



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.**

**Expresión de distrofina en biopsia de piel de pacientes con distrofinopatías  
(Distrofia Muscular de Duchenne y de Becker)**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS**

**PRESENTA**

**ELIGANTY BAHENA MARTÍNEZ**

**TUTOR DE TESIS:**

**DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, 2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## AGRADECIMIENTOS

- La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Biología el Desarrollo de la División de Investigación Biomédica, Subdirección de Enseñanza e Investigación del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE).
- El presente trabajo se logró hacer gracias al financiamiento del CONACyT número 00000000115205 y a la Administración del Patrimonio de la Beneficencia Pública (APBP).
- Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haber recibido una beca durante la realización de mis estudios de Maestría.
- Gracias a mis papás y a mi hermano por todo su apoyo.
- Gracias al Doctor Ramón Mauricio Coral Vázquez por todas sus enseñanzas, por su dedicación y toda su paciencia.
- Gracias al Doctor Garduño por sus sabios consejos en cada seminario.
- Gracias al Doctor Luis Ángel Ruano Calderón por su trabajo y dedicación.
- Gracias a la Doctora en Ciencias Luz Berenice López Hernández por todo su apoyo, trabajo y enseñanzas.
- Gracias a los Doctores Vilchis y Aceves por su colaboración y trabajo dedicado.
- Gracias a mis compañeros y amigos de laboratorio, que sin su ayuda nunca hubiera terminado ni hubiera sido lo mismo; sobre todo a Silvia y a Sergio.
- Gracias al amor de mi vida por todo tu apoyo, por estar siempre a mi lado y animarme a seguir mis sueños. Te amo profunda y eternamente.
- Gracias al pequeño Ricardo por alegrar mi vida.

## Índice

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
INTRODUCCIÓN .....	5
Antecedentes .....	5
Distrofinopatías .....	5
Proteína Distrofina .....	6
Características Clínicas de las Distrofinopatías .....	10
Datos Moleculares de Las Distrofinopatías .....	14
Métodos Diagnósticos de las Distrofinopatías .....	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	20
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	20
JUSTIFICACION .....	21
El uso de la genética molecular en medicina y sobre todo en el diagnóstico de enfermedades neuromusculares, ha generado un cambio y un avance muy drástico e importante. ....	21
OBJETIVOS .....	22
OBJETIVO PRINCIPAL: .....	22
OBJETIVOS SECUNDARIOS: .....	22
MATERIAL Y MÉTODOS: .....	23
DISEÑO DEL ESTUDIO .....	23
POBLACIÓN A ESTUDIAR .....	23
TAMAÑO DE MUESTRA .....	23
Criterios de Inclusión: .....	23
Criterios de Exclusión .....	25
Criterios de Eliminación .....	25
Evaluación clínica: .....	25
Estudios paraclínicos .....	26
Biopsia de musculo esquelético y piel .....	26
ESCALA DE MEDICIÓN .....	28
Técnicas de fijación de biopsias por congelación .....	30
Técnica de inmunofluorescencia indirecta .....	30
Técnica de inmunohistoquímica con peroxidasa .....	32

Extracción de DNA.....	33
Técnica de MLPA.....	35
RESULTADOS .....	38
DISCUSIÓN.....	56
CONCLUSIONES .....	66
ANEXOS .....	67
FORMATO DE HISTORIA CLÍNICA PARA DISTROFIAS MUSCULARES.....	67
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	80
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MENORES DE EDAD .....	82
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	84
PARA TOMA DE BIOPSIA CONTROL.....	84
BIBLIOGRAFÍA.....	87

## RESUMEN

Las Distrofias Musculares son un grupo de enfermedades hereditarias caracterizadas por debilidad y degeneración muscular progresiva. La Distrofia muscular de Duchenne (DMD) es la forma más frecuente de distrofia en niños con una incidencia de 1 en 3,500 varones recién nacidos vivos; este grupo de padecimientos comprende un amplio espectro de enfermedades conocidas como distrofinopatías, que van desde la forma más grave que es la DMD a formas menos graves como la distrofia muscular de Becker hasta fenotipos más leves; todas estas enfermedades son causadas por mutaciones en el gen *DMD* que codifica para la proteína distrofina.

Para realizar el diagnóstico de las distrofinopatías, en nuestro país se realiza mediante una evaluación clínica completa, análisis de niveles séricos de CPK e inmunofluorescencia en biopsia de músculo esquelético para detectar la presencia de la proteína distrofina; en algunos casos es por pruebas moleculares, PCR múltiple y MLPA. Estas últimas técnicas con costosas y no en todos los centros se cuenta con ellas. Por otra parte la inmunofluorescencia de biopsia de músculo esquelético es un proceso invasivo. Por esta razón es importante la búsqueda de nuevas estrategias menos invasivas y costosas que ayuden a determinar el diagnóstico de las distrofinopatías.

