	6650	+	+
P14		4	7	8668	ni	+
P15		3	6	18827	+	+
P16		<1	2	8951	ni	+
P17		4	9	9028	+	+
P18		<1	7	11741	+	+
P19		2	3	18601	ni	ni
P20		7	8	17022	+	+
P21		3	8	14334	+	+
P22		4	12	5380	+	ni
P23		4	6	32346	+	ni
P24		2	5	9140	+	+
P25		5	8	13850	+	+
P26		3	10	14567	+	+
P27		3	8	14625	+	+
P28		1	6	20550	+	+
P29		3	9	7500	+	+

**CPK**, Creatina fosfocinasa; **ni**, no se encontró la información en el expediente clínico. El símbolo de discapacidad indica pérdida de ambulación.





## **8.2. Comparación de la edad, los parámetros clínicos y la frecuencia del consumo de alimentos entre los pacientes ambulatorios y no ambulatorios con DMD.**

Se analizó si había diferencia estadística en la edad, los parámetros de daño muscular, los parámetros antropométricos, los parámetros metabólicos circulantes, los parámetros de actividad física y la frecuencia del consumo de alimentos entre los pacientes ambulatorios y no ambulatorios con DMD.

La edad de la población de estudio ( $N = 29$ ) se encontró en un intervalo de 3 a 15 años. Los pacientes se dividieron en ambulatorios ( $n = 23$ ) y no ambulatorios ( $n = 6$ ). La edad fue significativamente mayor ( $p < 0.001$ ) en los pacientes no ambulatorios comparada con la edad de los ambulatorios (Tabla 3).

Para evaluar el daño muscular se incluyeron diversas escalas clínicas de función y fuerza muscular, así como enzimas séricas. Los puntajes de la función muscular en extremidades inferiores (Escala de Vignos y del SCFMG) y el puntaje de función muscular en extremidades superiores (Escala de Brooke) fueron significativamente más altos ( $p < 0.001$ ) en los pacientes no ambulatorios comparados con los pacientes ambulatorios. En el mismo sentido, el porcentaje de fuerza muscular medido con la escala de MRC fue significativamente más bajo ( $p < 0.001$ ) en los pacientes no ambulatorios con respecto a los ambulatorios.

Las concentraciones de las enzimas séricas CPK, AST y ALT que indican daño muscular fueron significativamente más bajas ( $p < 0.001$ ) en los pacientes no ambulatorios en comparación con los pacientes ambulatorios (Tabla 3).

Los parámetros antropométricos como la altura y el peso corporal fueron significativamente más altos ( $p < 0.001$  y  $p = 0.003$ , respectivamente) en el grupo de los pacientes no ambulatorios comparado con el grupo de pacientes ambulatorios. El percentil del IMC para la edad no mostró diferencias ( $p = 0.127$ ) entre los dos grupos de pacientes con DMD (Tabla 3).

Los indicadores metabólicos considerados en este estudio fueron glucosa, insulina, índice HOMA-IR, triacilgliceroles, colesterol total y C-VLDL. Únicamente la concentración de colesterol total fue significativamente menor ( $p = 0.002$ ) en los pacientes no ambulatorios comparados con los ambulatorios (Tabla 3).

La actividad física estimada con el puntaje del cuestionario Paq-C fue más baja ( $p < 0.001$ ) en los pacientes no ambulatorios en comparación con los pacientes ambulatorios. En lo que respecta a la actividad física en términos de las sesiones de terapia por semana, no se encontraron diferencias significativas ( $p = 0.174$ ) entre ambos grupos de pacientes comparados (Tabla 3).

Finalmente, en la frecuencia del consumo de alimentos categorizado por grupos de alimentos, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los grupos de estudio (Tabla 3).

**Tabla 3.** Comparación de la edad, los parámetros clínicos y la frecuencia de consumo de alimentos entre los pacientes ambulatorios y no ambulatorios con DMD.

	Ambulatorios <i>n</i> = 23	No ambulatorios <i>n</i> = 6	Valor de <i>p</i>
Edad (años)	7.00 ± 2.47	13.18 ± 1.30	<0.001
<b>Parámetros de daño muscular</b>			
Escala de Vignos (puntaje)	3 (2, 4)	9 (9, 9)	<0.001
Escala del GMFCS (puntaje)	2 (1, 2)	5 (4, 5)	<0.001
Escala de Brooke (puntaje)	1 (1, 3)	3 (2, 4)	<0.001
Fuerza muscular del MRC (%)	91 (75, 100) <sup>†</sup>	71 (43, 77) <sup>§</sup>	<0.001
CPK (U/L)	14691 ± 6899	5842 ± 1601	<0.001
AST (U/L)	207 ± 68	98 ± 19	<0.001
ALT (U/L)	258 (84, 650)	67 (58, 138)	<0.001
<b>Parámetros antropométricos</b>			
Talla (cm)	112.97 ± 14.88	149.48 ± 14.09	<0.001
Peso corporal (kg)	19.05 (11.70, 48.80)	39.20 (22.20, 53.40)	0.003
IMC (Percentil)	28 (1, 97)	6 (1, 77)	0.127
<b>Parámetros metabólicos</b>			
Glucosa (mg/dL)	84.96 ± 7.30	87.17 ± 8.91	0.533
Insulina (μU/mL)	5.65 (5.10, 22.70) <sup>¶</sup>	5.7 (4.90, 7.60)	0.547

HOMA-IR	1.20 (0.99, 4.65) ¶	1.16 (1.08, 1.87)	0.739
Triacilgliceroles (mg/dL)	134 (56, 326)	119 (80, 290)	0.726
Colesterol total (mg/dL)	157 (124, 264)	115 (108, 155)	0.002
C-VLDL (mg/dL)	27 (11, 65)	24 (16,58)	0.726
<b>Parámetros de actividad física</b>			
Paq-C (Puntaje)	2.42 ± 0.81 ‡	1.46 ± 0.31	<0.001
Terapia física (s/s)	7 (0, 7)	1 (0, 2)	0.174
<b>Frecuencia del consumo de alimentos</b>			
Vegetales	0.24 (0.02, 0.34) ‡	0.21 (0.14, 0.29)	0.977
Frutas	0.13 (0.02, 0.38) ‡	0.18 (0.11, 0.47)	0.157
Leche y productos lácteos	0.19 ± 0.09 ‡	0.19 ± 0.13	0.943
Pescado y mariscos	0.02 (0, 0.10) ‡	0.06 (0, 0.13)	0.289
Carnes rojas	0.06 (0, 0.27) ‡	0.08 (0.02, 0.10)	0.376
Carnes blancas	0.10 (0.04, 0.37) ‡	0.13 (0.06, 0.22)	0.755
Leguminosas	0.08 (0, 0.36) ‡	0.08 (0.16, 0.13)	0.932
Cereales y tubérculos	0.19 (0.07, 0.45) ‡	0.23 (0.20, 0.30)	0.140
Grasas animales y vegetales	0.14 ± 0.08 ‡	0.18 ± 0.05	0.297
Azúcares	0.15 (0, 0.66) ‡	0.18 (0.05, 0.46)	0.977
Bebidas	0.20 ± 0.12 ‡	0.22 ± 0.21	0.739
Antojitos mexicanos y comida rápida	0.05 (0.01, 0.26) ‡	0.04 (0.02, 0.11)	0.755

**DMD**, Distrofia muscular de Duchenne; **GMFCS**, Sistema de Clasificación de la Función Motora Gruesa; **MRC**, *Medical Research Council*; **CPK**, Creatina fosfocinasa; **AST**, Aspartato aminotransferasa; **ALT**, Alanina aminotransferasa; **IMC**, Índice de masa corporal; **HOMA-IR**, Modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina; **C-VLDL**, Colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad; **Paq-C**, Cuestionario de actividad física; **s/s**, Sesiones/semana. Los datos se muestran como media ± desviación estándar o mediana (mínimo, máximo). Prueba *t* de Student para datos con distribución normal y prueba *U* de Mann-Whitney para datos con distribución no normal. †*n* = 22, ‡*n* = 21, ¶*n* = 18, §*n* = 5.

Los datos de N de algunas variables cambian ya que no fue posible la obtención de algunos datos de los pacientes el día de la cita o la muestra sanguínea fue limitante para las mediciones.

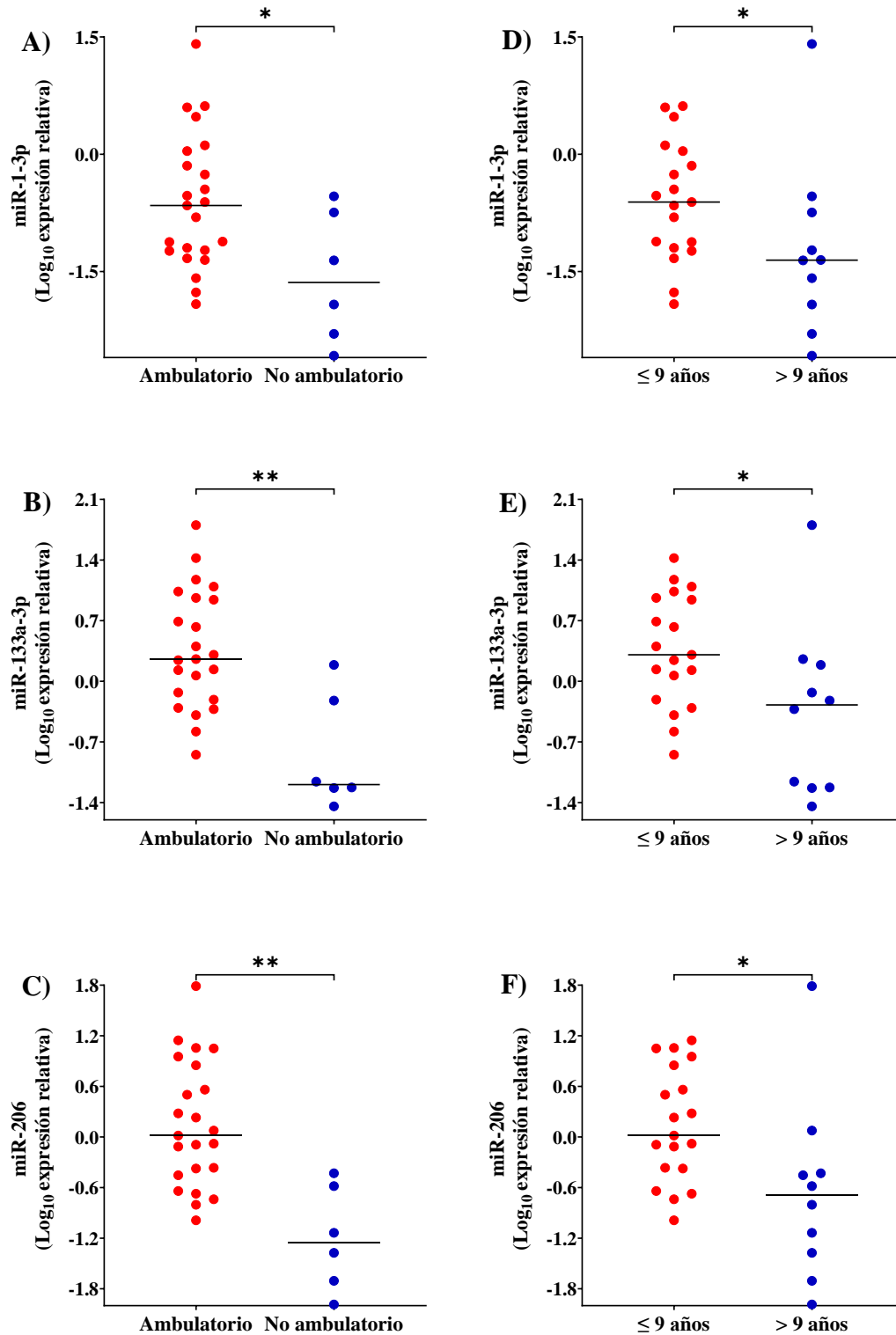
### **8.3. DistromiRs y miRNAs REO circulantes en pacientes ambulatorios y no ambulatorios con DMD y su correlación con el daño muscular.**

#### *8.3.1. DistromiRs.*

Respecto al grupo de los distromiRs, se encontró que la expresión en circulación del miR-1-3p, miR-133-a-3p y miR-206 fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ) en pacientes no ambulatorios en comparación con los pacientes ambulatorios (Figs. 3A-C). En relación con la estratificación de los pacientes por su edad, la expresión de los distromiRs en los pacientes  $> 9$  años fue menor ( $p < 0.05$ ) que en los pacientes  $\leq$  de 9 años (Figs. 3D-F).

Se observó una correlación negativa moderada entre la edad y todos los distromiRs ( $p < 0.05$ ). El puntaje de la escala de Vignos (función muscular en extremidades inferiores) correlacionó negativamente con la expresión del miR-133a-3p ( $\rho = -0.351, p = 0.031$ ). Sin embargo, la escala del SCFMG (función muscular en extremidades inferiores) y la escala de Brooke (función muscular en extremidades superiores) no mostraron correlación significativa ( $p > 0.05$ ) con la expresión de los distromiRs circulantes de los pacientes con DMD (Tabla 4).

El porcentaje de fuerza muscular evaluado con la escala del MRC (extremidades superiores e inferiores) mostró una correlación positiva ( $p < 0.05$ ) con la expresión del miR-133a-3p ( $\rho = 0.392$ ) y del miR-206 ( $\rho = 0.384$ ). La concentración de los marcadores séricos de daño muscular como CPK, AST y ALT correlacionaron positivamente ( $p < 0.05$ ) con la expresión de los distromiRs (Tabla 4).



**Figura 3. DistromiRs circulantes en pacientes con DMD con diferente grado de daño muscular.** Figs. A-C, Comparación de pacientes en estado ambulatorio ( $n = 23$ ) y no ambulatorio ( $n = 6$ ). Figs. D-F, Comparación de pacientes  $\leq 9$  años ( $n = 19$ ) y  $> 9$  años ( $n = 10$ ). Pruebas  $U$  de Mann-Whitney. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ .

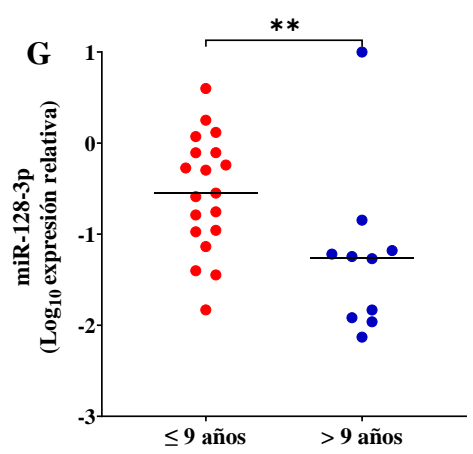
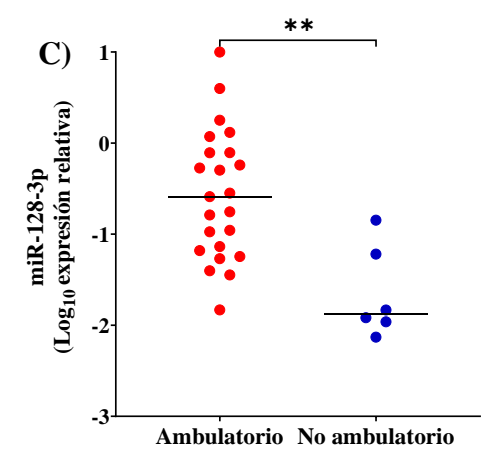
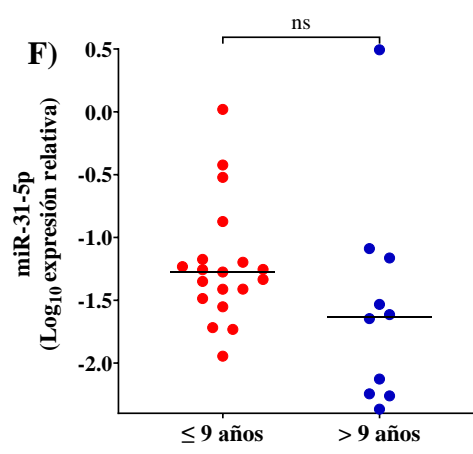
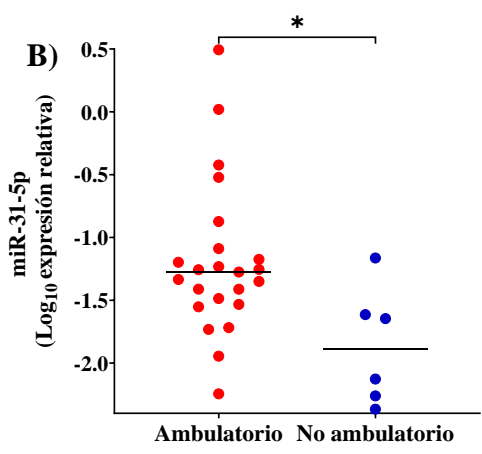
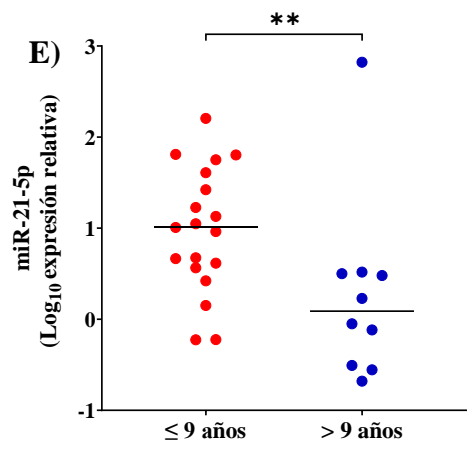
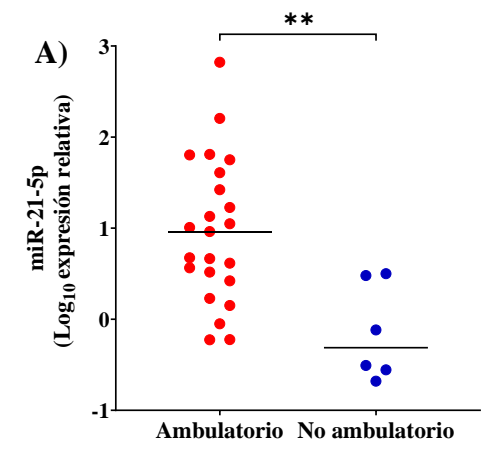
### 8.3.2. *MiRNAs* REO.

La expresión de los miRNAs circulantes REO analizados fue significativamente más baja ( $p < 0.05$ ) en los pacientes no ambulatorios comparada con los pacientes ambulatorios (Figs. 4A-D). También, la expresión de los miRNAs REO fue significativamente menor ( $p < 0.01$ ) en los pacientes distróficos  $> 9$  años comparados con los pacientes  $\leq 9$  años, excepto para la expresión del miR-31-5p ( $p = 0.104$ ) (Figs. 4E-H).

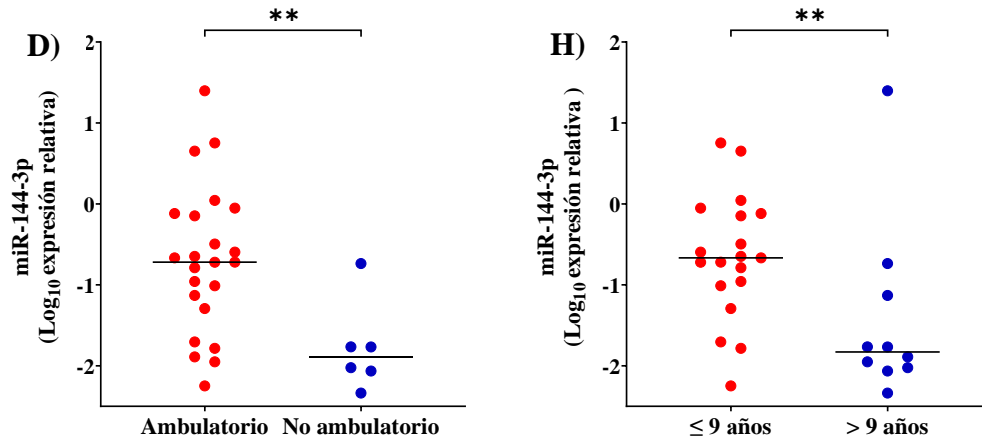
Se observó una correlación negativa moderada entre la edad y los miRNAs REO ( $p < 0.05$ ). El puntaje de la escala de Vignos (función muscular en extremidades inferiores) correlacionó ( $p < 0.05$ ) con la expresión de los miRNAs miR-21-5p ( $\rho = -0.392$ ) y miR-128-3p ( $\rho = -0.361$ ) (Tabla 4).

El puntaje de la escala del SCFMG (función muscular en extremidades inferiores) correlacionó significativamente ( $p = 0.047$ ) con miR-21 ( $\rho = -0.317$ ). Aunque no se identificaron correlaciones entre el puntaje de la escala de Brooke (función muscular en extremidades superiores) y los niveles de miRNAs REO. El porcentaje de fuerza muscular medido con la escala del MRC (extremidades superiores e inferiores) correlacionó significativamente ( $p < 0.05$ ) con miR-21-5p ( $\rho = 0.416$ ), miR-31-5p ( $\rho = 0.319$ ), miR-128-3p ( $\rho = 0.369$ ) y miR-144-3p ( $\rho = 0.364$ ) (Tabla 4).

Además, la concentración circulante de CPK, AST y ALT correlacionó significativamente ( $p < 0.05$ ) con la expresión de los miRNAs REO: miR-21-5p, miR-31-5p, miR-128-3p y miR-144-3p. (Tabla 4).







**Figura 4. MiRNAs REO circulantes de pacientes con DMD con diferente grado de daño muscular.** Figs. A-D, Comparación de pacientes en estado ambulatorio ( $n = 23$ ) y no ambulatorio ( $n = 6$ ). Figs. E-H, Comparación de pacientes  $\leq 9$  años ( $n = 19$ ) y  $> 9$  años ( $n = 10$ ). Pruebas  $U$  de Mann-Whitney. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , ns  $p > 0.05$ .

#### 8.4. DistromiRs y miRNAs REO circulantes, y su correlación con los parámetros antropométricos, metabólicos, de actividad física y con la frecuencia del consumo de alimentos de los pacientes con DMD.

La talla mostró una correlación significativa ( $p = 0.006$ ) con la expresión del distromiR miR-1-3p ( $\rho = -0.463$ ) y con los miRNAs REO ( $p < 0.05$ ) miR-21-5p ( $\rho = -0.432$ ), miR-31-5p ( $\rho = -0.324$ ), miR-128-3p ( $\rho = -0.389$ ) y miR-144-3p ( $\rho = -0.338$ ). El peso corporal mostró una correlación significativa ( $p = 0.015$ ) con la expresión del distromiR miR-1-3p ( $\rho = -0.403$ ) y con la expresión de los miRNAs REO ( $p < 0.05$ ) miR-21-5p ( $\rho = -0.355$ ) y miR-128-3p ( $\rho = -0.313$ ). Sin embargo, el percentil de IMC correlacionó ( $p = 0.048$ ) solamente con el miR-133a-3p ( $\rho = 0.315$ ) (Tabla 4).

Respecto a los parámetros metabólicos, la concentración de insulina correlacionó ( $p = 0.05$ ) con la expresión del miR-1-3p ( $\rho = 0.343$ ). El resto de los parámetros metabólicos como glucosa, HOMA-IR, triacilgliceroles, colesterol total y C-VLDL no correlacionaron con ninguno de los miRNAs analizados (Tabla 4).

Respecto a la actividad física, ni el puntaje del Paq-C ni la frecuencia de la terapia física mostraron correlación con la expresión de los miRNAs circulantes analizados en este estudio (Tabla 4).

En cuanto a la frecuencia del consumo de alimentos, el grupo de los vegetales mostró correlación ( $p < 0.05$ ) con la expresión del miR-133a-3p ( $\rho = 0.407$ ), miR-206 ( $\rho = 0.369$ ), miR-21-5p ( $\rho = 0.333$ ), miR-128-3p ( $\rho = 0.371$ ) y miR-144-3p ( $\rho = 0.379$ ). Además, el grupo de alimentos de las leguminosas mostró correlación ( $p < 0.05$ ) con la expresión del miR-133a-3p ( $\rho = 0.412$ ) y miR-206 ( $\rho = 0.408$ ) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Correlación de la edad, los parámetros clínicos y la frecuencia del consumo de alimentos con la expresión de los miRNAs circulantes de los pacientes con DMD.