En el presente trabajo se investigó la correlación de la expresión de distrofina en biopsias de piel y músculo esquelético de pacientes con distrofinopatía.

Se incluyeron un total de 27 pacientes, a los cuales se les realizó en un mismo tiempo quirúrgico biopsia de piel y músculo esquelético y se analizó expresión de distrofina en

ambos tejidos por técnica de inmunohistoquímica y técnica de inmunofluorescencia respectivamente; el análisis de estas biopsias se realizó por dos observadores de manera cegada e independiente; en algunos casos se obtuvo muestra de sangre para extracción de DNA y realización de técnica de MLPA. No observamos una buena correlación entre la expresión de distrofina en biopsia de músculo esquelético y piel de pacientes con distrofinopatía. En un afán de tener un diagnóstico de certeza para algunos pacientes se realizó el MLPA en 16 (en ellos también se realizó inmunofluorescencia de biopsia de piel e inmunohistoquímica de biopsia de músculo), de las cuales en cinco (31.25%) hubo delección, en dos (12.5%) duplicación y nueve fueron negativas (56.25%).

Nuestros datos sugieren que en la población estudiada no hubo correlación entre la inmunofluorescencia de piel y la de músculo , por lo cual en esta etapa del estudio no se propone utilizarla como una herramienta diagnóstica adecuada.

## **ABSTRACT**

The Muscular Dystrophies are a group of diseases characterized by progressive degeneration and loss of strength. The Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is the most frequent kind of dystrophy in boys with an incidence of 1 in 3,500 new born; this group of diseases have a broad expression, from the severe form that is DMD through moderate forms like Becker Muscular Dystrophy to middle forms, all of them caused by mutation of *DMD* gene that codifies for the dystrophin protein.

For diagnosing this diseases, is required a clinical exploration and also to perform the determination of CPK levels and immunofluorescence analysis of muscle in order to detect the presence of dystrophin protein.

Now days the genetic and molecular tests are very useful in the diagnoses of dystrophinopathies, the most used of these tests is the MLPA (Amplification probe ligation multiple), as this test can amplify the 79 exons of the *DMD* gene identifying deletions/duplications (60-70%) that are the most frequent mutations; there are other technics, but their complexity and cost make them inaccessible for all the people, for this reason it is important to search for new strategies that are less invasive and also cheaper that help us to determine the diagnoses of dystrophinopathies.

In the present work we did the correlation of the dystrophin expression by comparison of the skin and muscle biopsies of patients with dystrophinopathies. We included 27 patients and realize in the same surgery a skin and muscle biopsy and we looked for the presence



of dystrophinin both tissues by immunohistochemistry and immunofluorescence respectively. The biopsies were analyzed by two independent blinded observers, when possible we obtained blood for DNA extraction and realization of MLPA technique.

We did not find a correlation in the expression of dystrophin between the two tissues; for this reason we do not recommend using the skin biopsy as an alternative for diagnosis.

## INTRODUCCIÓN

### Antecedentes

Las Distrofias Musculares son un grupo de enfermedades hereditarias caracterizadas por debilidad y degeneración muscular progresiva[1]. Este término incluye por lo menos 30 diferentes enfermedades[2]determinadas genéticamente. Todas ellas presentan afectación muscular en el examen bioquímico e histológico y algunas de ellas también presentan alteraciones en órganos diferentes al músculo. El patrón de herencia de estas enfermedades puede ser autosómico dominante, autosómico recesivo, ligado al X recesivo y de presentación esporádica.

Estas enfermedades se pueden clasificar de acuerdo a su forma clínica, su patrón de herencia y recientemente también se toma en cuenta la proteína causante de la enfermedad; así tenemos que las enfermedades pueden ser clasificadas como: laminopatías, titinopatías, distrofinopatías, disferlinopatías, etc.[3].