	DistromiRs				miRNAs REO		
	miR-1-3p	miR-133a-3p	miR-206	miR-21-5p	miR-31-5p	miR-128-3p	miR-144-3p
Edad (años)	-0.431**	-0.362*	-0.381*	-0.469**	-0.305*	-0.435**	-0.387*
<b>Parámetros de daño muscular</b>							
Escala de Vignos (Puntaje)	-0.166	-0.351*	-0.294	-0.392*	-0.293	-0.361*	-0.255
Escala del SCFMG (Puntaje)	-0.266	-0.265	-0.259	-0.317*	-0.217	-0.301	-0.207
Escala de Brooke (Puntaje)	-0.029	-0.254	-0.260	-0.258	-0.258	-0.266	-0.185
Fuerza muscular del MRC (%) †	0.218	0.392*	0.384*	0.416*	0.319*	0.369*	0.364*
CPK (U/L)	0.436**	0.586**	0.606**	0.538**	0.410*	0.516**	0.525**
AST (U/L)	0.486**	0.666**	0.704**	0.655**	0.517**	0.642**	0.640**
ALT (U/L)	0.348*	0.539**	0.561**	0.576**	0.346*	0.553**	0.555**
<b>Parámetros antropométricos</b>							
Talla (cm)	-0.463**	-0.291	-0.295	-0.432**	-0.324*	-0.389*	-0.338*
Peso corporal (kg)	-0.403*	-0.167	-0.194	-0.355*	-0.252	-0.313*	-0.266
IMC (Percentil)	0.026	0.315*	0.208	0.107	-0.019	0.119	0.104
<b>Parámetros metabólicos</b>							
Glucosa (mg/dL)	-0.197	-0.156	-0.121	-0.215	-0.225	-0.136	-0.015

Insulina ( $\mu\text{U}/\text{mL}$ ) <sup>‡</sup>	0.343*	0.145	0.158	0.142	0.037	0.140	0.152
HOMA-IR <sup>‡</sup>	0.263	0.040	0.097	-0.019	-0.083	0.045	0.147
Triacilgliceroles (mg/dL)	-0.019	0.217	0.092	-0.018	-0.062	0.034	0.036
Colesterol total (mg/dL)	-0.064	0.193	0.150	0.076	0.018	0.121	0.098
C-VLDL (mg/dL)	-0.019	0.217	0.092	-0.018	-0.062	0.034	0.036
<b>Parámetros de actividad física</b>							
Paq-C (Puntaje) <sup>†</sup>	0.066	0.158	0.278	0.246	0.153	0.230	0.194
Terapia física (s/s)	0.227	0.165	0.174	0.053	0.053	0.070	-0.059
<b>Frecuencia del consumo de alimentos <sup>†</sup></b>							
Vegetales	0.255	0.407*	0.369*	0.333*	0.040	0.371*	0.379*
Frutas	-0.035	0.117	0.077	0.206	0.132	0.199	0.133
Leche y productos lácteos	-0.150	0.248	0.252	0.164	0.176	0.147	0.017
Pescado y mariscos	0.109	0.178	0.096	0.199	0.152	0.162	0.139
Carnes rojas	0.048	-0.008	-0.027	-0.144	-0.062	-0.122	-0.141
Carnes blancas	-0.288	-0.050	-0.087	-0.090	-0.217	0.090	-0.140
Leguminosas	0.263	0.412*	0.408*	0.221	-0.030	0.246	0.288
Cereales y tubérculos	-0.012	0.060	-0.014	-0.018	-0.195	-0.012	-0.071

Grasas animales y vegetales	-0.034	-0.012	-0.056	-0.157	-0.051	-0.137	-0.133
Azúcares	-0.128	-0.011	0.087	-0.005	-0.054	-0.040	-0.024
Bebidas	-0.191	-0.007	0.143	0.012	0.273	-0.010	-0.061
Antojitos mexicanos y comida rápida	0.059	0.124	0.152	0.201	0.133	0.151	0.139

---

Coefficientes de correlación (*rho*) calculados por correlación de Spearman (N = 29).

**SCFMG**, Sistema de Clasificación de la Función Motora Gruesa; **MRC**, Medical Research Council; **CPK**, Creatina fosfocinasa; **AST**, Aspartato aminotransferasa; **ALT**, Alanina aminotransferasa; **IMC**, Índice de masa corporal; **HOMA-IR**, Modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina; **C-VLDL**, Colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad; **Paq-C**, Cuestionario de actividad física; **s/s**, Sesiones/semana; **REO**, Relacionados a estrés oxidativo.

\*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ .

† N = 27, ‡ N = 24.

Los valores de N de algunas variables cambian ya que no fue posible la obtención de algunos datos de los pacientes el día de la cita o la muestra sanguínea fue limitante para las mediciones.

### 8.5. Correlación entre los distromiRs y los miRNAs REO circulantes de los pacientes con DMD.

La correlación entre los distromiRs y los miRNAs de EO evidenció asociación de moderadas a altas ( $p \leq 0.016$ ) entre ambos grupos de miRNAs (valores de  $\rho$  desde 0.398 hasta 0.974), siendo la correlación más alta la que se dio entre el miR-21-5p y el miR-128-3p y la correlación más baja se dio entre miR-1-3p y miR-31-5p (Tabla 5).

**Tabla 5.** Matriz de correlaciones entre los distromiRs y los miRNAs REO circulantes de los pacientes con DMD.

	DistromiRs			miRNAs REO			
	1-3p	133a-3p	206	21-5p	31-5p	128-3p	144-3p
DistromiRs	1-3p	/					
	133a-3p	$\rho = 0.691$ $p < 0.001$	/				
	206	$\rho = 0.681$ $p < 0.001$	$\rho = 0.953$ $p < 0.001$	/			
miRNAs REO	21-5p	$\rho = 0.682$ $p < 0.001$	$\rho = 0.898$ $p < 0.001$	$\rho = 0.880$ $p < 0.001$	/		
	31-5p	$\rho = 0.398$ $p = 0.016$	$\rho = 0.650$ $p < 0.001$	$\rho = 0.687$ $p < 0.001$	$\rho = 0.759$ $p < 0.001$	/	
	128-3p	$\rho = 0.712$ $p < 0.001$	$\rho = 0.917$ $p < 0.001$	$\rho = 0.888$ $p < 0.001$	$\rho = 0.974$ $p < 0.001$	$\rho = 0.677$ $p < 0.001$	/
	144-3p	$\rho = 0.694$ $p < 0.001$	$\rho = 0.882$ $p < 0.001$	$\rho = 0.884$ $p < 0.001$	$\rho = 0.931$ $p < 0.001$	$\rho = 0.643$ $p < 0.001$	$\rho = 0.953$ $p < 0.001$

Coefficiente de correlación ( $\rho$ ) calculado por correlación de Spearman (N = 29).

$p$ , valor de  $p$ ; REO, Relacionados a estrés oxidativo.

## **8.6. Marcadores circulantes del EO en los pacientes ambulatorios y no ambulatorios con DMD.**

### *8.6.1. Marcadores circulantes antioxidantes.*

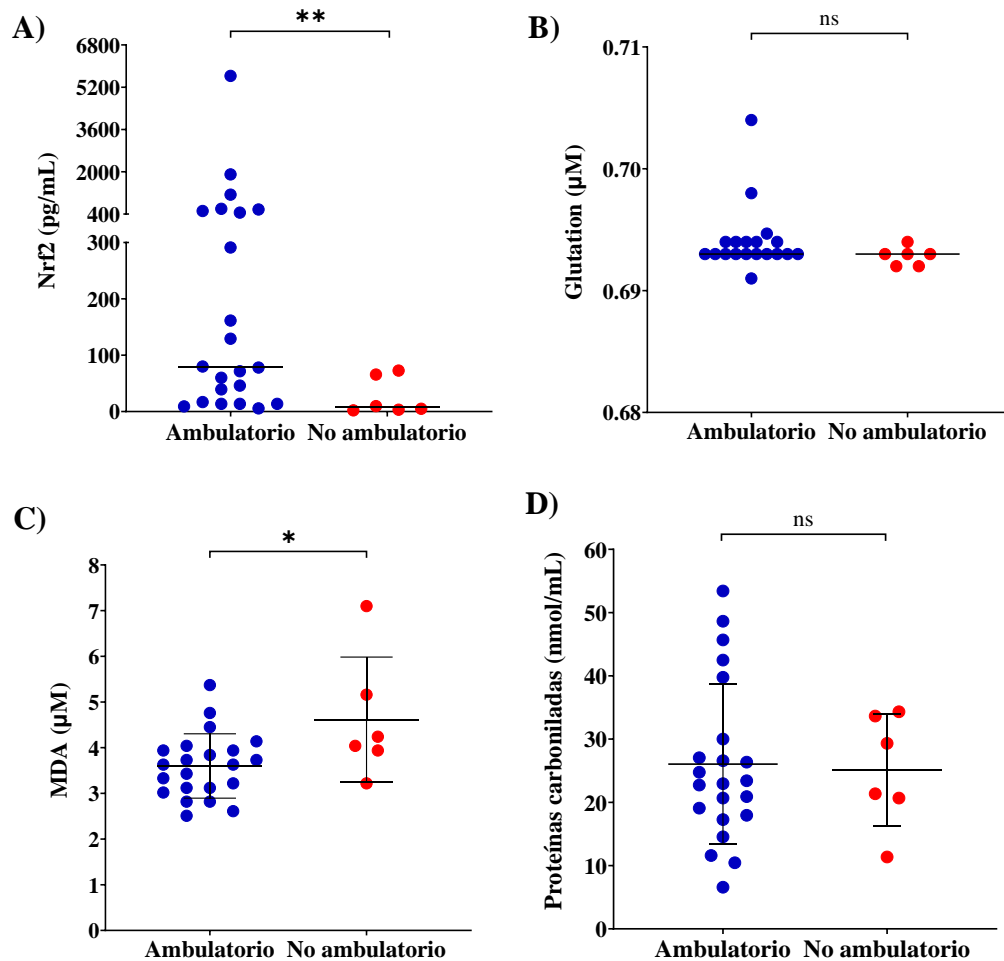
Los marcadores antioxidantes que se midieron en plasma sanguíneo fueron Nrf2 y glutatión. Se observó que la concentración de Nrf2 fue significativamente menor ( $p = 0.01$ ) en los pacientes no ambulatorios (7.33pg/mL, mín. 2.1, máx. 72.72) con respecto a los pacientes ambulatorios con (79.03pg/mL, mín. 5.69, máx. 5628.03) (Fig. 5A).

La concentración de glutatión no mostró diferencia ( $p = 0.138$ ) entre los pacientes ambulatorios (0.693 $\mu$ M, mín. 0.691, máx. 0.70) y los pacientes no ambulatorios (0.693 $\mu$ M, mín. 0.692, máx. 0.694) (Fig. 5B).

### *8.6.2. Marcadores circulantes de daño oxidativo.*

Los marcadores de daño oxidativo que se midieron en plasma sanguíneo fueron MDA y proteínas carboniladas. La concentración de MDA fue significativamente mayor ( $p = 0.018$ ) en los pacientes no ambulatorios ( $4.62 \pm 1.37\mu$ M) comparada con la concentración de los pacientes ambulatorios ( $3.6 \pm 0.71\mu$ M) (Fig. 5C).

La concentración de las proteínas carboniladas no mostró diferencia ( $p = 0.850$ ) entre los pacientes ambulatorios ( $26.17\text{nm/mL} \pm 12.57$ ) y los pacientes no ambulatorios ( $25.11 \pm 8.9\text{nm/mL}$ ) (Fig. 5D).



**Figura 5. Marcadores circulantes del EO de pacientes con DMD con diferente grado de daño muscular.** A) Nrf2 ( $n = 22$ ,  $n = 6$ ), B) Glutation ( $n = 19$ ,  $n = 6$ ), C) MDA ( $n = 22$ ,  $n = 6$ ), D) Proteínas carboniladas ( $n = 22$ ,  $n = 6$ ). Prueba  $U$  de Mann-Whitney para Nrf2 y Glutation. Prueba  $t$  de Student para MDA y Proteínas carboniladas. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ . MDA, Malondialdehído; Nrf2, Factor nuclear eritroide 2 relacionado al factor 2.



### **8.7. Correlación de los marcadores circulantes de EO con los parámetros clínicos, los parámetros de actividad física y la frecuencia del consumo de alimentos antioxidantes en los pacientes con DMD.**

La concentración de Nrf2 correlacionó negativamente ( $p < 0.05$ ) con la edad ( $\rho = -0.387$ ), con el puntaje de la escala de Vignos (función muscular en extremidades inferiores) ( $\rho = -0.328$ ), con el puntaje de la escala del SCFMG (función muscular en extremidades inferiores) ( $\rho = -0.399$ ) y con el puntaje de la escala de Brooke (función muscular en extremidades superiores) ( $\rho = -0.371$ ) (Tabla 6).

Con respecto a los parámetros antropométricos, Nrf2 también correlacionó ( $p < 0.05$ ) con la talla ( $\rho = -0.396$ ) y con el peso corporal ( $\rho = -0.355$ ) (Tabla 6).

Con respecto a la frecuencia del consumo de alimentos antioxidantes, Nrf2 correlacionó ( $p < 0.05$ ) con el pescado y mariscos ( $\rho = -0.376$ ) y con el grupo de las grasas animales y vegetales ( $\rho = -0.449$ ) (Tabla 6).

La concentración del marcador de respuesta antioxidante glutatión se correlacionó negativamente ( $p \leq 0.05$ ) con el puntaje de la escala de Brooke ( $\rho = -0.378$ ) y positivamente con la concentración de ALT ( $\rho = 0.336$ ) (Tabla 6).

La concentración del marcador de lipoperoxidación MDA correlacionó positivamente ( $p \leq 0.05$ ) con el puntaje de la escala de Vignos ( $\rho = 0.317$ ), con el puntaje de la escala de Brooke ( $\rho = 0.414$ ), con la talla ( $\rho = 0.324$ ), con el peso corporal ( $\rho = 0.328$ ) y el grupo de alimentos de las leguminosas ( $\rho = 0.454$ ) (Tabla 6).

La concentración de las proteínas carboniladas no mostró correlación ( $p > 0.05$ ) con ninguna de las variables medidas en los pacientes con DMD (Tabla 6).

**Tabla 6.** Correlación de la edad, los parámetros clínicos y la frecuencia del consumo de alimentos antioxidantes con los marcadores circulantes de EO de los pacientes con DMD.

	Marcadores de respuesta antioxidante		Marcadores de daño oxidativo	
	Nrf2 (pg/mL) (N = 28)	Glutation (μM) (N = 25)	MDA (μM) (N = 28)	P. Carb. (nmol/mL) (N = 28)
Edad (años)	-0.387*	-0.138	0.244	0.049
<b>Parámetros de daño muscular</b>				
Escala de Vignos (Puntaje)	-0.328*	-0.216	0.317*	0.228
Escala del SCFMG (Puntaje)	-0.399*	-0.154	0.307	-0.119
Escala de Brooke (Puntaje)	-0.371*	-0.378*	0.414*	0.068
Fuerza muscular del MRC (%) †	0.261	0.009	-0.293	-0.197
CPK (U/L)	0.105	0.158	-0.137	-0.087
AST (U/L)	0.135	0.290	-0.266	0.053
ALT (U/L)	0.168	0.336*	-0.263	0.070
<b>Parámetros antropométricos</b>				
Talla (cm)	-0.396*	-0.156	0.324*	0.011
Peso (kg)	-0.355*	-0.216	0.328*	-0.028
IMC (Percentil)	-0.014	-0.242	0.182	-0.286
<b>Parámetros metabólicos</b>				
Glucosa (mg/dL)	0.136	-0.051	0.258	0.038
Insulina (μU/mL) ‡	0.208	0.110	-0.032	-0.236
HOMA-IR ‡	0.171	-0.018	0.165	-0.268
Triacilgliceroles (mg/dL)	-0.020	-0.020	-0.060	0.168
C-VLDL (mg/dL)	0.183	0.136	-0.269	-0.078
C-VLDL (mg/dL)	-0.026	-0.020	-0.060	0.168
<b>Parámetros de actividad física</b>				
Paq-C (Puntaje) †	0.154	0.112	-0.283	0.041
Terapia física (s/s)	-0.017	0.087	-0.070	-0.264
<b>Frecuencia del consumo de alimentos antioxidantes †</b>				
Vegetales	-0.002	0.068	0.033	0.119
Frutas	0.128	-0.157	0.292	-0.095
Leguminosas	-0.071	0.136	0.092	-0.240
Cereales y tubérculos	-0.215	-0.134	0.465*	-0.065
Grasas animales y vegetales	-0.324	-0.348	0.165	-0.083

Azúcares	-0.171	-0.045	-0.055	0.071
Bebidas	-0.043	-0.080	-0.142	0.137

Coefficientes de correlación calculados por correlación de Spearman (N = 28).

**SCFMG**, Sistema de clasificación de la función motora gruesa; **MRC**, Medical Research Council; **CPK**, Creatina fosfocinasa; **AST**, Aspartato aminotransferasa, **ALT**, Alanina aminotransferasa; **IMC**, Índice de masa corporal; **HOMA-IR**, Modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina; **C-VLDL**, Colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad; **Paq-C**, Cuestionario de actividad física; **S/s**, Sesiones/semana; **Nrf2**, Factor nuclear eritroide 2; **MDA**, Malondialdehído; **P. Carb**, Proteínas carboniladas.

\*  $p \leq 0.05$ .

† N = 26, ‡N = 23.

Los valores de N de algunas variables cambian ya que no fue posible la obtención de algunos datos de los pacientes el día de la cita o la muestra sanguínea fue limitante para las mediciones.

### **8.8. Correlación entre los marcadores de respuesta antioxidante y los marcadores de daño oxidativo circulantes de los pacientes con DMD.**

La correlación entre los marcadores de respuesta antioxidante y los marcadores de daño oxidativo evidenció una asociación moderada ( $p = 0.024$ ) entre la concentración de glutatión y la concentración de MDA ( $\rho = -0.399$ ). Sin embargo, no se observaron correlaciones entre el resto de los marcadores de respuesta antioxidante y de daño oxidativo (Tabla 7).

**Tabla 7.** Matriz de correlaciones entre los marcadores de respuesta antioxidante y los marcadores de daño oxidativo circulantes de los pacientes con DMD.

	Marcadores de respuesta antioxidante		Marcadores de daño oxidativo	
	Nrf2	Glutation <sup>†</sup>	MDA	P. carb.
Marcadores de respuesta antioxidante	<b>Nrf2</b>	/	/	/
	<b>Glutation</b>	$\rho = -0.121$ $p = 0.282$	/	/
Marcadores de daño oxidativo	<b>MDA</b>	$\rho = -0.242$ $p = 0.108$	$\rho = -0.399$ $p = 0.024$	/
	<b>P. carb.</b>	$\rho = -0.057$ $p = 0.356$	$\rho = -0.109$ $p = 0.302$	$\rho = 0.241$ $p = 0.109$

Coefficiente de correlación ( $\rho$ ) calculado por correlación de Spearman (N = 28).  $P$  = valor de  $p$ . **Nrf2**, Factor nuclear eritroide 2; **MDA**, Malondialdehído; **P. Carb**, Proteínas carboniladas.

<sup>†</sup>N = 25.

### 8.9. Correlación entre los marcadores del EO y la expresión de los miRNAs circulantes de los pacientes con DMD.

Se realizó una correlación entre la concentración circulante de los marcadores de EO y la expresión circulantes de los distromiRs, y los miRNAs REO. Se observó que la concentración circulante de Nrf2 correlacionó ( $p \leq 0.05$ ) con la expresión de los miRNAs REO miR-21-5p ( $\rho = 0.359$ ), miR-31-5p ( $\rho = 0.660$ ) y miR-128-3p ( $\rho = 0.332$ ) (Tabla 8).

Además, se encontró que la concentración del glutatión correlacionó ( $p \leq 0.05$ ) con la expresión circulante de miR-1-3p ( $\rho = 0.344$ ) y miR-128-3p ( $\rho = 0.386$ ). Entre el resto de los miRNAs y los marcadores de EO no se encontraron correlaciones significativas ( $p > 0.05$ ) (Tabla 8).

**Tabla 8.** Correlación de la expresión de los miRNAs con la concentración de los marcadores de EO circulantes de los pacientes con DMD.

	Marcadores de respuesta antioxidante		Marcadores de daño oxidativo	
	Nrf2	Glutatión <sup>†</sup>	MDA	P. Carb.
<b>DistromiRs</b>				
miR-1-3p	0.285	0.344*	-0.027	-0.100
miR-133a-3p	0.155	0.273	-0.024	-0.047
miR-206	0.223	0.315	-0.062	-0.033
<b>miRNAs REO</b>				
miR-21-5p	0.359*	0.296	-0.209	0.010
miR-31-5p	0.660*	-0.013	-0.275	0.168
miR-128-3p	0.332*	0.386*	-0.152	-0.018
miR-144-3p	0.299	0.244	-0.041	-0.011

Coefficiente de correlación ( $\rho$ ) calculado por correlación de Spearman. (N = 28) \*  $p \leq 0.05$ . **REO**, Relacionados a estrés oxidativo; **Nrf2**, Factor nuclear eritroide 2; **MDA**, Malondialdehído; **P. Carb**, Proteínas carboniladas. <sup>†</sup>N = 25.

### 8.10. Evaluación de las variables predictoras de la expresión de los miRNAs y de los marcadores del EO.

Para identificar las variables predictoras de la expresión de los distromiRs y los miRNAs REO, se realizaron modelos de tipo lineal generalizado para cada uno de los miRNAs de estudio. El único modelo que fue estadísticamente significativo fue el modelo 1 para la expresión del miR-1-3p en el que se observó que la CPK, miR-133-3p, miR-206, miR-21-5p, miR-128-3p y glutatión son las variables predictivas de este miRNA considerando el total de las variables que se tomaron en cuenta para este estudio (Tabla 9).

**Tabla 9.** MLGU para evaluar las variables predictoras de la expresión del distromiR circulante miR-1-3p de los pacientes con DMD.

<b>Variab  predictor  as</b>	<b>Coe  ficiente  B</b>	<b>Err  or  Estánd  ar</b>	<b>T</b>	<b>Val  or de  p</b>
Modelo 1: miR-1-3p		R <sup>2</sup> = 0.973	Valor de p = 0.018	
Edad (años)	-0.006	0.031	-0.184	0.859
Peso (kg)	-0.005	0.008	-0.707	0.502
Insulina (µU/mL)	0.026	0.014	1.826	0.111
CPK (U/L)	-6.105E-05	2.289E-05	-2.667	0.032
AST (U/L)	0.003	0.002	1.466	0.186
ALT (U/L)	0.001	0.001	1.076	0.318
miR-133a-3p	0.444	0.101	4.374	0.003
miR-206	-0.640	0.266	-2.409	0.047
miR-21-5p	0.212	0.039	5.402	0.001
miR-31-5p	-6.326	3.441	-1.838	0.109
miR-128-3p	-8.098	1.823	-4.441	0.003
miR-144-3p	-1.384	0.995	-1.392	0.207
Glutation	-312.122	101.853	-3.064	0.018

**MLGU**, Modelo lineal general univariado; **CPK**, Creatina fosfocinasa; **AST**, Aspartato aminotransferasa; **ALT**, Alanina aminotransferasa.

Respecto a los marcadores de EO, el único modelo que fue estadísticamente significativo fue el modelo 1 para la concentración de Nrf2 en el que se observó que la edad, es la variable predictiva de este miRNA considerando el total de las variables que se tomaron en cuenta para este estudio (Tabla 10).

**Tabla 10.** MLGU para evaluar las variables predictoras de la concentración de Nrf2 circulante de los pacientes con DMD.

<b>Variab  predictor  as</b>	<b>Coe  ficiente  B</b>	<b>Err  or  Está  ndar</b>	<b>T</b>	<b>Val  or de  p</b>
Modelo 1: Nrf2	R <sup>2</sup> = 0.248		Valor de p = 0.011	
Edad (años)	-258.589	97.201	-2.660	0.014
Escala SCFMG (puntaje)	363.948	281.133	1.295	0.208
Escala de Brooke (puntaje)	74.802	275.685	0.271	0.788

**MLGU**, Modelo lineal general univariado; **Nrf2**, Factor nuclear eritroide 2; **SCFMG**, Sistema de Clasificación de la Función Motora Gruesa.

## 9. DISCUSIÓN

---

El presente estudio reporta por primera ocasión la expresión circulante de los distromiRs asociados a diversos parámetros clínicos, bioquímicos y moleculares de los pacientes con DMD estratificados por diferente grado de daño muscular. Actualmente existe suficiente evidencia en modelos animales que sustenta el papel de los miRNAs en el desarrollo muscular y el metabolismo tanto en la normalidad fisiológica como en la DMD (Lee *et al.*, 2022).

Diferentes estudios han mostrado que la expresión en circulación de los distromiRs y los miRNAs REO evaluados en este trabajo, está desregulada en la DMD comparados con sujetos sanos (Amor *et al.*, 2021, Cacchiarelli *et al.*, 2011, Zaharieva *et al.*, 2013, Vignier *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Matsuzaka *et al.*, 2016; Becker *et al.*, 2016; Llano - Diez *et al.*, 2017; Mousa *et al.*, 2020). Sin embargo, la limitación más significativa de estos estudios es la falta de consideración de un gradiente de edad, de fuerza y función muscular entre los pacientes, y la reducida interpretación de los datos de expresión por la escasa consideración de las características clínicas, entre ellas la actividad física.

Los resultados del presente estudio mostraron una menor expresión de los distromiRs circulantes en pacientes con peor función muscular en comparación con aquellos pacientes con mejor función muscular, lo cual es consistente con lo publicado previamente por Zaharieva *et al.* (2013). Entre las hipótesis que explican la menor expresión de los miRNAs circulantes en los pacientes con peor función muscular, está la reducida cantidad de masa muscular que provoca una menor liberación pasiva (producto de la constante ruptura del sarcolema) o activa de los miRNAs (liberación controlada) o bien la evolución fisiopatológica de la enfermedad asociada con una posible adaptación transcripcional; es decir que la desregulación de los miRNAs sea consecuencia de los cambios transcripcionales en la enfermedad (Amor *et al.*, 2021).

Se ha reportado que los pacientes con DMD de mayor edad presentan mayor daño muscular reflejado en la disminución de la masa tisular (Mazzone *et al.*, 2011). El presente estudio agrega conocimiento a nivel clínico de la DMD que consiste en que la expresión de los distromiRs es menor en los pacientes mayores de 9 años comparados con los menores de 9 años y aunado a esto dicha expresión disminuye conforme avanza la edad de los pacientes va aumentando.



Sin embargo, la asociación de la edad con los distromiRs circulantes, contrasta con los resultados de Zaharieva *et al.* (2013) y Li *et al.* (2014) ya que en ambos estudios mencionados no se encontraron correlaciones entre la edad y la expresión de los miRNAs circulantes, lo cual podría deberse a que en los estudios citados hubo pacientes con un fenotipo menos severo de DMD; es decir distrofia muscular de Becker ya que no detallan los criterios empleados para discernir entre el diagnóstico de ambos fenotipos de la enfermedad (Duchenne/Becker).

La información mencionada anteriormente sobre la disminución de los miRNAs en etapas más avanzadas de la enfermedad coincide con un cambio adverso y marcado en la disminución función muscular reportado a los 7 años en la DMD (Mazzone *et al.*, 2011). Entonces podemos hipotetizar que la edad de 9 años podría ser un punto de corte en la que se produce la disminución de los distromiRs circulantes, posiblemente antes de la pérdida de la ambulación.

Los niveles del distromiR circulante miR-133a-3p disminuyeron cuando el puntaje de la escala de Vignos aumentó; patrón que no fue observado con el resto de los distromiRs ni con el puntaje de la escala de Brooke. Entonces, proponemos que miR-133a-3p podría ser mejor indicador del daño muscular en extremidades inferiores en comparación con el resto de los distromiRs analizados, y que ninguno de los distromiRs refleja el daño muscular en extremidades superiores.

Como se mencionó, los pacientes de mayor edad presentan mayor grado de daño muscular lo cual reduce la actividad física como lo reportamos en la tabla 3. Para elucidar si la actividad física de los pacientes con DMD se asociaba con la expresión circulante de los distromiRs se realizó un análisis de correlación entre ambas variables. Sin embargo, no se encontró asociación, lo cual permite hipotetizar que los cambios en la expresión de los miRNAs no se explican por la disminución de la actividad física en los pacientes que presentaban un estado más avanzado de la enfermedad, si no por la fisiopatología de la enfermedad.

Respecto al grupo de miRNAs REO (miR-21-5p, miR-31-5p, miR-128-3p y miR-144-3p), nuestros resultados muestran que, en aquellos pacientes con DMD que tienen peor función muscular (no ambulatorios y/o  $> 9$  años), los niveles de miR-31-5p y miR-128-3p son menores comparados con los pacientes con mejor función muscular (ambulatorios y/o  $\leq 9$  años), lo que coincide con lo reportado por Zaharieva *et al.* (2013) y Amor *et al.* (2021).

Además, en este trabajo se reporta por primera vez que los pacientes con DMD con peor función muscular (No ambulatorios y/o > 9 años) también expresan menores niveles circulantes de miR-21-5p y miR-144-3p comparados con los pacientes con mejor función muscular (Ambulatorios y/o ≤ 9 años).

Debido a que la DMD representa una enfermedad crónica músculo-degenerativa, el daño muscular aumenta conforme avanza la edad. Los resultados de la presente investigación agregan conocimiento acerca de la expresión de los miRNAs circulantes REO que disminuyen conforme aumenta la edad de los pacientes, siendo la edad un indicador indirecto del avance de la enfermedad ya que se trata de una enfermedad degenerativa. Mazzone *et al.* (2011) propusieron que a la edad de 7 años los pacientes experimentan el mayor cambio funcional en el músculo esquelético, adicionalmente nosotros reportamos que a la edad de 9 años los miRNAs experimentan una disminución significativa en la expresión circulante.

Adicionalmente, se evaluaron diferentes variables metabólicas (glucosa, insulina, triacilgliceroles, colesterol total, colesterol -VLDL y resistencia a la insulina). De dichas variables, se identificó que miR-1-3p correlacionó positivamente con la concentración de insulina. La correlación positiva entre miR-1-3p y la concentración circulante de insulina también se ha evidenciado en sujetos prediabéticos (N = 29) de edad promedio de  $50 \pm 5.6$  años (Al-kafaji *et al.*, 2021) y debido a que a la fecha no existen evidencias sobre el mecanismo involucrado en esta asociación de variables, la relación miR-1-3p e insulina circulante es un campo importante de estudio.

Además, en este trabajo identificamos las variables predictoras más importantes de la expresión de cada uno de los miRNAs evaluados. Encontramos que miR-128-3p, que se ha reportado aumentado en pacientes con DMD de 4 a 12 años con respecto a sujetos control (Amor *et al.*, 2021), es el predictor común de la expresión de la mayoría de los miRNAs analizados en este estudio. Por lo que, hipotetizamos que este miRNA puede ser un regulador central del grupo de los distromiRs y de los miRNAs REO. Nuestra propuesta está basada en que miR-128-3p se encuentra altamente expresado en tejido musculoesquelético y modula la hipertrofia muscular a través de la proliferación de mioblastos y la formación de miotubos *in vitro* e *in vivo*, ya que la disminución de la expresión de dicho miRNA facilita la señalización de la insulina mediada por IRS1/Akt (Motohashi *et al.*, 2013).

El análisis *in silico* de los distromiRs y los miRNAs REO nos permitió identificar un total de 97 genes blanco como potenciales reguladores del EO en la DMD (Anexo 8). Este hallazgo aporta información nueva sobre posibles mecanismos epigenéticos por miRNAs que modulan la generación de EO en la fisiopatología de la DMD. Uno de los genes blanco más relevante fue *NRF2* del miR-144-3p que tiene una función maestra en la regulación de la respuesta antioxidante de la DMD (Almeida-Becerril *et al.*, 2021; Petrillo *et al.*, 2021).

Por otro lado, respecto a la evaluación de los marcadores de EO, es bien sabido que este juega un papel importante en la fisiopatología de la DMD, como se ha reportado en tejido muscular del modelo animal *mdx* y de pacientes con DMD (Mechler *et al.*, 1984; Hunter *et al.*, 1986; Petrillo *et al.*, 2017; Burns *et al.*, 2019). Sin embargo, el EO ha sido escasamente estudiado en circulación de pacientes con DMD (Grosso *et al.*, 2008; Almeida-Becerril *et al.*, 2021; Al-Mshhdani *et al.*, 2021). El estudio de marcadores circulantes de EO es crucial para entender la fisiopatología de la enfermedad y si el EO circulante refleja el EO en el musculo porque acceder al tejido humano es limitado e invasivo, principalmente en pacientes pediátricos.

En este estudio, se evaluó la concentración circulante de Nrf2, GSH, MDA y proteínas carboniladas en los pacientes con DMD de un amplio rango de edad (3-15 años), incluyendo pacientes ambulatorios y no ambulatorios.

En este trabajo se reportan por primera vez los niveles circulantes de Nrf2 en pacientes con DMD. Se observó menor nivel en los pacientes no ambulatorios. Adicionalmente, previamente se ha demostrado como Nrf2, en respuesta al EO, regula la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes por su interacción con elementos de respuesta antioxidante como sitios promotores (Itoh *et al.*, 1997).

Nuestros resultados coinciden con un reporte previo de nuestro grupo de investigación en una cohorte de menor número de pacientes (N = 24) independiente de la cohorte del presente estudio. En dicho trabajo, el mRNA de NRF2 en leucocitos circulantes mostró una tendencia a disminuir en los pacientes no ambulatorios (Almeida-Becerril *et al.*, 2021).

Estos resultados también son similares a lo reportado por Petrillo *et al.* (2017) en biopsias musculares. Los autores observaron una reducida expresión de Nrf2 en biopsias musculares de pacientes más grandes (2-9 años) comparada con la expresión en pacientes más jóvenes (0-2 años).

Con base a toda la evidencia mostrada podemos sugerir que la concentración de Nrf2 en circulación y en el músculo tienen un patrón similar de cambio que se da en función de la severidad de la enfermedad. Entonces la concentración circulante de Nrf2 podría reflejar los cambios de los niveles de este factor de transcripción en el músculo de los pacientes con DMD.

Otros resultados del presente estudio mostraron que la concentración circulante de Nrf2 disminuye con la edad y con el daño muscular, lo cual puede ser evidencia de que la protección antioxidante mediada por Nrf2 disminuye con la severidad de la enfermedad. Nrf2 correlacionó con la altura y con el peso; sin embargo, esto podría ser resultado de una relación indirecta con la edad de los pacientes.

Nuestros resultados del análisis *in silico* predictivo de los genes blanco de cada miRNA mostraron que NRF2 es gen blanco de miR-144-3p, pero no observamos correlación entre ambas variables. No podemos descartar que haya una relación entre ambas variables por lo que se sugieren estudios en los que se analice la relación de miR-144-3p y su gen blanco NRF2.

Los resultados sobre los niveles de glutatión circulante mostraron que no hay diferencia entre el estado ambulatorio y el estado no ambulatorio. La información disponible en la literatura previa sobre dichos marcadores es inconsistente.

Se ha reportado que la concentración de GSH en biopsias de músculo y en sangre total en pacientes con DMD (0-9 años) fue menor comparada con sujetos sanos (Petrillo *et al.*, 2017). Sin embargo, Burns *et al.* (2019) reportaron que la concentración de glutatión en el diafragma de ratones *mdx* (8 semanas de edad) fue similar a la concentración en ratones sanos. Además, Petrillo *et al.* (2017) observaron que la concentración de GSH fue más alta en pacientes más grandes (0-2 años vs 2-9 años). Sin embargo, en dicho trabajo no se detectaron cambios en la concentración de este antioxidante en sangre total.

Si la concentración circulante de glutatión refleja o no cambios de esta molécula antioxidante en el músculo aun es controversial. Esta afirmación es porque en este estudio identificamos una correlación de la concentración de glutatión con el puntaje de la escala de Brooke, pero no con otra escala de función o fuerza muscular. La correlación de glutatión con ALT y el puntaje de la escala de Brooke pueden ser indicadores de que glutatión se relaciona con la severidad de la DMD; sin embargo, se requiere de más estudios por que como se mencionó anteriormente, los resultados son inconsistentes con respecto a trabajos previos.

Los resultados de este estudio sugieren que los marcadores antioxidantes no correlacionan con los indicadores metabólicos, la actividad física y la frecuencia del consumo de alimentos antioxidantes. Estas observaciones sustentan que los marcadores antioxidantes están primordialmente relacionados con la severidad del daño muscular.

Con respecto a MDA, en el presente trabajo se detectó que la concentración de este marcador fue más alta en los pacientes con DMD con peor función muscular comparada con la observada en los pacientes con mejor función muscular. Este resultado coincide con una observación previa de nuestro grupo de investigación en la cual reportamos que la concentración circulante de MDA y 8-isoprostano son más altas en los pacientes no ambulatorios comparados con aquellos pacientes ambulatorios (Almeida-Becerril *et al.*, 2021). Así mismo, en el presente estudio demostramos que los puntajes alcanzados con las escalas de Vignos y de Brooke correlacionaron con el marcador de lipoperoxidación MDA. Basados en lo anterior, nuestros resultados sostienen nuestra hipótesis donde la concentración circulante de MDA está asociada con la progresión de la DMD.

Como mencionamos anteriormente para los marcadores antioxidantes, la ausencia de la correlación entre MDA, parámetros antropométricos, metabólicos, actividad física y la frecuencia del consumo de alimentos antioxidantes nos sugiere que MDA está relacionado con la severidad de la enfermedad; sin embargo, se requieren más estudios confirmatorios.

Finalmente, la concentración de las proteínas carboniladas no fue diferente entre los pacientes ambulatorios y los pacientes no ambulatorios y no se encontró correlación con la función muscular. Al-Mshhdani *et al.* (2021) reportaron que la concentración de las proteínas carboniladas estaba elevada en los músculos de ratones *mdx* de mayor edad comparados con los ratones de menor edad.

Sin embargo, en dicho estudio también se midió la concentración circulante de las proteínas carboniladas y no se encontraron diferencias entre ambos grupos de ratones, concluyendo que las proteínas carboniladas no es un buen indicador circulante de la oxidación proteica en musculo. En este sentido, nuestros resultados en pacientes coinciden con lo reportado en ratones *mdx* apoyando la idea de que las proteínas carboniladas parecieran no ser un marcador adecuado en músculo y o circulación de los pacientes con DMD.

Cuando analizamos la correlación entre los marcadores circulantes antioxidantes y los marcadores circulantes de daño oxidativo, encontramos una correlación negativa entre GSH y MDA. El diseño de este estudio no nos permite proponer una explicación mecanística de este resultado; sin embargo, varios autores han reportado la misma asociación antagónica entre ambos marcadores (Orman *et al.*, 2005; Kasperczik *et al.*, 2014; Shraideh *et al.*, 2018; Tualeka *et al.*, 2019).

El MLGU predijo que la edad es una variable importante relacionada con los cambios en la concentración de Nrf2 y la edad es un indicador de la severidad de la enfermedad ya que la DMD es una enfermedad degenerativa. Entonces, podemos decir que el MLGU evidenció que la concentración circulante de Nrf2 disminuye en función de la severidad de la enfermedad.

Los resultados de los marcadores de EO en conjunto con la evidencia previa en la literatura subrayan la importancia de las terapias nutricionales antioxidantes en los pacientes con DMD desde etapas tempranas de la enfermedad para ayudar a prevenir un estado crónico de EO tanto como pueda ser posible mejorando la preservación de la masa muscular e impactando en su calidad de vida.

En resumen, el presente trabajo representa el primer reporte sobre los cambios de los niveles de expresión de los miRNAs REO a nivel sistémico en suero de pacientes ambulatorios y no ambulatorios con DMD. Otro hallazgo importante es que tanto los distromiRs como los REO están asociados con el daño muscular y la edad. Por lo cual, proponemos que este grupo de 7 miRNAs podrían ser candidatos de estudio para monitorear la progresión de la DMD o la intervención de terapias en la DMD.

Esta investigación también abre un campo de estudio del EO y la relación con los miRNAs en el proceso fisiopatológico de la DMD.

Dentro de las limitaciones de este trabajo se encuentra el tamaño de la muestra que al tratarse de una enfermedad rara dificulta el reclutamiento de los pacientes, la falta de un grupo control de sujetos sanos y el diseño transversal que dificulta determinar una relación causa efecto comparado con un estudio longitudinal, además de la validación de los genes blanco de los miRNAs analizados. Aunque los miRNAs analizados están altamente expresados en músculo no podemos aseverar que tanto los miRNAs como los marcadores de EO estudiados provengan en su totalidad de tal tejido.

A pesar de dichas limitaciones nuestro trabajo presenta fortalezas como los criterios de selección de la población de estudio que descarta a pacientes con distrofia muscular de Becker cuyo fenotipo de la enfermedad podría generar una interpretación errónea de los resultados obtenidos en el presente trabajo tanto en los miRNAs como en los marcadores de EO. Además, consideramos pacientes con un rango de edad y de daño muscular, se consideraron parámetros de daño muscular que no se habían estudiado previamente en otros reportes como; función y fuerza musculares en extremidades superiores e inferiores, además que en el presente trabajo controlamos factores como la dieta y la actividad física que pueden provocar un efecto en la expresión de los miRNAs o en los marcadores circulantes.

## 10. CONCLUSIONES

---

1. La expresión de los distromiRs circulantes y los miRNAs REO es menor en los pacientes con peor grado de función muscular (considerando el estado ambulatorio y la edad) en comparación con la expresión en pacientes con mejor función muscular. La disminución de la expresión de los miRNAs está asociada inversamente con la edad y con parámetros de daño muscular.
2. La detección de miR-1-3p correlacionó positivamente con los niveles de insulina, probablemente explicando que este miRNA además de tener una función importante en la síntesis de músculo también intervenga en mantener los niveles metabólicos.
3. La desregulación de la expresión de los miRNAs incluidos en este estudio y sus posibles genes blanco sugieren el estudio de su regulación a nivel epigenético sobre el daño oxidativo in la DMD causada por mecanismos no clásicos de la enfermedad. Este grupo de 7 miRNAs estudiados podría ayudar al monitoreo de la progresión de la enfermedad o bien al monitoreo en el curso de las intervenciones terapéuticas.
4. Respecto a los marcadores de daño oxidativo en circulación podemos concluir que el daño oxidativo se encuentra aumentado en el estado no ambulatorio y que en este mismo estado la capacidad antioxidante se detecta disminuida. Además, fue detectada una relación directa entre la magnitud del daño muscular de los pacientes y una pobre capacidad antioxidante.

Entre las perspectivas generadas a partir de este trabajo se encuentra explorar el impacto de la desregulación de los miRNAs en el EO de la DMD ya que el EO constituye un eje principal en esta enfermedad y por otro lado, estudiar el papel que desempeña Nrf2 en la fisiopatología de la DMD ya que la evidencia en la literatura aun es escasa.



## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Adams KM, Kohlmeier M, Powell M, Zeisel SH. Nutrition in medicine: nutrition education for medical students and residents. *Nutr Clin Pract.* 2010;25(5):471-480.
2. Al-Kafaji G, Al-Muhtaresh HA, Salem AH. Expression and clinical significance of miR-1 and miR-133 in pre-diabetes. *Biomed Rep.* 2021;14(3):33.
3. Almeida-Becerril T, Rodríguez-Cruz M, Raúl Sánchez-González J, *et al.* Circulating markers of oxidative stress are associated with a muscle injury in patients with muscular dystrophy Duchenne. *Brain Dev.* 2021;43(1):111-120.
4. Al-Mshhdani BA, Grounds MD, Arthur PG, Terrill JR. A Blood Biomarker for Duchenne Muscular Dystrophy Shows That Oxidation State of Albumin Correlates with Protein Oxidation and Damage in Mdx Muscle. *Antioxidants* (Basel). 2021;10(8):1241.
5. Amor F, Vu Hong A, Corre G, *et al.* Cholesterol metabolism is a potential therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2021;12(3):677-693.
6. Andrews NW. Membrane repair and immunological danger. *EMBO Rep.* 2005;6(9):826-830.
7. Aoi W, Ichikawa H, Mune K, *et al.* Muscle-enriched microRNA miR-486 decreases in circulation in response to exercise in young men. *Front Physiol.* 2013;4:80.
8. Baker JR, Vuppusetty C, Colley T, *et al.* Oxidative stress dependent microRNA-34a activation via PI3K $\alpha$  reduces the expression of sirtuin-1 and sirtuin-6 in epithelial cells. *Sci Rep.* 2016;6:35871.
9. Balaban B, Matthews DJ, Clayton GH, *et al.* Corticosteroid treatment and functional improvement in Duchenne muscular dystrophy: long-term effect. *Am J Phys Med Rehabil.* 2005;84(11):843-850.
10. Banerjee J, Khanna S, Bhattacharya A. MicroRNA Regulation of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:2872156.
11. Basheer N, Mneimneh S, Rajab M. Seven-Digit Creatine Kinase in Acute Rhabdomyolysis in a Child. *Child Neurol Open.* 2017;4:2329048X16684396.
12. Becker S, Florian A, Patrascu A, *et al.* Identification of cardiomyopathy associated circulating miRNA biomarkers in patients with muscular dystrophy using a complementary cardiovascular magnetic resonance and plasma profiling approach. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2016;18(1):25.

13. Bentwich I. Prediction and validation of microRNAs and their targets. *FEBS Lett.* 2005;579(26):5904-5910.
14. Bonifati MD, Ruzza G, Bonometto P, *et al.* A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve.* 2000;23(9):1344-1347.
15. Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol.* 2000;59(1):13-23.
16. Brack AS, Conboy MJ, Roy S, *et al.* Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science.* 2007;317(5839):807-810.
17. Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Bredt DS. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell.* 1995;82(5):743-752.
18. Brooke MH, Griggs RC, Mendell JR, Fenichel GM, Shumate JB, Pellegrino RJ. Clinical trial in Duchenne dystrophy. I. The design of the protocol. *Muscle Nerve.* 1981;4(3):186-197.
19. Brunton LL, Lazo JS & Parker KL. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.* New York: McGraw-Hill Medical 11 ed; 2005: 2084 p.
20. Burch PM, Pogoryelova O, Goldstein R, *et al.* Muscle-Derived Proteins as Serum Biomarkers for Monitoring Disease Progression in Three Forms of Muscular Dystrophy. *J Neuromuscul Dis.* 2015;2(3):241-255.
21. Burns DP, Drummond SE, Bolger D, *et al.* N-acetylcysteine Decreases Fibrosis and Increases Force-Generating Capacity of mdx Diaphragm. *Antioxidants (Basel).* 2019;8(12):581.
22. Bushby KM, Thambyayah M, Gardner-Medwin D. Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy. *Lancet.* 1991;337(8748):1022-1024.
23. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, *et al.* Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010;9(1):77-93.
24. Cacchiarelli D, Legnini I, Martone J, *et al.* miRNAs as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol Med.* 2011;3(5):258-265.
25. Caggiano R, Cattaneo F, Moltedo O, *et al.* miR-128 Is Implicated in Stress Responses by Targeting MAFG in Skeletal Muscle Cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:9308310.