### Distrofinopatías

La distrofina fue la primera proteína cuya mutación se demostró que causaba Distrofia Muscular[4]. Mutaciones en el gen de distrofina causan la Distrofia Muscular más frecuente que es la de Duchenne-Becker (DMD/DMB). Esta enfermedad se nombró así después de que Guillaume Benjamin Amand Duchenne describió esta enfermedad en sus publicaciones de 1861 y 1868 llamada: *Recherches sur la paralysie musculair e pseudo-hypertrophique, ouparalysi e myosclerosique*[5]. Sin embargo, el médico Ingles Edward Meryon había descrito la misma enfermedad algunos años antes; llamándole la atención

el patrón de afección a hombres únicamente, así como que era una alteración particular del músculo y no del sistema nervioso. El médico Emil Becker describió una forma de distrofia muscular ligada al X clínicamente similar a la Distrofia Muscular de Duchenne pero con un curso más benigno [1].

A pesar de que la DMD se describió por primera vez en 1830, no fue sino hasta 1975 por medio de la microscopia electrónica y los análisis bioquímicos que se observó que los pacientes con DMD tenían un defecto en el sarcolema [6, 7].

El gen causante de la enfermedad se identificó en 1987, se le nombró gen de distrofina y codifica para una proteína llamada distrofina la cual ahora se sabe que tiene localización en el subsarcolema [6].

Una vez establecida la relación entre la alteración en la proteína distrofina y la DMD se realizaron estudios bioquímicos para poder determinar la función de esta proteína [7][8].

### **Proteína Distrofina**

En el músculo esquelético la distrofina constituye alrededor del 5% de las proteínas del citoesqueleto asociadas a membrana. El gen se localiza en el cromosoma X (Xq21) y se expande 2.5Mb. La secuencia del gen comprende 79 exones codificando para una proteína de 427kDa de 3685 residuos[9].

Esta proteína en forma de barra está compuesta de 4 dominios:

1. Dominio N-terminal (homologo a  $\alpha$ -actina)
2. Dominio Central o en barra (25 repetidos triple hélice similar a espectrina)
3. Región rica en cisteína
4. Dominio C-terminal

El extremo amino tiene un dominio de unión a actina, el cual es responsable de anclar la distrofina a la F-actina filamentosa del citoesqueleto.

El dominio central consiste en 24 repetidos similares a espectrina y la flexibilidad de este dominio se da por las regiones en forma de bisagra que lo constituyen; dentro de este dominio los repetidos de espectrina del 11 al 17 constituyen otro sitio de unión a F-actina.

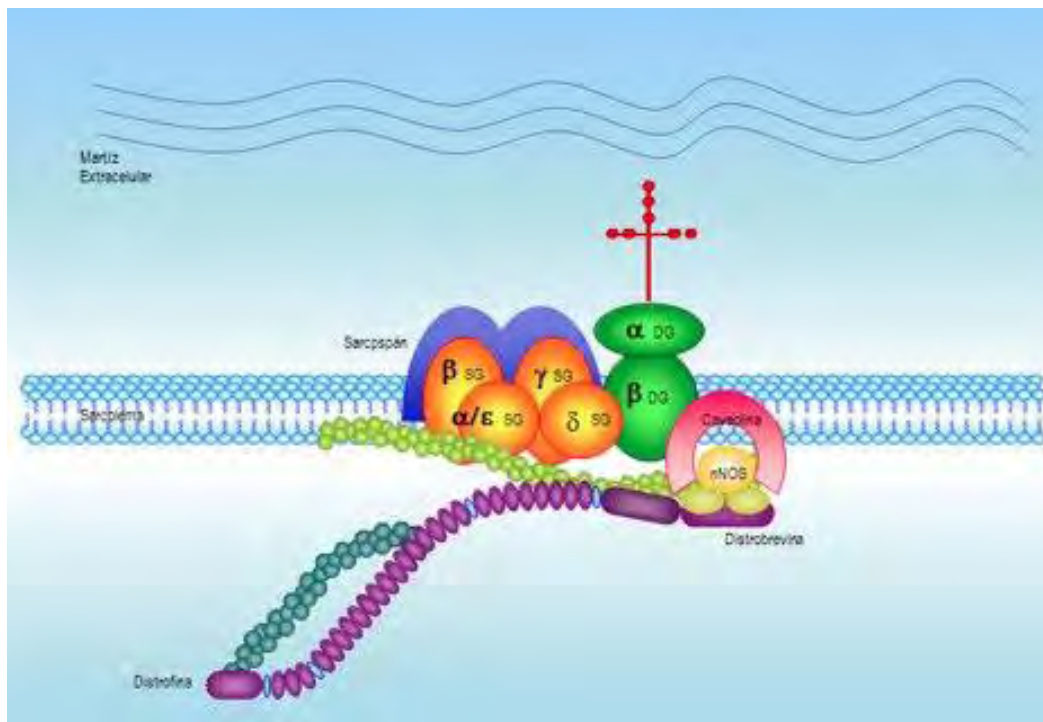
En el extremo carboxilo la región rica en cisteína interactúa con la porción intracelular de proteína transmembranal  $\beta$ -dístroglicano y ancla la distrofina al sarcolema, tiene una región  $\alpha$ -hélice que media su interacción con sintrofinas y también se une a la  $\alpha$ -dístrobervina a través de su dominio C-terminal[10].