26. Cai B, Spencer MJ, Nakamura G, Tseng-Ong L, Tidball JG. Eosinophilia of dystrophin-deficient muscle is promoted by perforin-mediated cytotoxicity by T cell effectors. *Am J Pathol.* 2000;156(5):1789-1796.
27. Cave A, Grieve D, Johar S, Zhang M, Shah AM. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in cardiac pathophysiology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005;360(1464):2327-2334.
28. Centers for Disease Control and Prevention. Acceso 19 de mayo de 2022. <https://www.cdc.gov/healthyweight/spanish/bmi/calculator.html>.
29. Chang WJ, Iannaccone ST, Lau KS, *et al.* Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(17):9142-9147.
30. Chen JF, Tao Y, Li J, *et al.* microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J Cell Biol.* 2010;190(5):867-879.
31. Choi MH, Ow JR, Yang ND, Taneja R. Oxidative Stress-Mediated Skeletal Muscle Degeneration: Molecules, Mechanisms, and Therapies. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:6842568.
32. Coenen-Stass AML, Wood MJA, Roberts TC. Biomarker Potential of Extracellular miRNAs in Duchenne Muscular Dystrophy. *Trends Mol Med.* 2017;23(11):989-1001.
33. Compston A. Aids to the investigation of peripheral nerve injuries. Medical Research Council: Nerve Injuries Research Committee. His Majesty's Stationery Office: 1942; pp. 48 (iii) and 74 figures and 7 diagrams; with aids to the examination of the peripheral nervous system. By Michael O'Brien for the Guarantors of Brain. Saunders Elsevier: 2010; pp. [8] 64 and 94 Figures. *Brain.* 2010;133(10):2838-2844.
34. Cristiana F, Elena A, Nina Z. Superoxide Dismutase: Therapeutic Targets in SOD Related Pathology. *Health.* 2014; 6: 975-988.
35. Cruz-Guzmán Odel R, Rodríguez-Cruz M, Escobar Cedillo RE. Systemic Inflammation in Duchenne Muscular Dystrophy: Association with Muscle Function and Nutritional Status. *Biomed Res Int.* 2015;2015:891972.
36. Davies KE, Nowak KJ. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(10):762-773.
37. Deconinck N, Dan B. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol.* 2007;36(1):1-7.

38. Den Dunnen JT, Grootsholten PM, Bakker E, *et al.* Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am J Hum Genet.* 1989;45(6):835-847.
39. Emery AE. Dystrophin function. *Lancet.* 1990;335(8700):1289.
40. Emery AE. The muscular dystrophies. *Lancet.* 2002;359(9307):687-695.
41. ENSANUT. Instituto Nacional de Salud Pública. Acceso 19 de mayo de 2022. <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2016/index.php>.
42. Feng Y, Niu LL, Wei W, *et al.* A feedback circuit between miR-133 and the ERK1/2 pathway involving an exquisite mechanism for regulating myoblast proliferation and differentiation. *Cell Death Dis.* 2013;4(11):e934.
43. Forrest SM, Cross GS, Flint T, Speer A, Robson KJ, Davies KE. Further studies of gene deletions that cause Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Genomics.* 1988;2(2):109-114.
44. Foster BJ, Shults J, Zemel BS, Leonard MB. Interactions between growth and body composition in children treated with high-dose chronic glucocorticoids. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(5):1334-1341.
45. Garrood P, Eagle M, Jardine PE, Bushby K, Straub V. Myoglobinuria in boys with Duchenne muscular dystrophy on corticosteroid therapy. *Neuromuscul Disord.* 2008;18(1):71-73.
46. Greco S, De Simone M, Colussi C, *et al.* Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *FASEB J.* 2009;23(10):3335-3346.
47. Grosso S, Perrone S, Longini M, *et al.* Isoprostanes in dystrophinopathy: Evidence of increased oxidative stress. *Brain Dev.* 2008;30(6):391-395.
48. Grounds MD, Sorokin L, White J. Strength at the extracellular matrix-muscle interface. *Scand J Med Sci Sports.* 2005;15(6):381-391.
49. Grounds MD, Radley HG, Gebiski BL, Bogoyevitch MA, Shavlakadze T. Implications of cross-talk between tumour necrosis factor and insulin-like growth factor-1 signalling in skeletal muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008;35(7):846-851.
50. Guiraud S, Chen H, Burns DT, Davies KE. Advances in genetic therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy. *Exp Physiol.* 2015;100(12):1458-1467.

51. Han R. Muscle membrane repair and inflammatory attack in dysferlinopathy. *Skelet Muscle*. 2011;1(1):10.
52. Hata Y, Nakajima K. Application of Friedewald's LDL-cholesterol estimation formula to serum lipids in the Japanese population. *Jpn Circ J*. 1986;50(12):1191-1200.
53. Hauser E, Höger H, Bittner R, Widhalm K, Herkner K, Lubec G. Oxyradical damage and mitochondrial enzyme activities in the mdx mouse. *Neuropediatrics*. 1995;26(5):260-262.
54. Haycock JW, MacNeil S, Jones P, Harris JB, Mantle D. Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy. *Neuroreport*. 1996;8(1):357-361.
55. Hodgetts S, Radley H, Davies M, Grounds MD. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNFalpha function with Etanercept in mdx mice. *Neuromuscul Disord*. 2006;16(9-10):591-602.
56. Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchene muscular dystrophy locus. 1987. *Biotechnology*. 1992;24:457-466.
57. Hu XY, Ray PN, Murphy EG, Thompson MW, Worton RG. Duplicational mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus: its frequency, distribution, origin, and phenotype/genotype correlation. *Am J Hum Genet*. 1990;46(4):682-695.
58. Hu J, Kong M, Ye Y, Hong S, Cheng L, Jiang L. Serum miR-206 and other muscle-specific microRNAs as non-invasive biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *J Neurochem*. 2014;129(5):877-883.
59. Hunter MI, Mohamed JB. Plasma antioxidants and lipid peroxidation products in Duchenne muscular dystrophy. *Clin Chim Acta*. 1986;155(2):123-131.
60. Hwa HL, Chang YY, Chen CH, *et al*. Multiplex ligation-dependent probe amplification identification of deletions and duplications of the Duchenne muscular dystrophy gene in Taiwanese subjects. *J Formos Med Assoc*. 2007;106(5):339-346.
61. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, *et al*. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;236(2):313-322.
62. Kaczor JJ, Hall JE, Payne E, Tarnopolsky MA. Low intensity training decreases markers of oxidative stress in skeletal muscle of mdx mice. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(1):145-154.

63. Kasperczyk A, Słowińska-Łożyńska L, Dobrakowski M, Zalejska-Fiolka J, Kasperczyk S. The effect of lead-induced oxidative stress on blood viscosity and rheological properties of erythrocytes in lead exposed humans. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2014;56(3):187-195.
64. Khalid I. Childhood osteoporosis. *Journal of Taibah University Medical Sciences.* 2011;(2): 61-76.
65. Kim HK, Laor T, Horn PS, Racadio JM, Wong B, Dardzinski BJ. T2 mapping in Duchenne muscular dystrophy: distribution of disease activity and correlation with clinical assessments *Radiology.* 2010;255(3):899-908.
66. Kim JH, Kwak HB, Thompson LV, Lawler JM. Contribution of oxidative stress to pathology in diaphragm and limb muscles with Duchenne muscular dystrophy. *J Muscle Res Cell Motil.* 2013;34(1):1-13.
67. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, *et al.* The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet.* 1989;45(4):498-506.
68. Kozakowska M, Pietraszek-Gremplewicz K, Jozkowicz A, Dulak J. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes. *J Muscle Res Cell Motil.* 2015;36(6):377-393.
69. Kosek DJ, Bamman MM. Modulation of the dystrophin-associated protein complex in response to resistance training in young and older men. *J Appl Physiol* (1985). 2008;104(5):1476-1484.
70. Kowalski KC, Crocker PR, Donen RM. The Physical Activity Questionnaire for Older Children (PAQ-C) and Adolescents (PAQ-A) Manual. University of Saskatchewan; 2004.
71. Lawler JM, Song W, Demaree SR. Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 2003;35(1):9-16.
72. Lee A, Moon J, Yu J, Kho C. MicroRNAs in Dystrophinopathy. *Int J Mol Sci.* 2022;23(14):7785.
73. Li X, Li Y, Zhao L, *et al.* Circulating Muscle-specific miRNAs in Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2014;3(7):e177.
74. Liu N, Bezprozvannaya S, Shelton JM, *et al.* Mice lacking microRNA 133a develop dynamin 2–dependent centronuclear myopathy. *J Clin Invest.* 2011;121(8):3258-3268.

75. Llano-Diez M, Ortez CI, Gay JA, *et al.* Digital PCR quantification of miR-30c and miR-181a as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2017;27(1):15-23.
76. Madaro L, Bouché M. From innate to adaptive immune response in muscular dystrophies and skeletal muscle regeneration: the role of lymphocytes. *Biomed Res Int.* 2014;2014:438675.
77. Matsuzaka Y, Kishi S, Aoki Y, *et al.* Three novel serum biomarkers, miR-1, miR-133a, and miR-206 for Limb-girdle muscular dystrophy, Facioscapulohumeral muscular dystrophy, and Becker muscular dystrophy. *Environ Health Prev Med.* 2014;19(6):452-458.
78. Matsuzaka Y, Tanihata J, Komaki H, *et al.* Characterization and Functional Analysis of Extracellular Vesicles and Muscle-Abundant miRNAs (miR-1, miR-133a, and miR-206) in C2C12 Myocytes and mdx Mice. *PLoS One.* 2016;11(12):e0167811.
79. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412-419.
80. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961;9(2):493-495.
81. Mayor R. Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Revista do Instituto de Medicina Tropical.* 2010;5(2): 23-29.
82. Mazzone E, Vasco G, Sormani MP, *et al.* Functional changes in Duchenne muscular dystrophy: a 12-month longitudinal cohort study. *Neurology.* 2011;77(3):250-256.
83. Mechler F, Imre S, Dioszeghy P. Lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in muscle and erythrocytes in Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Sci.* 1984;63(3):279-283.
84. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(30):10513-10518.
85. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics.* 1988;2(1):90-95.
86. Morgan JE, Zammit PS. Direct effects of the pathogenic mutation on satellite cell function in muscular dystrophy. *Exp Cell Res.* 2010;316(18):3100-3108.

87. Motohashi N, Alexander MS, Shimizu-Motohashi Y, Myers JA, Kawahara G, Kunkel LM. Regulation of IRS1/Akt insulin signaling by microRNA-128a during myogenesis. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 12):2678-2691.
88. Mousa NO, Abdellatif A, Fahmy N, Zada S, El-Fawal H, Osman A. Circulating MicroRNAs in Duchenne Muscular Dystrophy. *Clin Neurol Neurosurg.* 2020;189:105634.
89. Mouse Genome Database (MGD). The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine; 2019. Acceso 11 de enero de 2021. <http://www.informatics.jax.or>.
90. Nguyen HX, Lusic AJ, Tidball JG. Null mutation of myeloperoxidase in mice prevents mechanical activation of neutrophil lysis of muscle cell membranes in vitro and in vivo. *J Physiol.* 2005;565(Pt 2):403-413.
91. Nicholson LV, Johnson MA, Gardner-Medwin D, Bhattacharya S, Harris JB. Heterogeneity of dystrophin expression in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Acta Neuropathol.* 1990;80(3):239-250.
92. Nowak KJ, Davies KE. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep.* 2004;5(9):872-876.
93. Orman A, Kahraman A, Cakar H, Ellidokuz H, Serteser M. Plasma malondialdehyde and erythrocyte glutathione levels in workers with cement dust-exposure [corrected] [published correction appears in Toxicology. 2005 Nov 5;215(1-2):170]. *Toxicology.* 2005;207(1):15-20.
94. Palisano R, Rosenbaum P, Walter S, Russell D, Wood E, Galuppi B. Development and reliability of a system to classify gross motor function in children with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol.* 1997;39(4):214-223.
95. Peng TI, Jou MJ. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1201:183-188.
96. Petrillo S, Pelosi L, Piemonte F, et al. Oxidative stress in Duchenne muscular dystrophy: focus on the NRF2 redox pathway. *Hum Mol Genet.* 2017;26(14):2781-2790.
97. Prins KW, Humston JL, Mehta A, Tate V, Ralston E, Ervasti JM. Dystrophin is a microtubule-associated protein. *J Cell Biol.* 2009;186(3):363-369.
98. Ragusa RJ, Chow CK, Porter JD. Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in an animal model of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 1997;7(6-7):379-386.
99. Rando TA, Disatnik MH, Yu Y, Franco A. Muscle cells from mdx mice have an increased susceptibility to oxidative stress. *Neuromuscul Disord.* 1998;8(1):14-21.



- 100.Rando TA. Oxidative stress and the pathogenesis of muscular dystrophies. *Am J Phys Med Rehabil.* 2002;81(11 Suppl):S175-S186.
- 101.Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud; 2017. Acceso 11 de enero de 2021. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html>.
- 102.Reid MB, Li YP. Tumor necrosis factor-alpha and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir Res.* 2001;2(5):269-272.
- 103.Relaix F, Zammit PS. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development.* 2012;139(16):2845-2856.
- 104.Quintanilha BJ, Pinto Ferreira LR, Ferreira FM, Neto EC, Sampaio GR, Rogero MM. Circulating plasma microRNAs dysregulation and metabolic endotoxemia induced by a high-fat high-saturated diet. *Clin Nutr.* 2020;39(2):554-562.
- 105.Ricotti V, Ridout DA, Scott E, *et al.* Long-term benefits and adverse effects of intermittent versus daily glucocorticoids in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013;84(6):698-705.
- 106.Roberts TC, Blomberg KE, McClorey G, *et al.* Expression analysis in multiple muscle groups and serum reveals complexity in the microRNA transcriptome of the mdx mouse with implications for therapy. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2012;1(8):e39.
- 107.Rodriguez MC, Tarnopolsky MA. Patients with dystrophinopathy show evidence of increased oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(9):1217-1220.
- 108.Russell AP, Lamon S, Boon H, *et al.* Regulation of miRNAs in human skeletal muscle following acute endurance exercise and short-term endurance training. *J Physiol.* 2013;591(18):4637-4653.
- 109.Sangkokaya C, Telen MJ, Chi JT. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. *Blood.* 2010;116(20):4338-4348.
- 110.Scott OM, Hyde SA, Goddard C, Dubowitz V. Quantitation of muscle function in children: a prospective study in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve.* 1982;5(4):291-301.
- 111.Shin J, Tajrishi MM, Ogura Y, Kumar A. Wasting mechanisms in muscular dystrophy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(10):2266-2279.
- 112.Shireman PK, Contreras-Shannon V, Ochoa O, Karia BP, Michalek JE, McManus LM. MCP-1 deficiency causes altered inflammation with impaired skeletal muscle regeneration. *J Leukoc Biol.* 2007;81(3):775-785.

113. Shraideh Z, Badran D, Hunaiti A, Battah A. Association between occupational lead exposure and plasma levels of selected oxidative stress related parameters in Jordanian automobile workers. *Int J Occup Med Environ Health*. 2018;31(4):517-525.
114. Singh R, Vijjaya, Kabra M. Multiplex PCR for rapid detection of exonal deletions in patients of duchenne muscular dystrophy. *Indian J Clin Biochem*. 2006;21(1):147-151.
115. Soleimani VD, Punch VG, Kawabe Y, *et al*. Transcriptional dominance of Pax7 in adult myogenesis is due to high-affinity recognition of homeodomain motifs. *Dev Cell*. 2012;22(6):1208-1220.
116. Stuart FA, Segal TY, Keady S. Adverse psychological effects of corticosteroids in children and adolescents. *Arch Dis Child*. 2005;90(5):500-506.
117. Terrill JR, Radley-Crabb HG, Iwasaki T, Lemckert FA, Arthur PG, Grounds MD. Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. *FEBS J*. 2013;280(17):4149-4164.
118. Tidball JG, Wehling-Henricks M. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *J Appl Physiol*. 2007;102(4):1677-1686.
119. Tualeka AR, Martiana T, Ahsan A, Russeng SS, Meidikayanti W. Association between Malondialdehyde and Glutathione (L-gamma-Glutamyl-Cysteinyl-Glycine/GSH) Levels on Workers Exposed to Benzene in Indonesia. *Maced J Med Sci*. 2019;7(7):1198-1202.
120. Verma S, Anziska Y, Cracco J. Review of Duchenne muscular dystrophy (DMD) for the pediatricians in the community. *Clin Pediatr (Phila)*. 2010;49(11):1011-1017.
121. Vignier N, Amor F, Fogel P, *et al*. Distinctive serum miRNA profile in mouse models of striated muscular pathologies. *PLoS One*. 2013;8(2):e55281.
122. Vignos PJ Jr, Archibald KC. Maintenance of ambulation in childhood muscular dystrophy. *J Chronic Dis*. 1960;12:273-290.
123. Villalta SA, Nguyen HX, Deng B, Gotoh T, Tidball JG. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2009;18(3):482-496.
124. von Maltzahn J, Jones AE, Parks RJ, Rudnicki MA. Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(41):16474-16479.

125. Whitehead NP, Pham C, Gervasio OL, Allen DG. N-Acetylcysteine ameliorates skeletal muscle pathophysiology in mdx mice. *J Physiol*. 2008;586(7):2003-2014.
126. Wehling-Henricks M, Sokolow S, Lee JJ, Myung KH, Villalta SA, Tidball JG. Major basic protein-1 promotes fibrosis of dystrophic muscle and attenuates the cellular immune response in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2008;17(15):2280-2292.
127. Williams IA, Allen DG. The role of reactive oxygen species in the hearts of dystrophin-deficient mdx mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(3):H1969-H1977.
128. Wong BL, Christopher C. Corticosteroids in Duchenne muscular dystrophy: a reappraisal. *J Child Neurol*. 2002;17(3):183-190.
129. Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D146-D152.
130. Zaharieva IT, Calissano M, Scoto M, *et al*. Dystromirs as serum biomarkers for monitoring the disease severity in Duchenne muscular Dystrophy. *PLoS One*. 2013;8(11):e80263.
131. Zammit PS, Relaix F, Nagata Y, *et al*. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 9):1824-1832.
132. Zanotti S, Gibertini S, Curcio M, *et al*. Opposing roles of miR-21 and miR-29 in the progression of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(7):1451-1464.
133. Zatz M, Rapaport D, Vainzof M, *et al*. Serum creatine-kinase (CK) and pyruvate-kinase (PK) activities in Duchenne (DMD) as compared with Becker (BMD) muscular dystrophy. *J Neurol Sci*. 1991;102(2):190-196.
134. Zhang X, Ng WL, Wang P, *et al*. MicroRNA-21 modulates the levels of reactive oxygen species by targeting SOD3 and TNF $\alpha$ . *Cancer Res*. 2012;72(18):4707-4713.
135. Zotor F, Sheehy T, Lupu M, Kolahdooz F, Corriveau A, Sharma S. Frequency of consumption of foods and beverages by Inuvialuit adults in Northwest Territories, Arctic Canada. *Int J Food Sci Nutr*. 2012;63(7):782-789.

## 12. ANEXOS

### 12.1. Anexo 1. Artículo requisito para obtener el grado.

Received: 12 May 2022 | Revised: 24 June 2022 | Accepted: 5 July 2022


DOI: 10.1111/ane.13673

ORIGINAL ARTICLE

Acta  
Neurologica  
Scandinavica

WILEY

## Natural history of circulating miRNAs in Duchenne disease: Association with muscle injury and metabolic parameters

Tomas Almeida-Becerril<sup>1,2</sup> | Maricela Rodríguez-Cruz<sup>1</sup>  |  
Stephanie Yannín Hernández-Cruz<sup>1</sup> | Eugenia Dolores Ruiz-Cruz<sup>3</sup> |  
Christian Ricardo Sánchez Mendoza<sup>3</sup> | Alan Cárdenas-Conejo<sup>4</sup> |  
Rosa Elena Escobar-Cedillo<sup>5</sup> | Federico Ávila-Moreno<sup>6</sup> | Guillermo Aquino-Jarquín<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Nutrición Molecular, Unidad de Investigación Médica en Nutrición, Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría "Dr. Silvestre Frenk Freund", Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN-SXXI), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City (CDMX), Mexico

<sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), CDMX, Mexico

<sup>3</sup>Departamento de Genética, Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital General "Dr. Gaudencio González Garza", Centro Médico Nacional La Raza, IMSS, CDMX, Mexico

<sup>4</sup>Departamento de Genética Médica, Hospital de Pediatría "Dr. Silvestre Frenk Freund", CMN-Siglo XXI, IMSS, CDMX, Mexico

<sup>5</sup>Servicio de Electrodiagnóstico y Distrofia Muscular, Instituto Nacional de Rehabilitación, CDMX, Mexico

<sup>6</sup>Lung Diseases Laboratory 12, Biomedicine Research Unit (UBIMED), Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Tlalnepantla de Baz, Estado de México, Mexico

<sup>7</sup>Laboratorio de Investigación en Genómica, Genética y Bioinformática, Hospital Infantil de México "Federico Gómez", CDMX, Mexico

#### Correspondence

Maricela Rodríguez-Cruz, Unidad de Investigación Médica en Nutrición, Hospital de Pediatría, CMN-SXXI, IMSS, Av. Cuauhtémoc No. 330, Col. Doctores, Delegación Cuauhtémoc, 06725 Ciudad de México (CDMX), México.  
Email: maricela.rodriguez.cruz@gmail.com

#### Funding information

Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social. Grant/Award Number: #FIS/IMSS/PROT/PRI0/19/117

**Objectives:** This study aimed to evaluate whether the expression of circulating dystromiRs and a group of oxidative stress-related (OS-R) miRNAs is associated with muscle injury and circulating metabolic parameters in Duchenne muscular dystrophy (DMD) patients.

**Methods:** Twenty-four DMD patients were included in this cross-sectional study. Clinical scales to evaluate muscle injury (Vignos, GMFCS, Brooke, and Medical Research Council), enzymatic muscle injury parameters (CPK, ALT, and AST), anthropometry, metabolic indicators, physical activity, serum dystromiRs (miR-1-3p, miR-133a-3p, and miR-206), and OS-R miRNAs (miR-21-5p, miR-31-5p, miR-128-3p, and miR-144-3p) levels were measured in ambulatory and non-ambulatory DMD patients.

**Results:** DystromiRs (except miR-1-3p) and miRNAs OS-R levels were lower ( $p$ -value  $< .05$ ) in the non-ambulatory group than the ambulatory group. The expression of those miRNAs correlated with Vignos scale score (For instance,  $\rho = -0.567$ ,  $p$ -value  $< .05$  for miR-21-5p) and with other scales scores of muscle function and strength. CPK, AST, and ALT concentration correlated with expression of all miRNAs (For instance,  $\rho = 0.741$ ,  $p$ -value  $< .05$  between miR-206 level and AST concentration). MiR-21-5p level correlated with glucose concentration ( $\rho = -0.369$ ,  $p$ -value = .038), and the miR-1-3p level correlated with insulin concentration ( $\rho = 0.343$ ,  $p$ -value = .05).

**Conclusions:** Non-ambulatory DMD patients have lower circulating dystromiRs and OS-R miRNAs levels than ambulatory DMD patients. The progressive muscle injury

© 2022 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

512 | wileyonlinelibrary.com/journal/ane

Acta Neurol Scand. 2022;146:512–524.

000094, 2022, 5, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ane.13673 by Universidad Nacional Autónoma De México, Wiley Online Library on [12/12/2022]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

is associated with a decrease in the expression of those miRNAs, evidencing DMD progress. These findings add new information about the natural history of DMD.

#### KEYWORDS

circulating miRNAs, Duchenne muscular dystrophy, dystromiRs, oxidative stress

## 1 | INTRODUCTION

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most severe dystrophy in childhood and occurs through mutations in the *DMD* gene leading to the absence of protein dystrophin.<sup>1,2</sup> The lack of dystrophin triggers sarcolemmal breakage and muscle degeneration giving rise to loss of ambulation between 9 and 12 years of age, with death in the late 20s caused by respiratory or heart failure.<sup>3</sup>

During the natural history of DMD, muscle injury is exacerbated by chronic inflammation and oxidative stress.<sup>4,5</sup> The release of creatine phosphokinase (CPK), alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) reflect the muscle injury.<sup>6</sup> Additionally, metabolic alterations like overweight, obesity, hyperinsulinemia, insulin resistance, hypertriglyceridemia, and metabolic syndrome could be associated with the pathophysiological processes in DMD;<sup>7,8</sup> the microRNAs (miRNAs) might play a role. Using bioinformatic analysis for dysregulated miRNAs, Amor et al predicted a central role in the perturbation of lipid metabolism in DMD. Gene expression analysis confirmed the significant up-regulation of members of the transcription factors SREBP that regulate cholesterol and fatty acids metabolism.<sup>9</sup> Thus, the miRNA expression profile could be a helpful tool for understanding the molecular mechanisms of this disease.

The most studied miRNAs in DMD are miR-1, miR-133a/b, and miR-206, also known as dystromiRs; they participate in muscle regeneration.<sup>10–12</sup> Studies in DMD patients<sup>9,10,12–19</sup> and animal models<sup>11,13,15,16,20–25</sup> have shown that circulating dystromiRs expression is upregulated in early and late clinical stages of dystrophy compared with healthy controls. However, there is no conclusive evidence whether circulating miRNA expression is associated with muscle injury, but taking into account factors like physical activity or dietary compounds that modify miRNA expression.<sup>26,27</sup>

Other miRNAs involved in DMD disease are miR-21-5p, miR-31-5p, miR-144-3, and miR-128-3p, which are oxidative stress-related (OS-R) but non-dystrophic muscle.<sup>28–30</sup> The evidence suggests that, for instance, miR-21-5p is associated with an increase of fibrosis in dystrophic muscle,<sup>28</sup> miR-31-5p represses dystrophin expression,<sup>29</sup> and miR-144-3p regulates the development and performance of the muscle fiber in DMD.<sup>30</sup> Although the expression of miR-128-3p has not been directly associated with DMD disease, its possible role as a promotor of muscle regeneration has been described.<sup>31</sup> Nevertheless, it is unknown whether those OS-R miRNAs<sup>32–35</sup> also could participate in the oxidative stress processes of DMD.

The new knowledge has demonstrated that the pathophysiology of DMD is overly complex. For instance, in addition to

oxidative stress, the metabolic alterations seem to be associated with the natural history of the disease, where the miRNAs like dystromiRs and OS-R could also play an important role. Bioinformatic analysis might be a helpful tool for exploring the oxidative stress target genes candidates of those miRNAs. However, this hypothesis needs to be confirmed. Thus, this study aimed to evaluate whether there are differences in the expression of circulating dystromiRs and OS-R miRNAs between ambulatory and non-ambulatory DMD patients and whether the expression of miRNAs is associated with muscle injury, anthropometric and metabolic parameters in DMD patients. Also, to identify genes involved in oxidative stress that are targets of dystromiRs and OS-R miRNAs by an *in-silico* analysis.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Study design and study participants

This was a prospective, cross-sectional, observational, and cohort study. Twenty-four DMD patients were recruited from the Pediatric Hospital of the CMN-SXXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), General Hospital of the CMN-La Raza, IMSS, and the National Institute of Rehabilitation (INR), Mexico City. Inclusion criteria were as follows: (I) clinical and molecular diagnosis of DMD, (II) corticosteroid naive, and (III) and not intake of supplements with antioxidants.

This research was authorized by the Institutional Ethics Committee of Scientific Research of IMSS (R-2018-785-089), and parents or legal guardians signed informed consent.

### 2.2 | Procedures

A blood sample of 3 ml from patients was collected after a 12-h overnight fast in a Vacutainer™ serum separator gel to measure the expression of dystromiRs and OS-R miRNAs, muscle injury parameters, and metabolic indicators in serum. Subsequently, the function and strength muscle were evaluated, and anthropometric parameters were registered. Finally, the Physical Activity Questionnaire for Older Children (Paq-C) and a semi-quantitative Food Frequency Questionnaire (FFQ) were applied. Blood samples were centrifuged for 10 min at 9,000 g at 4°C. The serum was separated and stored at -70°C for later analysis. Patients were classified according to ambulatory status and age (<7 and >7 years).<sup>36</sup>

## 2.3 | Measurements

### 2.3.1 | Circulating dystromiRs and OS-R miRNA expression analysis

According to the manufacturer's protocol, two hundred microliters of serum was used for total RNA extractions using the miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN®). Total RNA was quantified in Epoch 2 Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc.).

Quantitative real-time PCR was performed from 20 ng of total RNA in a MultiGene OptiMax Thermocycler (Labnet International, Inc.) using TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®), and the stem-loop reverse transcription primers of dystromiRs, OS-R miRNAs, and U6 snRNA were used as reference RNA (Applied Biosystems® in California, USA) following the manufacturer's protocols as detailed in Supplementary Material, Table S1.

The PCR amplification of 1.33 µl cDNA was carried out in a LightCycler® Nano (Roche) using 10 µl of TaqMan® universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®) and 1 µl of miRNA-specific stem-loop primers TaqMan® MicroRNA Assay (20X) (Applied Biosystems®) following the manufacturer's protocol. We used the 2<sup>-DCt</sup> method and U6 snRNA as the control for the miRNA expression analysis data normalization.

### 2.3.2 | Muscle injury evaluation

Muscle injury was evaluated with function and strength using clinical scales and quantifying circulating muscle injury markers levels. Trained clinical geneticists measured the muscle function of lower limbs was graded it using the Vignos scale<sup>37</sup> and Gross Motor Function Classification System (GMFCS).<sup>38</sup> Muscle function in upper limbs was graded using the Brooke scale.<sup>39</sup> Muscle strength was evaluated using the Medical Research Council (MRC) scale<sup>40</sup> (see Supplementary Material).

The circulating markers like CPK (U/L) were determined by chemiluminescent immunometric assay with a commercial kit (SPINREACT). ALT and AST were determined with enzymatic-colorimetric kits (SPINREACT) in a clinical analyzer SPIN 120 (SPINREACT).

### 2.3.3 | Metabolic and anthropometric parameters determination

Circulating metabolic indicators such as glucose, total cholesterol, and triglycerides were determined in serum by chemiluminescent immunometric. Insulin concentrations were determined in serum by enzyme-linked immunosorbent assay (See Supplementary Material).

Anthropometric measurements were carried out by trained nutritionists registering age, height, and body weight to calculate body mass index (BMI) percentile, and age was also recorded.

Physical activity was evaluated according to the frequency of therapy sessions and using the Paq-C.<sup>41</sup> Finally, to obtain the

frequency of food and beverage consumption, FFQ was applied<sup>42,43</sup> (See Supplementary Material).

### 2.3.4 | Prediction of genes involved in oxidative stress that are targets of dystromiRs and OS-R miRNAs by an in-silico analysis

First, we generated a list of target genes using the miRBD database,<sup>44</sup> considering a target score  $\geq 80$ . Next, we identified the target genes oxidative stress related to the online Mouse Genome Database,<sup>45</sup> considering research criteria such as *response to oxidative stress*, *antioxidant activity*, and *reactive oxygen species metabolic process*. Finally, we matched the genes selected in both databases.

## 2.4 | Statistical analyses

The SPSS statistical software (SPSS ver. 24) was used for statistical analyses. Variable distributions were evaluated with the Shapiro-Wilk test. The data were presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) when they followed a normal distribution or median (minimum, maximum) when they followed a non-normal distribution. Comparisons between ambulatory and non-ambulatory patients were performed by Student *t*-test for normal data or Mann-Whitney *U*-test for non-normal data. Correlation between variables was estimated with Spearman's *rho* correlation coefficient.

General Linear Model (GLM) was performed for each miRNA to evaluate whether muscle injury parameters, anthropometric parameters, metabolic parameters, physical activity, and frequency of food consumption are predictors of circulating dystromiRs and OS-R miRNAs levels. *p*-value  $< .05$ , 2-sided was considered for statistical significance.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Diagnostic and clinical characteristics of DMD patients

Clinical information, analysis of *DMD* gene or protein dystrophin expression, and reading frame prediction of *DMD* gene<sup>46</sup> were used to confirm the diagnosis of DMD in the twenty-four patients (Supplementary Material, Table S2).

### 3.2 | Characteristics of ambulatory and non-ambulatory DMD patients

Table 1 depicts that age, Vignos, GMFCS, and Brooke scales scores, height, and body weight were significantly (*p*-value  $< .05$ ) higher in the non-ambulatory group than in the ambulatory group. In contrast,

the MRC scale score, circulating muscle injury markers levels, total cholesterol concentration, and physical activity score were significantly ( $p$ -value  $< .001$ ) lower in non-ambulatory patients than ambulatory patients. The concentration of metabolic parameters and the frequency of food consumption were similar between groups ( $p$ -value  $> .05$ ).

### 3.3 | Serum dystromiRs and OS-R miRNAs levels in ambulatory and non-ambulatory DMD patients and correlation with muscle injury

#### 3.3.1 | DystromiRs

We found that serum miR-133a-3p and miR-206 levels were lower in non-ambulatory patients than ambulatory patients ( $p$ -value  $\leq .01$ ), but the serum miR-1-3p expression did not reach significance ( $p$ -value = .056, Figure 1A–C). When we stratified the patients according to age, serum all dystromiRs levels were significantly ( $p$ -value  $\leq .05$ ) lower in DMD patients with  $>7$  years of age than those younger (Figure 1D–F).

Although a borderline correlation ( $\rho = -0.313$ ,  $p$ -value = .068) between Vignos scale score and the serum miR-1-3p expression was observed (Figure 2A), this score correlated significantly ( $p$ -value  $< .05$ ) with the serum miR-133a-3p ( $\rho = -0.533$ , Figure 2B) and miR-206 ( $\rho = -0.469$ , Figure 2C) expression. Other scale score such as GMFCS correlated ( $\rho = -0.340$ ,  $p$ -value = .05) with the serum miR-1-3p expression, but we did not identify correlation between Brooke scale score and the serum dystromiRs ( $p$ -value  $> .05$ , Table 2) levels. MRC scale score showed a positive significant ( $p$ -value  $< .05$ ) correlation with the serum miR-133a-3p and miR-206 expression (Table 2). Serum of the three dystromiRs levels positively correlated ( $p$ -value  $< .05$ ) with CPK, AST, and ALT concentrations and negatively ( $p$ -value  $< .05$ ) with age (Table 2).

#### 3.3.2 | OS-R miRNAs

The serum levels of the four OS-R miRNAs were significantly ( $p$ -value  $\leq .05$ ) lower in non-ambulatory DMD patients than in ambulatory DMD patients (Figure 3A–D). Also, those OS-R miRNAs levels were lower ( $p$ -value  $\leq .05$ ) in dystrophic older patients compared with the dystrophic younger group, except for miR-31-5p ( $p$ -value = .128) (Figure 3E–H).

Vignos scale score correlated significantly ( $p$ -value  $< .05$ ) with the serum miR-21-5p, miR-31-5p, miR-128-3p, and miR-144-3p ( $\rho = -0.567$ ,  $-0.393$ ,  $-0.564$ , and  $-0.413$ , respectively) levels (Figure 4A–D). The GMFCS scale score significantly ( $p$ -value  $< .05$ ) correlated with the serum miR-21-5p and miR-128-3p ( $\rho = -0.387$  and  $\rho = -0.384$ , respectively) expression. However, no correlations ( $p$ -value  $> .05$ ) were identified between the Brooke scale score and the serum levels of the four OS-R miRNAs (Table 2). MRC score significantly ( $p$ -value  $< .05$ ) correlated with the serum miR-21-5p,

miR-128-3p, and miR-144-3p ( $\rho = 0.487$ ,  $0.441$ , and  $0.408$ , respectively) expression (Table 2).

The serum levels of the four OS-R miRNAs correlated ( $p$ -value  $< .05$ , Table 2) positively with CPK, AST, and ALT concentrations and negatively with age.

### 3.4 | Correlation between serum miRNAs levels and anthropometry, metabolic indicators, physical activity, and frequency of food consumption in DMD patients

The serum levels of the three dystromiRs and those levels of the four OS-R miRNAs correlated ( $p$ -value  $\leq .05$ ) with height, but only miR-1-3p expression correlated with body weight ( $p$ -value  $\leq .01$ ). Similar correlations for body weight were observed, except for serum miR-133a-3p and miR-206 expression. However, only the expression of miR-133a-3p correlated ( $\rho = 0.348$ ,  $p$ -value = .048) with the BMI percentile.

Serum miR-1-3p levels correlated ( $\rho = 0.343$ ,  $p$ -value = .05) with insulin concentration and serum miR-21-5p expression correlated ( $\rho = -0.369$ ,  $p$ -value = .038) with glucose levels (Table 2).

Only serum miR-206 and miR-1-3p expression correlated with Pac-C score and beverage's consumption ( $\rho = 0.384$ ,  $p$ -value = .039 and  $\rho = -0.394$ ,  $p$ -value = .035, respectively, Table 2).

Additionally, we performed the analyses only considering ambulatory patients, but no consistent correlations with age, muscle injury parameters, anthropometric parameters, metabolic indicators, physical activity, and frequency of food consumption were found (Supplementary Table S3).

Correlations analyses between serum of dystromiRs and OS-R miRNA expression evidenced significant positive correlation among those miRNAs ( $p$ -value  $< 0.001$ , Supplementary Table S4). The strongest correlation was observed between the serum dystromiRs expression; miR-133a-3p, and miR-206 ( $\rho = 0.939$ ); and between the serum OS-R miRNAs levels, miR-21-5p with miR-128-3p ( $\rho = 0.970$ ) and with miR-144-3p ( $\rho = 0.917$ ), and between miR-128-3p with miR-144-3p ( $\rho = 0.937$ ).

### 3.5 | Predictors of circulating expression of miRNAs in DMD patients

The GLM analyses adjusted by covariables allowed us to identify the parameters that influence circulating miRNA expression (Supplementary Table S5). Regarding the dystromiRs expression, the model 1 ( $p$ -value = .001) showed that serum miR-133a-3p, miR-21-5p, miR-128-3p, and miR-144-3p levels predict the miR-1-3p expression. The model 2 ( $p$ -value  $< .001$ ) showed that serum miR-1-3p, miR-206, miR-21-5p, and miR-128-3p levels predict miR-133a-3p expression. Finally, the model 3 ( $p$ -value  $< .001$ ) showed that serum miR-133a-3p levels predict the miR-206 expression.

TABLE 1 Characteristics of ambulatory and non-ambulatory DMD patients

	Ambulatory <i>n</i> = 18	Non-ambulatory <i>n</i> = 6	<i>p</i> -Value
Age (year)	6.59 ± 2.58	13.18 ± 1.3	<.001 <sup>a</sup>
<b>Muscle injury parameters</b>			
Vignos scale (score)	3 (2, 4)	9 (9, 9)	<.001 <sup>b</sup>
GMFCS scale (score)	2 (1, 2)	5 (4, 5)	<.001 <sup>b</sup>
Brooke scale (score)	2 (1, 3)	3 (2, 4)	<.001 <sup>b</sup>
MRC muscle strength (%)	91 (80, 100) <sup>†</sup>	71 (43, 77) <sup>‡</sup>	<.001 <sup>b</sup>
CPK (U/L)	14,661 ± 7371	5842 ± 1601	<.001 <sup>a</sup>
AST (U/L)	199.61 ± 66.78	97.67 ± 18.82	<.001 <sup>a</sup>
ALT (U/L)	268.22 ± 95.47	83.67 ± 32.14	<.001 <sup>a</sup>
<b>Anthropometric parameters</b>			
Height (cm)	111.1 ± 16.34	149.48 ± 14.09	<.001 <sup>a</sup>
Body weight (kg)	17.95 (11.7, 48.8)	39.2 (22.2, 53.4)	.006 <sup>b</sup>
BMI (percentile)	31.5 (1, 97)	6 (1, 77)	.090 <sup>b</sup>
<b>Metabolic indicators</b>			
Glucose (mg/dl)	84.33 ± 7.68	87.17 ± 8.91	.459 <sup>a</sup>
Insulin (μU/ml)	5.65 (5.1, 22.7)	5.7 (4.9, 7.6)	.581 <sup>b</sup>
HOMA-IR	1.2 (0.99, 4.65)	1.16 (1.08, 1.87)	.770 <sup>b</sup>
Triglycerides (mg/dl)	134 (56, 326)	119.5 (80, 290)	.581 <sup>b</sup>
Total cholesterol (mg/dl)	165 (124, 264)	115.5 (108, 155)	.001 <sup>b</sup>
VLDL-C (mg/dl)	26.8 (11.2, 65.2)	23.9 (16, 58)	.581 <sup>b</sup>
<b>Physical activity parameters</b>			
Paq-C (score)	2.43 ± 0.82 <sup>§</sup>	1.46 ± 0.31	.011 <sup>a</sup>
Physical therapy (s/w)	5 (0, 7)	1 (0, 2)	.199 <sup>b</sup>
<b>Frequency of food consumption</b>			
Vegetables	0.181 ± 0.108 <sup>§</sup>	0.215 ± 0.058	.347 <sup>a</sup>
Fruits	0.132 (0.015, 0.335) <sup>§</sup>	0.175 (0.110, 0.474)	.185 <sup>b</sup>
Milk and milk products	0.206 ± 0.091 <sup>§</sup>	0.201 ± 0.137	.914 <sup>a</sup>
Fish and sea food	0.020 (0, 0.078) <sup>§</sup>	0.056 (0, 0.127)	.267 <sup>b</sup>
Red meat	0.055 (0, 0.270) <sup>§</sup>	0.083 (0.019, 0.097)	.555 <sup>b</sup>
White meat	0.153 ± 0.089 <sup>§</sup>	0.132 ± 0.051	.592 <sup>a</sup>
Legumes	0.084 ± 0.058 <sup>§</sup>	0.081 ± 0.046	.936 <sup>a</sup>
Cereals and tubers	0.196 (0.070, 0.450) <sup>§</sup>	0.226 (0.203, 0.292)	.210 <sup>b</sup>
Animal and vegetable fats	0.134 ± 0.084 <sup>§</sup>	0.175 ± 0.048	.269 <sup>a</sup>
Sugars and confectionery	0.140 (0, 0.656) <sup>§</sup>	0.180 (0.048, 0.460)	.883 <sup>b</sup>
Beverages	0.190 ± 0.134 <sup>§</sup>	0.218 ± 0.212	.714 <sup>a</sup>
Traditional or fast food	0.052 (0.017, 0.257) <sup>§</sup>	0.041 (0.017, 0.110)	.606 <sup>b</sup>

Note: Data are shown as mean ± standard deviation (SD) or median (minimum, maximum).

Note: Physical activity was obtained applying the physical activity questionnaire-C (Paq-C).

Note: The value of *n* changes as follows because some data were unavailable: <sup>†</sup>*n* = 17, <sup>‡</sup>*n* = 5 and <sup>§</sup>*n* = 16.

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; CPK, creatine phosphokinase; DMD, Duchenne muscular dystrophy; GMFCS, Gross Motor Function Classification System; HOMA-IR, Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance; MRC, Medical Research Council; s/w, sessions/week; VLDL-C, very low-density lipoprotein-cholesterol.

<sup>a</sup>Student *t*-test.

<sup>b</sup>Mann-Whitney *U*-test.



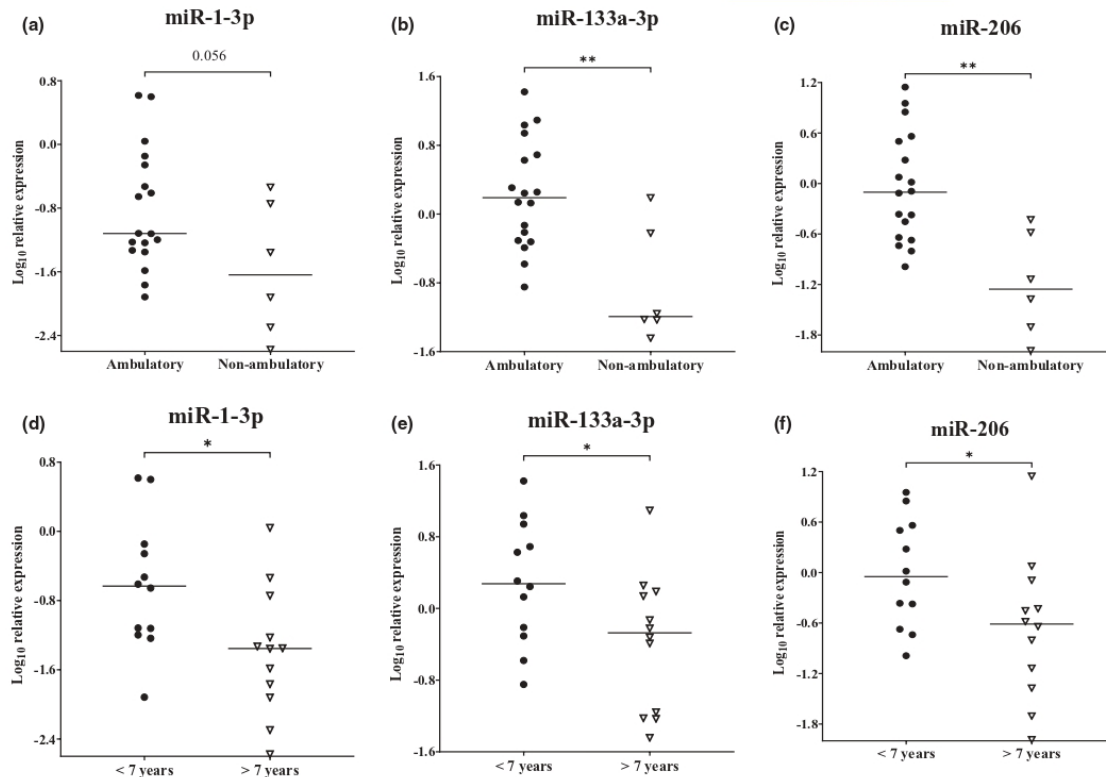


FIGURE 1 Circulating dystromiRNAs in DMD patients. (A–C) Comparison between ambulatory ( $n = 18$ ) and non-ambulatory ( $n = 6$ ) DMD patients: (A) miR-1-3p, (B) miR-133a-3p, and (C) miR-206. (D–F) Comparison between DMD patients <7 years of age ( $n = 12$ ) and DMD patients >7 years of age ( $n = 12$ ): (D) miR-1-3p, (E) miR-133a-3p, and (F) miR-206. Mann–Whitney  $U$ -test. \* $p \leq .05$ , \*\* $p \leq .01$ . Data were transformed to  $\text{Log}_{10}$  only for a better data representation.

Concerning the OS-R miRNA expression, model 4 ( $p$ -value < .001) showed that Vignos scale score, GMFCS scale score, miR-1-3p, miR-133a-3p, and miR-128-3p levels predict miR-21-5p expression. The model 5 ( $p$ -value < .001) showed that serum miR-133a-3p, miR-128-3p, and miR-144-3p levels predict miR-31-5p expression. The model 6 ( $p$ -value < .001) showed that Vignos and GMFCS scales scores, serum miR-1-3p, miR-133a-3p, miR-21-5p, and miR-144-3p levels predict miR-128-3p expression. The last model ( $p$ -value < .001) showed that serum miR-31-5p and miR-128-3p levels predict the miR-144-3p expression.

All models computed predict at least 96% of circulating miRNA expression. Also, the two most robust predictors expression were the miR-133a (which predicts the serum of the three dystromiRNAs and the four OS-R miRNA expression) and miR-128-3p (which predicts two dystromiRNAs and the four OS-R miRNA expression).