La distrofina tiene diversas isoformas; generadas por procesamiento alternativo del RNA<sub>m</sub>, el uso de promotores alternativos que especifican la transcripción de distrofinas tejido-específicas y por distintas señales de poliadenilación. Existen por lo menos 7 isoformas que se expresan en: músculo, corteza cerebral, células de Purkinje cerebelosas, cerebro/riñón, retina, nervio periférico y la séptima isoforma que se expresa de forma ubicua en hígado y otros tejidos[11, 12].

En diversos estudios se ha observado la expresión de distrofina en músculo liso de diversas partes del cuerpo, desde músculo liso gastroesofágico hasta músculo liso vascular, pulmón y músculo piloerector de la piel[13][14, 15].

La proteína distrofina se localiza en la cara citoplásmica de la membrana plasmática de la célula muscular o sarcolema; particularmente dentro de los costameros. A través de una maquinaria de proteínas que interactúan, los costameros se acoplan al sarcolema con el disco Z de fuerza generando miofibrillas [16].

La distrofina es una proteína elástica y flexible que protege al músculo del estrés causado por la fuerza de contracción. Esta proteína interactúa con una serie de proteínas del sarcolema llamadas “Proteínas asociadas a distrofina” (DAP) las cuales forman un grupo de proteínas periféricas presentes en la membrana del músculo que conectan a la matriz extracelular con el cito esqueleto (Figura 1)[2].

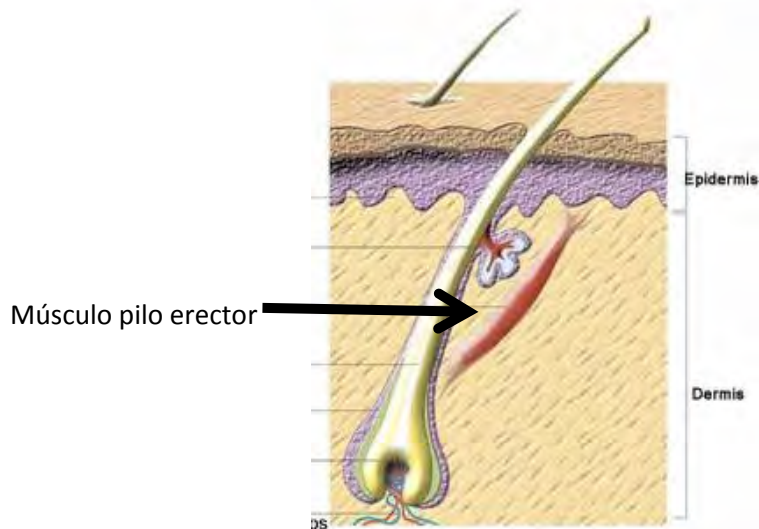


**Figura 1.** Esquema del complejo de proteínas asociadas a distrofina. Se observa la unión de la proteína distrofina (en morado) a F-actina (azul) en su extremo amino; por su parte en su extremo carboxilo se observa la unión de distrofina a distrobervina (verde claro) y a βdístroglicano (verde esmeralda). También se observan otras proteínas del complejo como α, β, δ, γ y ε sarcoglicano (naranja) así como sarcospan (azul) así como el puente entre F-actina y laminina 3 (rojo).

Se cree que la función del complejo de proteínas asociadas a distrofina es el de proteger a la célula muscular ya que en ausencia de distrofina el complejo se desestabiliza generando niveles disminuidos de otras proteínas del complejo; por lo que el papel protector de distrofina y las demás proteínas del complejo se pierde; el sarcolema frágil es sujeto a daño mecánico generando daño muscular progresivo. La capacidad de regeneración se pierde conforme la reserva endógena de células satélite deja de compensar a las fibras musculares dañadas, así mismo la extensión de la necrosis y la debilidad membranar se

exacerba por el ejercicio físico [17]. Por otra parte también se cree que este complejo participa en la transducción de señales en las fibras musculares.

En la piel se puede encontrar expresión de distrofina en el músculo piloerector [43, 44, 45], el cual se origina en el tejido conectivo de la dermis y se localiza en los folículos pilosos por debajo de la glándula sebácea. Es una banda de músculo liso que se dispone en el ángulo obtuso del folículo para producir contracción del mismo.