### 3.6 | Prediction of genes involved in oxidative stress that are targets of dystromiRNAs and OS-R miRNAs by an *in-silico* analysis

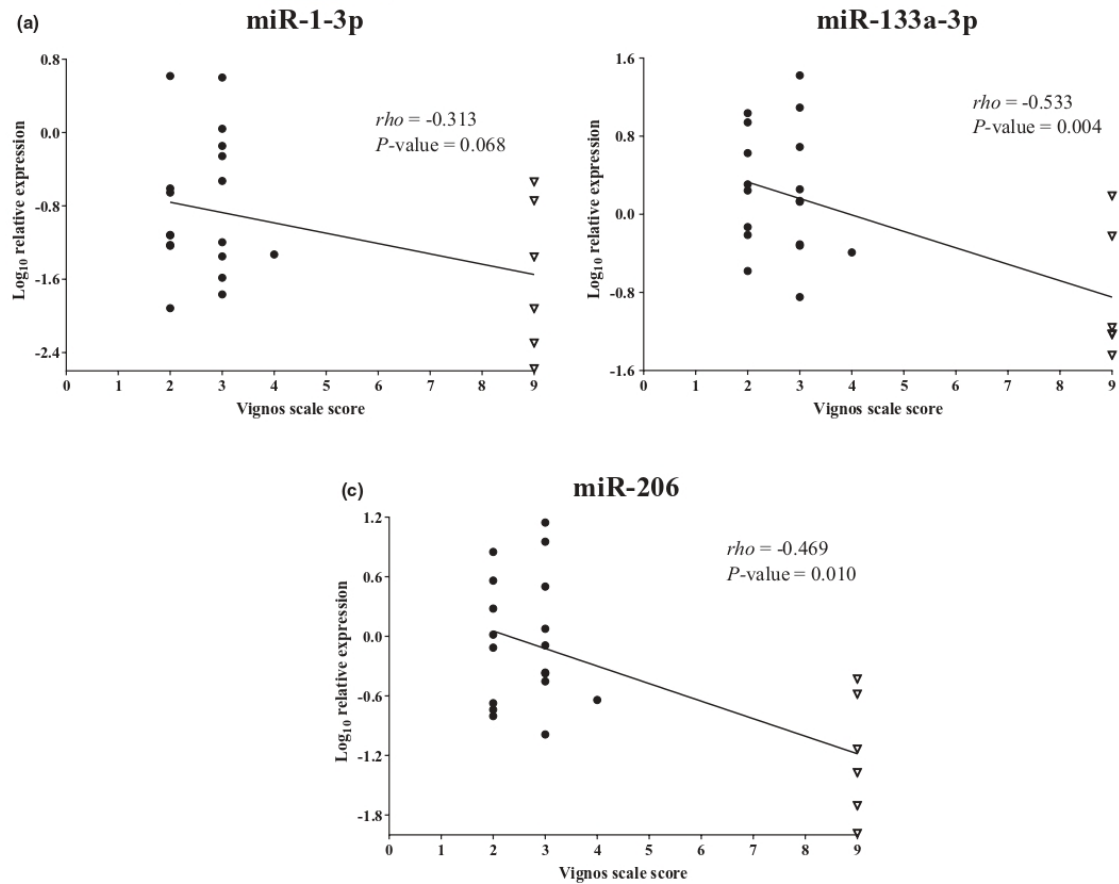
The *in-silico* analysis predicted the following target genes related to oxidative stress. For dystromiRNAs: 30 for miR-1-3p, 17 for

miR-133a-3p, and 31 for miR-206 genes were found. For OS-R miRNAs: 12 for miR-21-5p, 15 for miR-31-5p, 24 for miR-128-3p, and 22 for miR-144-3p were identified (Supplementary Table S6–S12). All those genes target either the 3'-UTR, the coding region, or the 5'-UTR.

## 4 | DISCUSSION

This is the first study that reports the circulating expression of miRNAs associated with diverse clinical parameters in DMD patients graded by muscle damage. Some miRNAs are essential for muscle development and metabolism, and different studies have shown that circulating dystromiRNAs and OS-R miRNA expression is dysregulated in DMD.<sup>9,10,12–19</sup> However, the most significant limitation of those studies is the restricted interpretation of miRNA expression because of the scarce consideration of clinical traits.

Our findings demonstrated a lower circulating dystromiRNAs expression in patients with worse muscle function than those DMD patients with better muscle function, which agrees with Zaharieva et al.<sup>12</sup> The low expression of miRNAs may reflect reduced muscle mass and physical activity, passive leakiness from damaged fibers,



**FIGURE 2** Correlation of Vignos scale score and circulating dystromiRs expression in DMD patients. (A) miR-1-3p, (B) miR-133a-3p, and (C) miR-206. The correlation was computed by Spearman's correlations ( $N = 24$ ). Data were transformed to  $\text{Log}_{10}$  for a better data representation.

the active passage of miRNAs through the dystrophic sarcolemma, or pathophysiological evolution associated with transcriptional adaptation.<sup>9</sup> It is well known that older DMD patients have substantial muscle damage,<sup>36</sup> and we are adding knowledge that circulating dystromiRs expression decreases when age increases. However, these outcomes contrast with findings reported by Zaharieva et al<sup>12</sup> and Li et al<sup>15</sup> because, in both studies, no correlations were observed between age and dystromiRs expression. Also, we observed that patients older than seven years expressed lower dystromiRs levels than younger patients. Our results agree with an adverse change in muscle function reported at seven years of age in DMD.<sup>36</sup> Therefore, we can hypothesize that age of seven might be a cutoff to decreasing circulating dystromiRs even before the loss of ambulation.

Circulating dystromiRs levels decrease when the Vignos scale score increases; however, this pattern was not observed with the Brooke scale score. Thus, we propose that dystromiRs levels might better indicate muscle injury in lower limbs than in upper limbs.

Nevertheless when just ambulatory patients were considered, almost all correlations were lost and only dystromiR miR-206 expression correlated with GMFCS and Brooke scale score, as similarly reported by Cacchiarelli et al and Hu et al. Those authors found positive correlations between circulating dystromiRs levels like miR-206 and worst muscle function in ambulatory patients 3–6 and 4–12 years.<sup>10,14</sup> Therefore, we hypothesized that miR-206 expression might be a candidate to indicate muscle injury in the upper limbs in ambulatory DMD patients. More studies are required to confirm this hypothesis.

Additionally, only the expression of miR-206 augments when physical activity increases, similarly reported by Gomes et al. Those authors described that circulating miR-206 levels increased 4.3 times in healthy males ( $n = 5$ ) after running a half marathon.<sup>26</sup> We probably did not observe a correlation between physical activity indicators with the other two dystromiRs (miR-1-3p and miR133a-3p) levels because physical activity is less intensive in DMD patients than in healthy boys. Thus, our findings reinforce the proposal of

**TABLE 2** Correlation of age, muscle injury parameters, anthropometric parameters, metabolic parameters, physical activity, and frequency of food consumption with serum miRNA expression of DMD patients

	DystromiRs miR-1-3p	miR-133a-3p	miR-206	OS-R miRNAs miR-21-5p	miR-31-5p	miR-128-3p	miR-144-3p
Age (year)	-0.554**	-0.450*	-0.494**	-0.558**	-0.371*	-0.552**	-0.475**
<b>Muscle injury parameters</b>							
GMFCS scale (score)	-0.340*	-0.328	-0.320	-0.387*	-0.245	-0.384*	-0.260
Brooke scale (score)	0.060	-0.229	-0.231	-0.269	-0.248	-0.251	-0.126
MRC muscle strength (%) <sup>a</sup>	0.234	0.431*	0.438*	0.487**	0.291	0.441*	0.408*
CPK (U/L)	0.415*	0.582**	0.659**	0.510**	0.420*	0.516**	0.536**
AST (U/L)	0.406*	0.656**	0.741**	0.635**	0.609**	0.634**	0.634**
ALT (U/L)	0.397*	0.664**	0.676**	0.660**	0.538**	0.655**	0.650**
<b>Anthropometric parameters</b>							
Height (cm)	-0.572**	-0.339*	-0.373*	-0.506**	-0.348*	-0.490**	-0.417*
Body weight (kg)	-0.521**	-0.212	-0.263	-0.438*	-0.350*	-0.416*	-0.341*
BMI (percentile)	0.020	0.348*	0.253	0.120	-0.144	0.146	-0.134
<b>Metabolic indicators</b>							
Glucose (mg/dl)	-0.303	-0.295	-0.268	-0.369*	-0.287	-0.284	-0.151
Insulin (μU/ml)	0.343*	0.145	0.158	0.142	0.037	0.140	0.152
HOMA-IR	0.263	0.040	0.097	-0.019	-0.083	0.045	0.147
Tryglicerides (mg/dl)	0.009	0.304	0.152	-0.030	-0.219	0.070	0.040
Total cholesterol (mg/dl)	-0.007	0.291	0.245	0.161	0.023	0.207	0.156
VLDL-C (mg/dl)	0.009	0.304	0.152	-0.030	-0.219	0.070	0.040
<b>Physical activity parameters</b>							
Paq-C (score) <sup>a</sup>	0.135	0.276	0.384*	0.347	0.329	0.330	0.281
Physical therapy (s/w)	0.266	0.144	0.144	0.016	0.007	0.034	-0.019
<b>Frequency of food consumption<sup>a</sup></b>							
Vegetables	0.108	0.339	0.219	0.229	-0.059	0.246	0.248
Fruits	-0.118	0.104	0.043	0.182	0.007	0.176	0.138
Milk and milk products	-0.232	0.295	0.281	0.117	0.184	0.124	-0.051
Fish and sea food	0.196	0.257	0.148	0.247	0.195	0.228	0.226
Red meat	0.101	0.025	0.043	-0.195	-0.045	-0.150	-0.136
White meat	-0.148	0.171	0.122	0.041	-0.082	0.054	-0.015
Legumes	0.095	0.283	0.254	0.038	-0.182	0.055	0.152
Cereals and tubers	0.051	0.142	0.043	0.014	-0.181	0.020	-0.054
Animal and vegetable fats	-0.113	-0.094	-0.149	-0.233	-0.089	-0.246	-0.207
Sugars and confectionery	-0.257	-0.021	0.062	-0.006	0.077	-0.010	-0.046
Beverages	-0.394*	-0.086	0.060	-0.077	0.256	-0.125	-0.174
Traditional or fast food	0.144	0.194	0.267	0.297	0.212	0.243	0.297

Note: Correlation coefficients calculated by Spearman correlation ( $N = 24$ ).

Note: The value of  $n$  changes in some variables because some data were unavailable.

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; CPK, creatine phosphokinase; GMFCS, Gross Motor Function Classification System; HOMA-IR, Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance; MRC, Medical Research Council; OS-R miRNAs, oxidative stress related miRNAs; Paq-C, physical activity questionnaire-C; s/w, sessions/week; VLDL-C, very low-density lipoprotein-cholesterol.

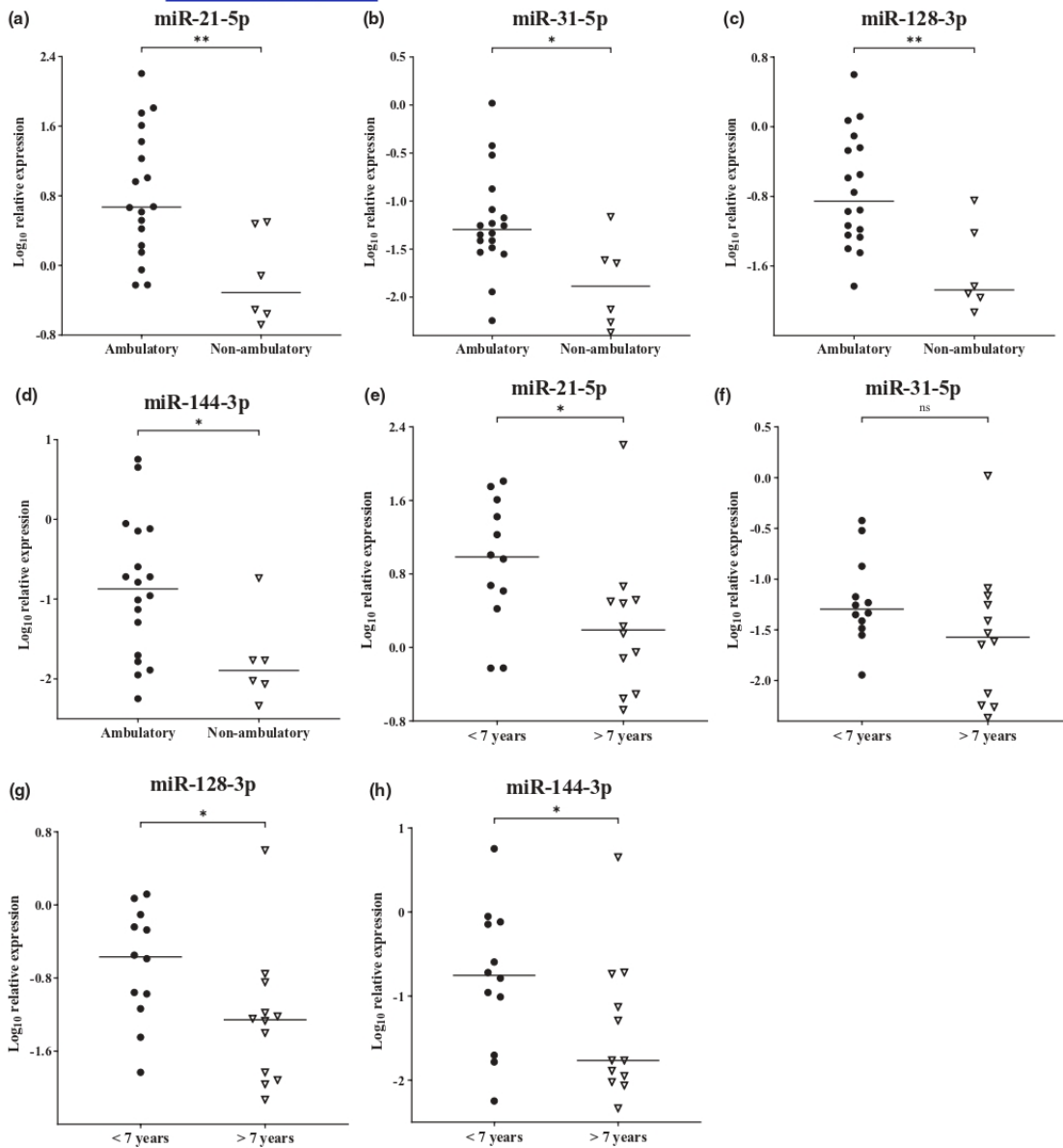
<sup>a</sup> $N = 22$ .

\* $p$ -value  $\leq .05$ ; \*\* $p$   $\leq .01$ .

Gomes et al that circulating miR-206 expression might be a potential biomarker of muscle damage in DMD.

Regarding the OS-R miRNAs, we proved that DMD patients with worse muscle function have lower circulating miR-31-5p

and miR-128-3p levels than ambulatory boys, which agrees with Zaharieva et al<sup>12</sup> and Amor et al<sup>9</sup> reports. Moreover, we are reporting for the first time that serum miR-21-5p and miR-144-3p expression are also lower in non-ambulatory DMD patients than in ambulatory



**FIGURE 3** Circulating OS-R miRNAs in DMD patients. (A–D) Comparison between ambulatory ( $n = 18$ ) and non-ambulatory ( $n = 6$ ) DMD patients: (A) miR-21-5p, (B) miR-31-5p, (C) miR-128-3p and (D) miR-144-3p. (E–H) Comparison between DMD patients <7 years of age ( $n = 12$ ) and DMD patients >7 years of age ( $n = 12$ ): (E) miR-21-5p, (F) miR-31-5p, (G) miR-128-3p, and (H) miR-144-3p. Mann-Whitney  $U$ -test. \* $p \leq .05$ , \*\* $p \leq .01$ , ns, not statistically significant. Data were transformed to  $\text{Log}_{10}$  only for a better data representation.

patients. Muscle injury augments as age, and we are adding new knowledge about circulating OS-R miRNA expression decreases as age increases, except for the miR-31-5p level. DMD patients older than seven years express lower levels of circulating OS-R miRNAs than younger patients. Thus, those miRNA expressions seem to be involved with adverse changes in muscle function at seven years; that

age was proposed by Mazzone et al.<sup>36</sup> Because serum OS-R miRNA expression only decreases as the Vignos scale score increases and not with the Brooke scale score, those miRNA expression might be associated with muscle damage in lower extremities, at least at the age of studied patients. However, we should consider that DMD individuals experience weakness in the upper limbs later.<sup>36</sup>

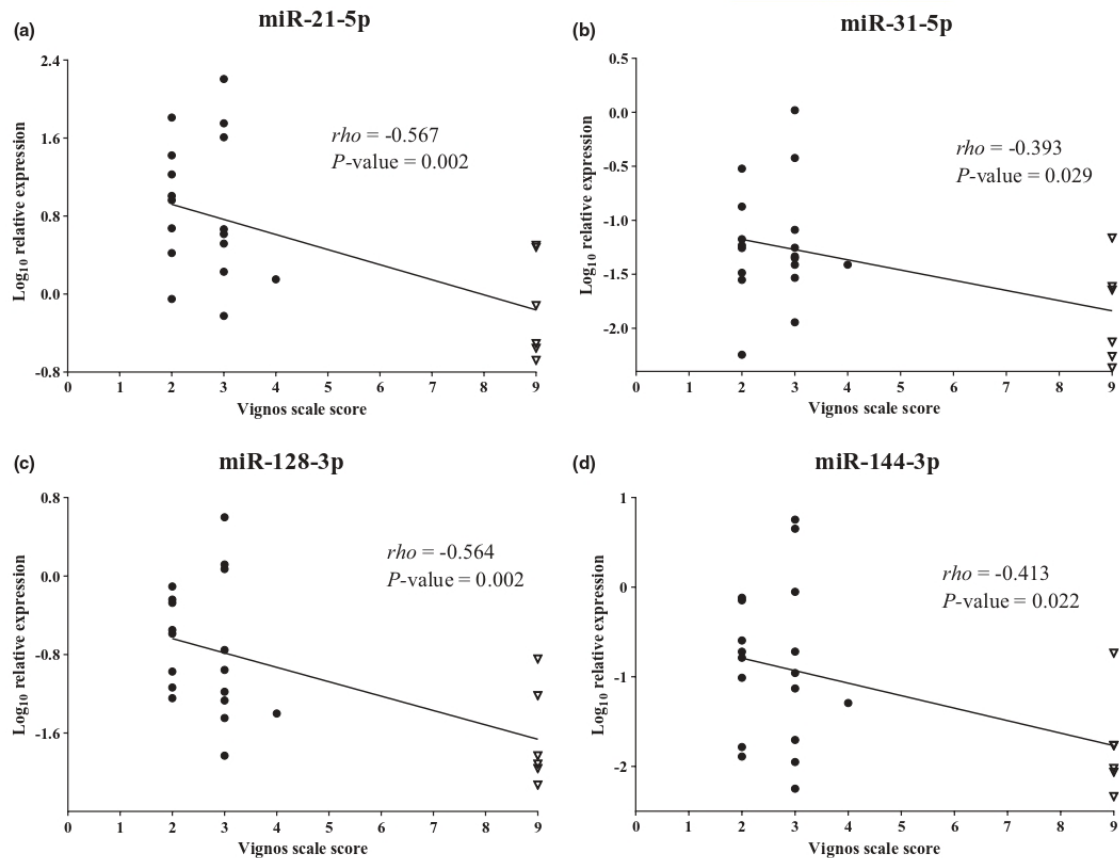


FIGURE 4 Correlation of Vignos scale score and circulating OS-R miRNAs in DMD patients. (A) miR-21-5p, (B) miR-31-5p, (C) miR-128-3p, and (D) miR-144-3p. The correlation was computed by Spearman's correlations ( $N = 24$ ). Data were transformed to  $\text{Log}_{10}$  for a better data representation.

The correlation of serum dystromiRs and OS-R miRNAs levels with enzymatic markers concentration of muscle injury support the hypothesis that those miRNA expression decreases when muscle function is worst.

Additionally, we evaluated DMD patients' different metabolic perturbation indicators (glucose, insulin, triglycerides, total cholesterol, VLDL-cholesterol concentration, and insulin resistance).<sup>7,8</sup> However, we only identified that miR-21-5p and miR-1-3p levels are associated with glucose and insulin concentration. Serum miR-21-5p expression increases as serum glucose concentration decreases. MiR-21-5p has a critical role in hepatic gluconeogenesis. It targets forkhead box O1 pathway-mediated downregulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase as observed in diabetic mice and primary hepatocytes.<sup>47,48</sup> Thus, miR-21-5p might act in the liver to modulate the circulating glucose. However, more studies are needed to confirm this proposal. Additionally, the positive correlation between miR-1-3p and circulating insulin concentration is an important field to explore because no studies support our observation.

In addition, we identified the most important predictors of circulating miRNAs evaluated in this study. We found that miR-133a-3p and miR-128-3p, previously reported as downregulated in older patients with DMD,<sup>9</sup> are the most common predictors of expression of all miRNAs analyzed. Thus, we hypothesize that both miRNAs could be central regulators of the seven miRNAs analyzed. Our proposal is based on the evidence that miR-133a-3p and miR-128-3p modulate myoblast proliferation and myotubes and play a diverse role in muscle pathophysiology<sup>9</sup> regulating muscle mass. It is reinforced because we also found that the Vignos scale and GMFCS scores are predictors of circulating miR-21-5p and miR-128-3p levels.

Finally, the *in silico* analysis of dystromiRs and OS-R allowed us to identify 151 genes as potential regulators of oxidative stress in DMD disease. The most relevant gene identified was the master transcription nuclear NRF2 which triggers the antioxidant activity.<sup>5,49</sup> Our findings show that NRF2 is a target gene of miR-144-3p. Therefore, miR-144-3p might be the main regulator of oxidative stress in DMD disease. However, further studies are required to confirm this hypothesis.

This is the first study that reports dysregulated oxidative stress-related miRNAs in the serum of DMD patients. Also, both types of miRNAs, dystromiRs and OS-R miRNAs, are associated with muscle damage and age and seem to be regulated between them. Thus, we propose this group of seven miRNAs for monitoring DMD progression or therapeutic interventions. The present research opens a field of study to consider dystromiRs and OS-R miRNAs as regulators of oxidative stress, which is increased in dystrophic muscle and is strongly associated with myonecrosis and inflammation of the complex pathophysiology of DMD.

Limitations of this study are the small sample, the absence of a healthy control group, and the cross-sectional design, which makes it hard to determine a cause-and-effect relationship compared with a longitudinal study and validation of target genes of miRNAs analyzed. Strengths are the criteria selection of the study population discarding Becker muscular dystrophy. Moreover, we included not previously considered muscle injury parameters such as muscle function and muscle strength of upper and lower limbs, the control of potential factors such as food and beverage consumption and physical activity that influence circulating dystromiRs, and OS-R miRNA expression. In addition, predictors of circulating miRNAs were considered.

## 5 | CONCLUSIONS

Circulating dystromiRs and OS-R miRNA expression are lower in patients with worse muscle function than in patients with better muscle function. Those circulating miRNA expression decreased is associated with more muscle injury in the lower limb. Furthermore, circulating insulin and glucose concentration could be influenced by miR-1-3p and miR-21-5p expression, respectively. In addition, the deregulation of circulating dystromiRs and OS-R miRNAs found in this study and the possible target genes related to oxidative stress open a field of study about epigenetic contribution to oxidative damage in DMD caused by non-classical mechanisms. This group of seven miRNAs might help monitor DMD progression or therapeutic interventions; however, more studies are required to confirm this proposal. Thus, this study provides new information on the natural history of DMD.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Tomas Almeida-Becerril: Conceptualization (equal), data curation (equal), formal analysis (equal), investigation (equal), methodology (equal), supervision (equal), writing original draft (equal). Maricela Rodríguez-Cruz: Conceptualization (lead), funding acquisition (lead), investigation (lead), project administration (lead), resources (lead), supervision (lead), writing review & editing (lead). Stephanie Yannin Hernández-De la Cruz: data curation (supporting), formal analysis (supporting), methodology (supporting), writing review & editing (supporting). Eugenia Dolores Ruiz-Cruz: Investigation (supporting), methodology (supporting), supervision (supporting), writing review & editing (supporting). Christian Ricardo Sánchez

Mendoza methodology (supporting), data curation (supporting). Alan Cárdenas-Conejo: Investigation (supporting), methodology (supporting), supervision (supporting), writing review & editing (supporting). Rosa Elena Escobar-Cedillo: Investigation (supporting), methodology (supporting), supervision (supporting), writing review & editing (supporting). Federico Avila-Moreno: Supervision (supporting), methodology (supporting), data curation (supporting), writing review & editing (supporting). Guillermo Aquino-Jarquín: Supervision (supporting), methodology (supporting), data curation (supporting), writing review & editing (supporting).

### ACKNOWLEDGMENTS

The first author is a doctoral student from the "Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas" at UNAM and received fellowship 629546 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. The authors appreciate patients and their families for their participation in the research.

### FUNDING INFORMATION

This research was funded by the Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social, México (grant #FIS/IMSS/PROT/PRI0/19/117).

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

### PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1111/ane.13673>.

### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data supporting this study's findings are available from the corresponding author (MR-C) upon reasonable request.

### ETHICS STATEMENT

The local institutional ethics committee approved this study before the initiation of patient recruitment under permits R-2018-785-089.

### ORCID

Maricela Rodríguez-Cruz  <https://orcid.org/0000-0001-8496-4023>

### REFERENCES

- Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases—a world survey. *Neuromuscul Disord.* 1991;1(1):19-29.
- 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.* 2016;96(1):253-305.
- Verma S, Anziska Y, Cracco J. Review of Duchenne muscular dystrophy (DMD) for the pediatricians in the community. *Clin Pediatr (Phila).* 2010;49(11):1011-1017.
- Cruz-Guzmán OD, Rodríguez-Cruz M, Escobar Cedillo RE. Systemic inflammation in Duchenne muscular dystrophy: association with muscle function and nutritional status. *Biomed Res Int.* 2015;2015:891972.

5. Almeida-Becerril T, Rodríguez-Cruz M, Sánchez-González JR, et al. Circulating markers of oxidative stress are associated with a muscle injury in patients with muscular dystrophy Duchenne. *Brain Dev.* 2021;43(1):111-120.
6. Rodríguez-Cruz M, Almeida-Becerril T, Atilano-Miguel S, Cárdenas-Conejo A, Bernabe-García M. Natural history of serum enzyme levels in Duchenne muscular dystrophy and implications for clinical practice. *Am J Phys Med Rehabil.* 2020;99(12):1121-1128.
7. Rodríguez-Cruz M, Sánchez R, Escobar RE, et al. Evidence of insulin resistance and other metabolic alterations in boys with Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Int J Endocrinol.* 2015;2015:867273.
8. Rodríguez-Cruz M, Cruz-Guzmán OR, Escobar RE, López-Alarcón M. Leptin and metabolic syndrome in patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Acta Neurol Scand.* 2016;133(4):253-260.
9. Amor F, Vu Hong A, Corre G, et al. Cholesterol metabolism is a potential therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2021;12(3):677-693.
10. Cacchiarelli D, Legnini I, Martone J, et al. miRNAs as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *EMBO mol Med.* 2011;3(5):258-265.
11. Roberts TC, Godfrey C, McClorey G, et al. Extracellular microRNAs are dynamic non-vesicular biomarkers of muscle turnover. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(20):9500-9513.
12. Zaharieva IT, Calissano M, Scoto M, et al. Dystromirs as serum biomarkers for monitoring the disease severity in Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One.* 2013;8(11):e80263.
13. Vignier N, Amor F, Fogel P, et al. Distinctive serum miRNA profile in mouse models of striated muscular pathologies. *PLoS One.* 2013;8(2):e55281.
14. Hu J, Kong M, Ye Y, Hong S, Cheng L, Jiang L. Serum miR-206 and other muscle-specific microRNAs as non-invasive biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *J Neurochem.* 2014;129(5):877-883.
15. Li X, Li Y, Zhao L, et al. Circulating muscle-specific miRNAs in Duchenne muscular dystrophy patients. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2014;3(7):e177.
16. Matsuzaka Y, Tanihata J, Komaki H, et al. Characterization and functional analysis of extracellular vesicles and muscle-abundant miRNAs (miR-1, miR-133a, and miR-206) in C2C12 myocytes and mdx mice. *PLoS One.* 2016;11(12):e0167811.
17. Becker S, Florian A, Patrascu A, et al. Identification of cardiomyopathy associated circulating miRNA biomarkers in patients with muscular dystrophy using a complementary cardiovascular magnetic resonance and plasma profiling approach. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2016;18(1):1-14.
18. Llano-Diez M, Ortez CI, Gay JA, et al. Digital PCR quantification of miR-30c and miR-181a as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 2017;27(1):15-23.
19. Mousa NO, Abdellatif A, Fahmy N, Zada S, El-Fawal H, Osman A. Circulating MicroRNAs in Duchenne muscular dystrophy. *Clin Neurol Neurosurg.* 2020;189:105634.
20. Mizuno H, Nakamura A, Aoki Y, et al. Identification of muscle-specific microRNAs in serum of muscular dystrophy animal models: promising novel blood-based markers for muscular dystrophy. *PLoS One.* 2011;6(3):e18388.
21. Roberts TC, Blomberg KE, McClorey G, et al. Expression analysis in multiple muscle groups and serum reveals complexity in the microRNA transcriptome of the mdx mouse with implications for therapy. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2012;1(8):e39.
22. Goyenville A, Babbas A, Wright J, et al. Rescue of severely affected dystrophin/utrophin-deficient mice through scAAV-U7snRNA-mediated exon skipping. *Hum Mol Genet.* 2012;21(11):2559-2571.
23. Jeanson-Leh L, Lameth J, Krime S, et al. Serum profiling identifies novel muscle miRNA and cardiomyopathy-related miRNA biomarkers in Golden retriever muscular dystrophy dogs and Duchenne muscular dystrophy patients. *Am J Pathol.* 2014;184(11):2885-2898.
24. Coenen-Stass AM, Betts CA, Lee YF, et al. Selective release of muscle-specific, extracellular microRNAs during myogenic differentiation. *Hum Mol Genet.* 2016;25(18):3960-3974.
25. Israeli D, Poupiot J, Amor F, et al. Circulating miRNAs are generic and versatile therapeutic monitoring biomarkers in muscular dystrophies. *Sci Rep.* 2016;6(1):1-11.
26. Gomes CP, Oliveira GP Jr, Madrid B, Almeida JA, Franco OL, Pereira RW. Circulating miR-1, miR-133a, and miR-206 levels are increased after a half-marathon run. *Biomarkers.* 2014;19(7):585-589.
27. Quintanilha BJ, Ferreira LR, Ferreira FM, et al. Circulating plasma microRNAs dysregulation and metabolic endotoxemia induced by a high-fat high-saturated diet. *Clin Nutr.* 2020;39(2):554-562.
28. Zanotti S, Gibertini S, Curcio M, et al. Opposing roles of miR-21 and miR-29 in the progression of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(7):1451-1464.
29. Cacchiarelli D, Incitti T, Martone J, et al. miR-31 modulates dystrophin expression: new implications for Duchenne muscular dystrophy therapy. *EMBO Rep.* 2011;12(2):136-141.
30. Xiu MX, Zeng B, Kuang BH. Identification of hub genes, miRNAs and regulatory factors relevant for Duchenne muscular dystrophy by bioinformatics analysis. *Int J Neurosci.* 2020;132(3):296-305.
31. Shang Q, Shen G, Chen G, et al. The emerging role of miR-128 in musculoskeletal diseases. *J Cell Physiol.* 2021;236(6):4231-4243.
32. Zhang X, Ng WL, Wang P, et al. MicroRNA-21 modulates the levels of reactive oxygen species by targeting SOD3 and TNF $\alpha$ . *Cancer Res.* 2012;72(18):4707-4713.
33. Li J, Lv H, Che YQ. Upregulated microRNA-31 inhibits oxidative stress-induced neuronal injury through the JAK/STAT3 pathway by binding to PKD1 in mice with ischemic stroke. *J Cell Physiol.* 2020;235(3):2414-2428.
34. Caggiano R, Cattaneo F, Molto O, et al. miR-128 is implicated in stress responses by targeting MAFK in skeletal muscle cells. *Oxid Med Cell Longevity.* 2017;2017:9308310-9308313.
35. Sangokoya C, Telen MJ, Chi JT. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. *Blood.* 2010;116(20):4338-4348.
36. Mazzone E, Vasco G, Sormani MP, et al. Functional changes in Duchenne muscular dystrophy: a 12-month longitudinal cohort study. *Neurology.* 2011;77(3):250-256.
37. Vignos PJ, Archibald KC. Maintenance of ambulation in childhood muscular dystrophy. *J Chronic Dis.* 1960;12(2):273-290.
38. Palisano R, Rosenbaum P, Walter S, Russell D, Wood E, Galuppi B. Development and reliability of a system to classify gross motor function in children with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol.* 1997;39(4):214-223.
39. Brooke MH, Griggs RC, Mendell JR, Fenichel GM, Shumate JB, Pellegrino RJ. Clinical trial in Duchenne dystrophy. I. The design of the protocol. *Muscle Nerve.* 1981;4(3):186-197.
40. Compston A. Aids to the investigation of peripheral nerve injuries. Medical Research Council: nerve injuries research committee. His Majesty's stationery office: 1942; pp. 48 (iii) and 74 figures and 7 diagrams; with aids to the examination of the peripheral nervous system. By Michael O'Brien for the Guarantors of Brain. Saunders Elsevier: 2010; pp. [8] 64 and 94 figures. *Brain.* 2010;133(10):2838-2844.
41. Kowalski KC, Crocker PR, Donen RM. *The Physical Activity Questionnaire for Older Children (PAQ-C) and Adolescents (PAQ-A) Manual.* University of Saskatchewan; 2004.
42. ENSANUT. Instituto Nacional de Salud Pública; 2016. Accessed June 17, 2021. <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2016/index.php>

43. Zotor F, Sheehy T, Lupu M, Kolaahdoz F, Corriveau A, Sharma S. Frequency of consumption of foods and beverages by Inuvialuit adults in Northwest Territories, Arctic Canada. *Int J Food Sci Nutr*. 2012;63(7):782-789.
44. Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D146-D152.
45. Mouse Genome Database (MGD). The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine; 2019. Accessed January 11, 2021. <http://www.informatics.jax.org>
46. Leiden Muscular Dystrophy pages. Center for Human and Clinical Genetics, Leiden University Medical Center; 2006. Accessed February 13, 2021. <https://www.dmd.nl/>
47. Luo A, Yan H, Liang J, et al. MicroRNA-21 regulates hepatic glucose metabolism by targeting FOXO1. *Gene*. 2017;627:194-201.
48. Guay C, Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(9):513-521.
49. Petrillo S, Pelosi L, Piemonte F, et al. Oxidative stress in Duchenne muscular dystrophy: focus on the NRF2 redox pathway. *Hum Mol Genet*. 2017;26(14):2781-2790.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Almeida-Becerril, T., Rodríguez-Cruz, M., Hernández-Cruz, S. Y., Ruiz-Cruz, E. D., Mendoza, C. R. S., Cárdenas-Conejo, A., Escobar-Cedillo, R. E., Ávila-Moreno, F. & Aquino-Jarquin, G. (2022). Natural history of circulating miRNAs in Duchenne disease: Association with muscle injury and metabolic parameters. *Acta Neurologica Scandinavica*, 146, 512-524. <https://doi.org/10.1111/ane.13673>



## 12.2. Anexo 2. Carta de consentimiento.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN  
Y POLÍTICAS DE SALUD  
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

### Carta de consentimiento informado para participación en protocolos de investigación (padres o representantes legales de niños o personas con discapacidad)

Nombre del estudio: **MIRNAS CIRCULANTES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y SU ASOCIACIÓN  
CON EL DAÑO MUSCULAR EN LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE:**

No. de registro ante la CNIC \_\_\_\_\_

Lugar y fecha: México, CD. MX., a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 20\_\_

#### Justificación y objetivo de estudio

Como su médico Genetista ya se lo mencionó, su hijo tiene alta sospecha de padecer distrofia muscular de Duchenne, en esta distrofia se producen moléculas conocidas como especies reactivas que están en la sangre y que dañan más los músculos de su hijo, en esta investigación queremos estudiar si otras moléculas llamadas miRNAs pueden participar en la producción de estas especies reactivas. Los resultados de este estudio serán importantes para el conocimiento de la enfermedad.

Dentro de las aplicaciones que generará el presente trabajo, está la posibilidad de encontrar en estudios futuros miRNAs en circulación que nos permitan monitorear el avance de la enfermedad en otros pacientes, así como conocer moléculas importantes que sirvan como blanco para diferentes tipos de tratamientos en la distrofia muscular de Duchenne.

#### Procedimientos

Se programará una única cita para que usted acuda junto con su hijo que debe tener un ayuno de 12h al Laboratorio de Nutrición Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición ubicada en el 4° Piso del Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Primeramente, a su hijo se le tomará una muestra de sangre de una vena del brazo equivalente a dos cucharadas o 10 mL de sangre distribuidos en un tubo morado con anticoagulante y un tubo amarillo con gel separador.

Estas muestras serán utilizadas para medir los componentes que se llaman miRNAs que se encuentran en la sangre, así como también algunas moléculas que indican la severidad del daño oxidativo de su hijo.

Después, a su hijo lo pesaremos, le mediremos la talla, la circunferencia de cintura y la circunferencia de cadera. Posteriormente, se le pedirá que usted o su hijo respondan un cuestionario sobre los datos generales de su hijo como edad, edad a la que iniciaron sus síntomas, edad a la que dejó de caminar (si es el caso) antecedentes familiares de la enfermedad, cuales medicamentos está tomando su hijo, etc.

A continuación, se le pedirá que responda otro cuestionario para conocer el nivel de actividad física que realizó su hijo durante la última semana previa a su visita al laboratorio de Nutrición Molecular. De manera general, este cuestionario es una serie de preguntas que cuestionan sobre diferentes actividades de la vida diaria de su hijo y la frecuencia con la que las realiza a lo largo del día y de la semana.

Posteriormente, se le pedirá que conteste un último cuestionario sobre la frecuencia con la que su hijo consume ciertos alimentos para conocer sus hábitos alimenticios.

Finalmente, un médico hará una medición de la función de los músculos de su hijo. Estas últimas pruebas no causarán ningún dolor ya que solo consisten en generar movimientos con piernas y brazos. Todos los procedimientos se realizarán en aproximadamente 1.5 hrs.

### **Posibles riesgos y molestias**

La medición de peso y talla, así como la evaluación funcional muscular se realiza por métodos no invasivos que no ocasionan incomodidad, dolor o riesgo alguno para su hijo. Las molestias durante la toma de muestra de sangre son mínimas, en algunas ocasiones el procedimiento puede causarle a su hijo un poco de dolor, es posible que se le pueda formar un hematoma (moretón). Durante la toma de muestra de sangre, su hijo estará supervisado por un médico para monitorear que no presente náuseas o mareos asociados a la toma de la muestra.

### **Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio**

El primer beneficio de la participación de su hijo en este estudio es que se le entregarán a usted los resultados de las pruebas de laboratorio que realizaremos (glucosa, triglicéridos y colesterol), los cuales les proporcionarán información sobre el estado de salud de su hijo.

Además, usted recibirá un reporte nutricional y orientación nutricional personalizada con la finalidad de que su hijo siga una adecuada nutrición. La orientación nutricional se realizará para que en su hijo se puedan disminuir los factores de riesgo metabólico que pudiera presentar en un futuro como consecuencia de la fisiopatología de distrofia muscular de Duchenne.

**Información sobre resultados**

Los resultados de laboratorio y el plan nutricional de su hijo serán entregados en una segunda cita en el laboratorio de Nutrición Molecular, en ese caso ya no es necesario que acuda su hijo.

**Participación o retiro**

La participación en este estudio es voluntaria. Si usted decide que su hijo no participe, seguirá recibiendo la atención médica brindada por el IMSS o por la Institución que le proporciona el servicio médico a su hijo con los procedimientos establecidos. Si en un principio firma la carta de consentimiento informado y posteriormente cambia de opinión, incluso durante la toma de muestra, su hijo puede abandonar el estudio en cualquier momento sin que esto modifique los beneficios que tiene en la institución que atiende la salud de su hijo.

**Privacidad y confidencialidad**

Toda la información proporcionada sobre su hijo como nombre, número telefónico, dirección y respuestas a los cuestionarios, así como los resultados de la investigación será manejada bajo estricta confidencialidad y privacidad siendo utilizada exclusivamente para fines de este estudio. Además, todas las muestras biológicas serán etiquetadas con un código alfanumérico para que las etiquetas no revelen el nombre del paciente.

Sólo proporcionaremos información sobre su hijo si fuera necesario para proteger sus derechos, proteger su bienestar o si lo requiere la ley. Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados, por ejemplo en reuniones científicas, no se dará información que pudiera revelar la identidad de su hijo, por lo que nos comprometemos a proteger su identidad.

Los resultados se guardarán confidencialmente y serán entregados exclusivamente a los padres/tutores mismos que hayan firmado la carta de consentimiento informado.

**Declaración de consentimiento**

Después de haber leído y habiéndome explicado todas mis dudas acerca de este estudio:

No acepto que mi familiar o representado participe en el estudio.

Si acepto que mi familiar o representado participe y que se tome la muestra sanguínea.

**En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse al investigador responsable:**

Dra. Maricela Rodríguez Cruz de 8:00 a 16:00 hrs de lunes a viernes, al teléfono 5627-6900 en la extensión 22483. Laboratorio de Nutrición Molecular. Unidad de Investigación Médica en Nutrición. 4to. Piso, Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social. Ciudad de México, México. Correo electrónico: [maricela.rodriguez.cruz@gmail.com](mailto:maricela.rodriguez.cruz@gmail.com)

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores, Ciudad de México, México. C.P. 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230. Correo electrónico: [comiteeticainv.imss@gmail.com](mailto:comiteeticainv.imss@gmail.com)

---

Nombre y firma de ambos padres o tutores o representante legal

---

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

---

Nombre, dirección, relación y firma

---

Nombre, dirección, relación y firma

### 12.3. Anexo 3. Carta de asentimiento.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN  
Y POLÍTICAS DE SALUD  
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

#### Carta de asentimiento en menores de edad (8 a 17 años)

Nombre del estudio: **“miRNAs circulantes de estrés oxidativo y su asociación con el daño muscular en la distrofia muscular de Duchenne”**

Número de registro institucional:

**Objetivo del estudio:** Te estamos invitando a participar en un estudio de investigación donde estudiamos la enfermedad que tienes en tus músculos. Además de ti, otros niños van a participar en esta investigación cuyo objetivo es conocer como ciertos componentes que se llaman microRNAs que están circulando por toda tu sangre pueden tener una relación en el progreso de la distrofia muscular de Duchenne y de esta forma generar las bases para que estas moléculas puedan servir para monitorear dicha enfermedad en un futuro a otros niños con este tipo de distrofia.

**Procedimientos:** Si aceptas participar en este estudio se le pedirá a la persona que te acompaña (mamá, papá o tutor) que nos responda una serie de cuestionarios sobre datos generales como edad, las actividades que realizas diariamente y la frecuencia del consumo de algunos alimentos para conocer tus hábitos alimenticios. Después se te tomará una muestra de sangre de una vena de tu brazo equivalente a dos cucharadas o 10mL de sangre distribuidos en un tubo morado y un tubo amarillo, después de 12 horas de ayuno, que se utilizará para medir los componentes que se llaman microRNAs que están circulando por toda tu sangre. Además, un médico te hará unas pruebas para conocer la fuerza y la función de tus músculos. Estas últimas pruebas no te causarán ningún dolor ya que solo consisten en generar movimientos con piernas y brazos. Todos estos procedimientos nos tomarán aproximadamente de 1.5 hrs.

Hola mi nombre es \_\_\_\_\_ y trabajo en el Instituto Mexicano del Seguro Social. Actualmente estamos realizando un estudio para conocer acerca de la relación que hay entre algunas componentes de tu sangre y la fuerza de tus músculos, y para ello queremos pedirte que nos apoyes.

Tu participación en el estudio es voluntaria, es decir, aun cuando tu papá o mamá hayan dicho que puedes participar, si tú no quieres hacerlo puedes decir que no. Es tu decisión si participas o no en el estudio. También es importante que sepas que si en un momento dado ya no quieres continuar en el estudio, no habrá ningún problema, o si no quieres responder a alguna pregunta en particular, tampoco habrá problema.

Esta información será confidencial. Esto quiere decir que no diremos a nadie tus respuestas o resultados sin que tú lo autorices, solo lo sabrán las personas que forman parte del equipo de este estudio.

Si aceptas participar, te pido que por favor pongas una (x) en el cuadrito de abajo que dice "Sí quiero participar" y escribe tu nombre. Si **no** quieres participar, déjalo en blanco.

Si quiero participar

Nombre: \_\_\_\_\_

Nombre y firma de la persona que obtiene el asentimiento: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

## 12.4. Anexo 4. Escalas de evaluación clínica para pacientes con DMD.

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

#### **Sistema Clasificación de la Función Motora Gruesa (GMFCS, Gross Motor Function Classification System)**

**Nivel 1:** Camina sin limitación.

**Nivel 2:** Camina con limitación.

**Nivel 3:** Camina usando un aparato de movilidad de mano o pies (férulas).

**Nivel 4:** Movilidad personal con dificultad.

**Nivel 5:** Transportado en silla de ruedas manual.

#### **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 musculo.

**Grado 0:** ausencia total de movimiento.

Fórmula para calcular el porcentaje de fuerza muscular mediante escala MRC.

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

#### **Sistema de clasificación en la escala de Brookes**

**1:** Iniciando con los brazos a los lados, el paciente puede abducir los brazos en círculo completo hasta alcanzar la línea media por encima de la cabeza.

**2:** Puede levantar los brazos encima de la cabeza solo si flexiona los codos (disminuyendo la circunferencia total del movimiento) o mediante el uso de 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 monedas de la mesa.

**6:** Sin función de manos.

#### **Sistema de clasificación en la escala de Vignos.**

Descripción.

**1:** Camina y puede subir escaleras sin ayuda.

**2:** Camina y puede subir escaleras con ayuda de barandal.

**3:** Camina y puede subir escaleras lentamente con ayuda de barandal (más de 25 segundos en 8 escalones regulares).

**4:** Camina sin ayuda y puede levantarse de la silla, pero no puede subir escaleras.

**5:** Camina sin ayuda, pero no puede levantarse de una silla o subir escaleras.

**6:** Camina solo con ayuda o camina de forma independiente con férulas largas (aparto ortopédico) de piernas.

**7:** Camina con férulas largas, pero requiere apoyo para el equilibrio.

**8:** Se levanta con ayuda de férulas, pero no puede caminar aun con ayuda.

**9:** Confinado a una silla de ruedas.

**10:** Confinado a la cama.



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

### EVALUACIÓN DE FUERZA Y FUNCIÓN MUSCULAR

Nombre \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Clave \_\_\_\_\_

MRC	Derecha	Izquierda
Extensores de cuello		
Flexores del cuello		
Aductores de los hombros		
Rotador externo del hombro		
Flexores del codo		
Extensores del codo		
Aductor del pulgar		
Interóseos		
Imbrincados de las manos		
Flexores de la pelvis		
Extensores de la pelvis		
Flexores del tobillo		
Extensores del tobillo		
Brooke		
Vignos		
GMFCS		



**12.5. Anexo 5. Antropometría.**



**Laboratorio de Nutrición Molecular, Unidad de Investigación Médica en Nutrición,  
Hospital de Pediatría "Dr. Silvestre Frenk Freund", Centro Médico Nacional Siglo XXI,  
Instituto Mexicano del Seguro Social**

**ANTROPOMETRÍA**

Nombre \_\_\_\_\_ Clave del paciente \_\_\_\_\_

Fecha de Nacimiento \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

Peso (Kg) \_\_\_\_\_

Talla (cm) \_\_\_\_\_

Circunferencia de cintura (cm) \_\_\_\_\_

Circunferencia de cadera (cm) \_\_\_\_\_

IMC (Kg/m<sup>2</sup>) \_\_\_\_\_

Percentil de IMC \_\_\_\_\_

Diagnóstico de estado nutricional \_\_\_\_\_

Observaciones:

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**12.6. Anexo 6. Cuestionario de actividad física para niños (PAQ-C).**



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

**CUESTIONARIO DE ACTIVIDAD FÍSICA PARA NIÑOS (PAQ-C)**

**Nombre:** \_\_\_\_\_ **Clave del paciente:** \_\_\_\_\_  
**Edad:** \_\_\_\_\_ **Grado escolar:** \_\_\_\_\_ **Fecha de aplicación:** \_\_\_\_\_  
**Sexo:** M \_\_\_\_\_ F \_\_\_\_\_

**El paciente se encuentra en periodo vacacional escolar si \_\_\_\_\_ no \_\_\_\_\_.** Si la respuesta es “sí”, omite responder las preguntas 2 y 3.

Queremos conocer cuál es el nivel de actividad física de su hijo en los últimos 7 días (última semana). Esto incluye todas aquellas actividades que hacen sudar a su hijo o sentirse cansado, o juegos que hagan que se acelere su respiración.

Recuerde:

- a) No hay preguntas buenas o malas. Esto **NO** es un examen.
- b) Conteste las preguntas de la forma más honesta y sincera posible. Esto es muy importante.

1. Actividad física en el tiempo libre: Su hijo ha hecho alguna de estas actividades en los últimos 7 días (última semana). Si la respuesta es sí ¿Cuántas veces las ha hecho? (*Marque un solo recuadro por actividad*).

NO 1-2 3-4 5-6 7 veces o más

**Actividad física realizada en los últimos 7 días (Última semana)**

Actividad	No	1-2	3-4	5-6	7 veces o más	Observaciones (opcional)
Saltar la cuerda						
Patinar						
Jugar atrapadas						
Andar en bicicleta						
Caminar como ejercicio						

Continuación...

Correr/trotar						
Natación						
Bailar/danza						
Andar en monopatín						
Fútbol						
Voleibol						
Hockey						
Baloncesto						
Deporte de raqueta						
Atletismo						
Artes marciales						
Otra						
Otra						
Otra						

2. En los últimos 7 días durante las clases de educación física, ¿Con qué frecuencia su hijo estuvo muy activo durante las clases: jugando intensamente, corriendo, saltando, haciendo lanzamientos? (Señale solo una. Puede apoyarse con el profesor de educación física para contestar esta pregunta).

No hizo educación física \_\_\_\_\_

Casi nunca \_\_\_\_\_

Algunas veces \_\_\_\_\_

A menudo \_\_\_\_\_

Siempre \_\_\_\_\_

3. En los últimos 7 días, ¿Qué hizo su hijo en el tiempo de descanso (*recreo*)? (Señale solo una).

Estar sentado (hablar, leer, trabajo de clase, etc.) \_\_\_\_\_

Pasear por los alrededores \_\_\_\_\_

Correr o jugar un poco \_\_\_\_\_

Correr y jugar bastante \_\_\_\_\_

Correr y jugar intensamente todo el tiempo \_\_\_\_\_

4. En los últimos 7 días, ¿Qué hizo su hijo además de comer (en la tarde)? (Señale solo una).

Estar sentado (hablar, leer, trabajo de clase) \_\_\_\_\_

Estar o pasear por los alrededores \_\_\_\_\_

Correr o jugar un poco \_\_\_\_\_

Correr y jugar bastante \_\_\_\_\_

Correr y jugar intensamente todo el tiempo \_\_\_\_\_

5. En los últimos 7 días, ¿Cuántos días (inmediatamente después del colegio y antes de la comida); su hijo hizo deporte, baile o jugo juegos en los que estuviera muy activo? (Señale solo una).

Ninguno \_\_\_\_\_  
1 vez en la última semana \_\_\_\_\_  
2-3 veces en la última semana \_\_\_\_\_  
4 veces en la última semana \_\_\_\_\_  
5 veces o más en la última semana \_\_\_\_\_

6. En los últimos 7 días, ¿Cuántas tardes (después de la comida y antes de dormir) su hijo hizo deporte, baile o jugar a juegos en los que estuviera muy activo? (Señale solo una).

Ninguna \_\_\_\_\_  
1 vez en la última semana \_\_\_\_\_  
2-3 veces en la última semana \_\_\_\_\_  
4-5 veces en la última semana \_\_\_\_\_  
6-7 veces en la última semana \_\_\_\_\_

7. El último fin de semana, ¿Cuántas veces su hijo hizo deporte, baile o jugar juegos en los que estuviera muy activo? (Señale solo una).

Ninguna \_\_\_\_\_  
1 vez \_\_\_\_\_  
2-3 veces \_\_\_\_\_  
4-5 veces \_\_\_\_\_  
6 o más veces \_\_\_\_\_

8. ¿Cuál de las siguientes frases describen mejor la última semana de su hijo? Lee las cinco frases antes de deducir cuál lo describe mejor. (Señale solo una):

Todo o la mayoría del tiempo libre de su hijo lo dedicó a actividades que suponen poco esfuerzo físico \_\_\_\_\_

Algunas veces (1 o 2 veces la última semana) su hijo hizo actividades físicas en su tiempo libre (por ejemplo, hacer deportes, correr, nadar, andar en bicicleta) \_\_\_\_\_

A menudo (3-4 veces en la última semana) su hijo hizo actividad física en su tiempo libre \_\_\_\_\_

Bastante a menudo (5-6 veces en la última semana) su hijo hizo actividad física en su tiempo libre \_\_\_\_\_

Muy a menudo (7 o más veces en la última semana) su hijo hizo actividad física en su tiempo libre \_\_\_\_\_

9. Señala con qué frecuencia su hijo hizo actividad física para cada día de la última semana (como hacer deporte, jugar, bailar o cualquier actividad física).

	Ninguna	Poca	Normal	Bastante	Mucha
Lunes					
Martes					
Miércoles					
Jueves					
Viernes					
Sábado					
Domingo					

10. ¿Su hijo estuvo enfermo esta última semana o algo impidió que hiciera normalmente actividades físicas? (Señale solo una).

Sí \_\_\_\_\_

No \_\_\_\_\_

Si la respuesta es sí, ¿Qué actividades impidió hacer?

\_\_\_\_\_.

11. ¿Cuántas horas al día destina su hijo ante una pantalla (monitor, tablet, TV y teléfono celular)?

12. ¿De que manera se transporta su hijo para ir de la casa a la escuela y de la escuela a la casa?

a) Transporte activo (caminar, bicicleta, silla de ruedas impulsada por el paciente) \_\_\_\_\_

b) Transporte pasivo (Silla de ruedas eléctrica, transporte particular, transporte público o silla ruedas impulsada por alguien más. \_\_\_\_\_

13. ¿Cuál es el tiempo que invierte un día normal para transportarse de la casa a la escuela y de la escuela a la casa?

**NOTA:** Si su hijo se encuentra en periodo vacacional, explique en el siguiente espacio detalladamente y en forma de lista las actividades que su hijo realiza desde que se despierta hasta la comida por la tarde, incluyendo los tiempos aproximados que invirtió en cada una de las actividades.

#### Referencia

Kowalski K, Crocker P y Donen R. The Physical Activity Questionnaire for Older Children (PAQ-C) and Adolescents (PAQ-A) Manual. College of Kinesiology, University of Saskatchewan.

## 12.7. Anexo 7. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos.



Laboratorio de Nutrición Molecular, Unidad de Investigación Médica en Nutrición,  
Hospital de Pediatría "Dr. Silvestre Frenk Freund", Centro Médico Nacional Siglo XXI.

### CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

Nombre \_\_\_\_\_ Clave \_\_\_\_\_  
Fecha \_\_\_\_\_

VERDURAS	Nunca	Pocas veces al año	1 vez al mes	2-3 por mes	1 por semana	2-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2-5 por día	6 o más por día
Acelgas										
Betabel										
Brócoli										
Calabaza										
Cebolla										
Champiñones										
Chayote										
Chicharos										
Chile										
Col										
Coliflor										
Ejotes										
Espinacas										
Flor de Calabaza										
Jícama										
Jitomate										
Lechuga										
Nopal										
Pepino										
Pimiento										
Tomate Verde										
Verdolagas										
Zanahoria										
Otros (¿Cuáles?):										

FRUTAS	Nunca	Pocas veces al año	1 vez al mes	2-3 por mes	1 por semana	2-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2-5 por día	6 o más por día
Arándanos										
Cereza										
Chabacano										
Ciruela										
Fruta en almíbar										
Fresas										
Guayaba										
Kiwi										
Mandarina										
Mango										
Higo										
Lichis										
Lima										
Granada										
Pasas										
Manzana										
Melón										
Naranja										
Papaya										
Plátano										
Pera										
Piña										
Sandía										
Tuna										
Toronja										
Uvas										
Zapote										
Otros (¿Cuáles?):										

<b>LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS</b>	Nunca	Pocas veces al año	1 vez al mes	2-3 por mes	1 por semana	2-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2-5 por día	6 o más por día
Helado de leche										
Leche con azúcar (saborizada)										
Leche descremada										
Leche entera										
Leche semidescremada										
Queso amarillo										
Queso cottage										
Queso crema										
Queso manchego										
Queso oaxaca (quesillo)										
Queso panela										
Requesón										
Yogurt										
Otros (¿Cuáles?):										

<b>PESCADOS Y MARISCOS</b>	Nunca	Pocas veces al año	1 vez al mes	2-3 por mes	1 por semana	2-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2-5 por día	6 o más por día
Almejas/ostiones										
Atún en agua /aceite										
Calamar										
Camarón										
Charales										
Pescado										
Pulpo										
Salmón										
Sardinas										
Otros (¿Cuáles?):										

<b>CARNES ROJAS</b>	Nunca	Pocas veces al año	1 vez al mes	2-3 por mes	1 por semana	2-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2-5 por día	6 o más por día
Arrachera										
Barbacoa										
Bistec de Res										
Carne de Cerdo										
Carne molida popular										
Cecina										
Cortes magros de res										
Chuleta ahumada										
Cueritos										
Jamón de cerdo										
Vísceras de res										
Milanesa de res										
Pata de res										
Salchicha de cerdo										
Otros (¿Cuáles?):										

<b>CARNES BLANCAS</b>	Nunca	Pocas veces al año	1 vez al mes	2-3 por mes	1 por semana	2-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2-5 por día	6 o más por día
Gallina										
Huevo de gallina										
Jamón de pavo										
Vísceras de pollo										
Pavo										
Pechuga de pavo										
Pollo con piel										
Pollo sin piel										
Salchicha de pavo										
Otros (¿Cuáles?):										

<b>LEGUMINOSAS</b>	Nunca	Pocas veces al año	1 vez al mes	2-3 por mes	1 por semana	2-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2-5 por día	6 o más por día
Alubias										
Alverjón										
Frijoles										
Garbanzos										
Habas										
Lentejas										
Soya										
Otros (¿Cuáles?):										

<b>CEREALES Y TUBERCÚLOS</b>	Nunca	Pocas veces al año	1 vez al mes	2-3 por mes	1 por semana	2-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2-5 por día	6 o más por día
Amaranto										
Arroz										
Avena										
Barra de cereal										
Bolillo										
Cereal de caja (marca): _____										
Elote										
Frituras de Maíz ¿Cuáles?										
Galletas ¿Cuáles?										
Galletas Marías/Animalitos										
Granola										
Hot cake										
Palomitas de maíz										
Pan de caja blanco										
Pan dulce										
Pan Integral										
Pan tostado										
Pasta cocida										
Pastel										
Tortilla de harina										
Tortilla de maíz										
Tostadas										
Camote										
Papa										
Puré de papa										
Papas fritas										
Otros (¿Cuáles?):										

<b>ACEITES Y GRASAS</b>	Nunca	Pocas veces al año	1 vez al mes	2-3 por mes	1 por semana	2-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2-5 por día	6 o más por día
Aceite de Oliva										
Aceite (marca): _____										
Aderezos										
Aguacate										
Coco										
Crema										
Manteca										
Mantequilla										
Margarina										
Tocino										
Ajonjolí										
Almendras										
Cacahuates										
Chorizo/Longaniza										
Mayonesa										
Nuez de castilla										
Nuez de la india										
Pepitas										
Pistache										
Otros (¿Cuáles?):										



<b>AZÚCARES</b>	Nunca	Pocas veces al año	1 vez al mes	2-3 por mes	1 por semana	2-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2-5 por día	6 o más por día
Azúcar mascabado										
Azúcar de mesa										
Azúcar morena										
Cajeta										
Caramelos										
Chocolate en polvo										
Chocolate sólido										
Flan										
Flan light										
Gelatina										
Gelatina light										
Gomitas										
Mermelada										
Miel										
Salsa catsup										
Otros (¿Cuáles?):										

<b>BEBIDAS</b>	Nunca	Pocas veces al año	1 vez al mes	2-3 por mes	1 por semana	2-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2-5 por día	6 o más por día
Agua de sabor de fruta natural										
Agua de sabor en polvo										
Atole en agua										
Atole con leche										
Bebidas alcohólicas										
Café										
Jugo de fruta industrial										
Jugo de fruta natural										
Licuidos										
Refresco de cola										
Refresco de sabor										
Té										
¿Cuál?										
Otros (¿Cuáles?):										

<b>ANTOJITOS/COMIDA RÁPIDA</b>	Nunca	Pocas veces al año	1 vez al mes	2-3 por mes	1 por semana	2-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2-5 por día	6 o más por día
Burrito										
Crepa										
Flautas de pollo										
Gordita de Chicharrón										
Hamburguesa										
Pizza										
Pozole										
Sope o quesadilla										
Sushi										
Tacos al pastor										
Tacos de canasta										
Tamal										
Torta										
Otros (¿Cuáles?):										

<b>OTROS ALIMENTOS</b>	Nunca	Pocas veces al año	1 vez al mes	2-3 por mes	1 por semana	2-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2-5 por día	6 o más por día

¿Cuántas cucharadas de azúcar le agrega a sus alimentos durante el día?

- a) 0      b) ½      c) 1      d) 2      e) 3      f) 4      g) 5 o más

¿Les agrega sal a sus alimentos antes de probarlos?

- a) Sí      b) No

¿Se come la piel del pollo?

- a) Sí      b) No

¿Se come el gordito de la carne?

- a) Sí      b) No

## 12.8. Anexo 8. Tablas suplementarias.

**Tabla S1.** Genes blanco de EO para miR-1-3p.

<b>Región del gen</b>	<b>Símbolo del gen</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Puntaje de la interacción</b>
<b>3' UTR</b>	<i>PDCD10</i>	Programmed cell death 10	96
	<i>FOXP1</i>	Forkhead box P1	96
	<i>IMPACT</i>	Impact RWD domain protein	95
	<i>EDN1</i>	Endothelin 1	94
	<i>HSPD1</i>	Heat shock protein family D (Hsp60) member 1	93
	<i>STC2</i>	Stanniocalcin 2	92
	<i>GCH1</i>	GTP cyclohydrolase 1	91
	<i>GCLC</i>	Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit	90
	<i>CLCN3</i>	Chloride voltage-gated channel 3	90
	<i>IGF1</i>	Insulin like growth factor 1	88
	<i>SLC7A2</i>	Solute carrier family 7 member 2	87
	<i>THBS1</i>	Thrombospondin 1	87
	<i>PREX1</i>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate dependent Rac exchange factor 1	86
	<i>NET1</i>	Neuroepithelial cell transforming 1	86
	<i>ARF4</i>	ADP ribosylation factor 4	85
	<i>PDK3</i>	Pyruvate dehydrogenase kinase 3	85
	<i>MET</i>	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	84
	<i>MCTP1</i>	Multiple C2 and transmembrane domain containing 1	84
	<i>KLF4</i>	Kruppel like factor 4	83
	<i>SLC8A1</i>	Solute carrier family 8 member A1	82
<i>FBXW7</i>	F-box and WD repeat domain containing 7	81	
<b>CR</b>	<i>GAB1</i>	GRB2 associated binding protein 1	99
	<i>EZH2</i>	Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit	95

	<i>GNAI3</i>	G protein subunit alpha i3	94
	<i>LRRK2</i>	Leucine rich repeat kinase 2	94
	<i>MYEF2</i>	Myelin expression factor 2	90
	<i>TOP2B</i>	DNA topoisomerase II beta	87
	<i>HBP1</i>	HMG-box transcription factor 1	82
	<i>NXN</i>	Nucleoredoxin	81
<b>5' UTR</b>	<i>FBLN5</i>	Fibulin 5	82

UTR, región no trascrita (siglas en inglés); CR, región codificante (siglas en inglés).

**Tabla S2.** Genes blanco de EO para miR-133a-3p.

<b>Región del gen</b>	<b>Símbolo del gen</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Puntaje de la interacción</b>
<b>3' UTR</b>	<i>PTPRK</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type K	95
	<i>PPP2CB</i>	Protein phosphatase 2 catalytic subunit beta	95
	<i>IDH1</i>	Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1, cytosolic	86
	<i>EGFR</i>	Epidermal growth factor receptor	85
	<i>SP1</i>	Sp1 transcription factor	80
	<i>PML</i>	Promyelocytic leukemia	80
<b>CR</b>	<i>EZH2</i>	Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit	100
	<i>PSEN1</i>	Presenilin 1	97
	<i>PSIP1</i>	PC4 and SFRS1 interacting protein 1	93
	<i>DUOXA2</i>	Dual oxidase maturation factor 2	92
	<i>ALDH3A2</i>	Aldehyde dehydrogenase 3 family member A2	89
	<i>SMPD3</i>	Sphingomyelin phosphodiesterase 3	88
	<i>DDAH2</i>	Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	87
	<i>SESN3</i>	Sestrin 3	82
	<i>NME5</i>	NME/NM23 family member 5	80
	<i>PTPRK</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type K	80
	<i>TRPM2</i>	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 2	80

UTR, región no transcrita (siglas en inglés); CR, región codificante (siglas en inglés).

**Tabla S3.** Genes blanco de EO para miR-206.

<b>Región del gen</b>	<b>Simbolo del gen</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Puntaje de la interacción</b>	
<b>3' UTR</b>	<i>G6PD</i>	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	97	
	<i>PDCD10</i>	Programmed cell death 10	96	
	<i>FOXP1</i>	Forkhead box P1	96	
	<i>IMPACT</i>	Impact RWD domain protein	95	
	<i>EDN1</i>	Endothelin 1	94	
	<i>HSPD1</i>	Heat shock protein family D (Hsp60) member 1	93	
	<i>STC2</i>	Stanniocalcin 2	92	
	<i>GCH1</i>	GTP cyclohydrolase 1	91	
	<i>CLCN3</i>	Chloride voltage-gated channel 3	90	
	<i>GCLC</i>	Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit	90	
	<i>IGF1</i>	Insulin like growth factor 1	88	
	<i>THBS1</i>	Thrombospondin 1	87	
	<i>SLC7A2</i>	Solute carrier family 7 member 2	87	
	<i>NET1</i>	Neuroepithelial cell transforming 1	86	
	<i>PREX1</i>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate dependent Rac exchange factor 1	86	
	<i>PDK3</i>	Pyruvate dehydrogenase kinase 3	85	
	<i>ARF4</i>	ADP ribosylation factor 4	85	
	<i>MET</i>	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	84	
	<i>MCTP1</i>	Multiple C2 and transmembrane domain containing 1	84	
	<i>KLF4</i>	Kruppel like factor 4	83	
	<i>SLC8A1</i>	Solute carrier family 8 member A1	82	
	<i>FBXW7</i>	F-box and WD repeat domain containing 7	81	
	<b>CR</b>	<i>GAB1</i>	GRB2 associated binding protein 1	99
		<i>EZH2</i>	Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit	95
<i>LRRK2</i>		Leucine rich repeat kinase 2	94	

	<i>GNAI3</i>	G protein subunit alpha i3	94
	<i>MYEF2</i>	Myelin expression factor 2	90
	<i>TOP2B</i>	DNA topoisomerase II beta	87
	<i>HBPI</i>	HMG-box transcription factor 1	82
	<i>NXN</i>	Nucleoredoxin	81
<hr/>			
<b>5' UTR</b>	<i>FBLN5</i>	Fibulin 5	82
<hr/>			

UTR, región no transcrita (siglas en inglés); CR, región codificante (siglas en inglés).

**Tabla S4.** Genes blanco de EO para miR-21-5p.

<b>Región del gen</b>	<b>Simbolo del gen</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Puntaje de la interacción</b>
<b>3' UTR</b>	<i>FOXO3</i>	Forkhead box O3	94
	<i>CPEB2</i>	Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2	91
	<i>PDCD10</i>	Programmed cell death 10	88
	<i>RIPK1</i>	Receptor interacting serine/threonine kinase 1	87
	<i>SP1</i>	Sp1 transcription factor	84
	<i>PSEN1</i>	Presenilin 1	83
	<b>CR</b>	<i>STAT3</i>	Signal transducer and activator of transcription 3
<i>NOX4</i>		NADPH oxidase 4	96
<i>AIFM1</i>		Apoptosis inducing factor mitochondria associated 1	94
<i>JAK2</i>		Janus kinase 2	90
<i>SETX</i>		Senataxin	89
<i>TRPC6</i>		Transient receptor potential cation channel subfamily C member 6	80

UTR, región no trascrita (siglas en inglés); CR, región codificante (siglas en inglés).

**Tabla S5.** Genes blanco de EO para miR-31-5p.

<b>Región del gen</b>	<b>Símbolo del gen</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Puntaje de la interacción</b>
<b>3' UTR</b>	<i>UACA</i>	Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats	92
	<i>OXSRI</i>	Oxidative stress responsive kinase 1	90
	<i>PARP1</i>	Poly(ADP-ribose) polymerase 1	84
	<i>PRKAA2</i>	Protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 2	84
	<i>GCHI</i>	GTP cyclohydrolase 1	83
	<i>NOS1</i>	Nitric oxide synthase 1	81
<b>CR</b>	<i>JAK2</i>	Janus kinase 2	96
	<i>HGF</i>	Hepatocyte growth factor	92
	<i>GCHI</i>	GTP cyclohydrolase 1	88
	<i>PRDX3</i>	Peroxiredoxin 3	87
	<i>MTOR</i>	Mechanistic target of rapamycin kinase	86
	<i>ALS2</i>	ALS2, alsin Rho guanine nucleotide exchange factor	85
	<i>PRKAA1</i>	Protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1	82
	<i>ACOX2</i>	Acyl-CoA oxidase 2	82
	<i>SIN3A</i>	SIN3 transcription regulator family member A	81

UTR, región no transcrita (siglas en inglés); CR, región codificante (siglas en inglés).



**Tabla S6.** Genes blanco de EO para miR-128-3p.

<b>Región del gen</b>	<b>Símbolo del gen</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Puntaje de la interacción</b>
<b>3' UTR</b>	<i>NGFR</i>	Nerve growth factor receptor	97
	<i>GAB1</i>	GRB2 associated binding protein 1	97
	<i>MAPK14</i>	Mitogen-activated protein kinase 14	94
	<i>FBLN5</i>	Fibulin 5	93
	<i>MET</i>	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	92
	<i>SLC7A11</i>	Solute carrier family 7 member 11	92
	<i>SP1</i>	Sp1 transcription factor	90
	<i>STK24</i>	Serine/threonine kinase 24	89
	<i>FBXW7</i>	F-box and WD repeat domain containing 7	89
	<i>TXNIP</i>	Thioredoxin interacting protein	88
	<i>SIRT1</i>	Sirtuin 1	87
	<i>RCAN2</i>	Regulator of calcineurin 2	83
	<i>NCOA7</i>	Nuclear receptor coactivator 7	80
<b>CR</b>	<i>ACOX2</i>	Acyl-CoA oxidase 2	99
	<i>ADAM9</i>	ADAM metallopeptidase domain 9	98
	<i>PRKD1</i>	Protein kinase D1	94
	<i>OPRM1</i>	Opioid receptor mu 1	92
	<i>KLF4</i>	Kruppel like factor 4	92
	<i>SELENON</i>	Selenoprotein N	91
	<i>UCP2</i>	Uncoupling protein 2	84
	<i>DAPK1</i>	Death associated protein kinase 1	84
	<i>PLA2R1</i>	Phospholipase A2 receptor 1	83
	<i>MYCN</i>	MYCN proto-oncogene, bHLH transcription factor	80
<b>5' UTR</b>	<i>TLR5</i>	Toll like receptor 5	89

UTR, región no transcrita (siglas en inglés); CR, región codificante (siglas en inglés).

**Tabla S7.** Genes blanco de EO para miR-144-3p.

<b>Región del gen</b>	<b>Símbolo del gen</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Puntaje de la interacción</b>
<b>3' UTR</b>	<i>NFE2L2</i>	Nuclear factor, erythroid 2 like 2	100
	<i>MYEF2</i>	Myelin expression factor 2	99
	<i>SELENOT</i>	Selenoprotein T	98
	<i>VKORC1L1</i>	Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 like 1	97
	<i>SLC7A11</i>	Solute carrier family 7 member 11	96
	<i>RORA</i>	RAR related orphan receptor A	95
	<i>DDIAS</i>	DNA damage induced apoptosis suppressor	95
	<i>MYCN</i>	MYCN proto-oncogene, bHLH transcription factor	94
	<i>ALS2</i>	ALS2, alsin Rho guanine nucleotide exchange factor	92
	<i>EZH2</i>	Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit	90
	<i>PDE8A</i>	Phosphodiesterase 8A	89
	<i>PRKAA1</i>	Protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1	88
	<i>FOS</i>	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	87
	<i>PRKRA</i>	Protein activator of interferon induced protein kinase EIF2AK2	87
	<i>MTOR</i>	Mechanistic target of rapamycin kinase	86
	<i>MAPK9</i>	Mitogen-activated protein kinase 9	85
	<i>NOS1</i>	Nitric oxide synthase 1	84
	<i>APP</i>	Amyloid beta precursor protein	84
	<i>IMPACT</i>	Impact RWD domain protein	84
	<i>ZC3H12A</i>	Zinc finger CCCH-type containing 12A	83
	<i>CPEB2</i>	Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2	81

UTR, región no transcrita (siglas en inglés); CR, región codificante (siglas en inglés).