**Figura 2.** Esquema de la piel en el cual se muestran los diferentes componentes de la misma, mostrando el musculo pilo erector.

### **Características Clínicas de las Distrofinopatías**

Las distrofinopatías incluyen un espectro de enfermedades causadas por mutaciones en el gen *DMD* que codifica para la proteína distrofina.

Dentro de las manifestaciones clínicas de las formas leves de este espectro de enfermedades se incluyen la elevación sérica asintomática de la concentración de creatinín fosfocinasa (CPK), calambres musculares con mioglobinuria y miopatía aislada del cuádriceps [18, 71]; mientras que las formas graves de este espectro incluyen a la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), la Distrofia Muscular de Becker (DMB) y la cardiomiopatía dilatada asociada a DMD[18].

La Distrofia Muscular de Duchenne es una enfermedad neuromuscular que se hereda de forma recesiva ligada al cromosoma X con incidencia de 1 en 3,500 hombres nacidos vivos. Los signos y síntomas de esta enfermedad se presentan generalmente en la infancia temprana con retraso en el desarrollo sobre todo en la sedestación y la deambulaci3n. La edad media a la que inician la deambulaci3n es a los 18 meses, algunos pacientes presentan problemas de aprendizaje (5%) y problemas de lenguaje (3%). La edad media al momento del diagn3stico en pacientes sin antecedentes familiares es a los 5 a1os (en nuestro pa1s es a los 7 a1os aproximadamente; segun datos de la D en C L3pez Hern3ndez, en proceso de publicaci3n)[19, 20]; esta enfermedad es r3pidamente progresiva y los pacientes afectados est3n en silla de ruedas alrededor de los 12 a1os. La cardiomiopatía ocurre en todos los individuos afectados despu3s de los 18 a1os[21, 22].

Los pacientes con DMD tienen movilidad reducida y un riesgo incrementado para presentar fracturas. Debido a lo anterior son pocos pacientes sobreviven m3s all3 de la



tercera década de vida, siendo la cardiomiopatía y las complicaciones respiratorias las principales causas de muerte[23].

La presencia de los siguientes datos clínicos nos hacen sospechar en DMD:

- Debilidad muscular simétrica progresiva, a nivel proximal más que distal con hipertrofia de gastrocnemios.
- Inicio de Síntomas antes de los 5 años de edad.
- Dependencia de silla de ruedas antes de los 13 años.

Cuando no hay historia previa familiar el diagnóstico se puede sospechar en niños con retraso en desarrollo con dificultades motoras. Alteraciones cognitivas, de lenguaje y de comportamiento se observan en 1/3 parte de pacientes con distrofinopatía. Niveles de creatinina cinasa es un marcador bioquímico sensible para detección temprana de DMD y se encuentra elevada de 50 a 100 veces lo normal.

A pesar de que el gen responsable y su producto proteínico se conocen desde hace más de 15 años aunado a que existen modelos murinos para esta enfermedad ampliamente estudiados, aun no comprendemos en su totalidad el mecanismo fisiopatológico derivado de la ausencia de esta proteína distrofina [24].

La Distrofia Muscular de Becker se caracteriza por un inicio más tardío de debilidad muscular, los individuos conservan la de ambulación hasta los 20 años aproximadamente.

A pesar de presentar menor debilidad muscular en comparación a los pacientes con DMD la falla cardíaca por cardiomiopatía dilatada es una causa importante de morbilidad y la principal causa de mortalidad en estos pacientes, la edad promedio de mortalidad es alrededor de los 40 años.

La presencia de los siguientes datos clínicos nos hacen sospechar de DMB:

- Debilidad muscular progresiva simétrica y atrofia, de mayor involucro proximal que distal, generalmente con hipertrofia de gastrocnemios (la debilidad de cuádriceps puede ser el único signo).
- Calambres inducidos por actividad (presente en algunos pacientes).
- Contracturas por flexión en el codo (en etapas tardías).
- Dependencia de silla de ruedas después de los 16 años.
- Preservación de la fuerza de músculos flexores del cuello (Diferencia entre DMD de DMB).

La diferencia clínica entre DMD y DMB se basa principalmente en la gravedad de la enfermedad y en la edad a la que el paciente es dependiente de una silla de ruedas: antes de los 13 años en DMD y después de los 16 años en DMB. También se ha visto que existe un grupo intermedio en el que los pacientes se vuelven dependientes de una silla de ruedas entre los 13 y 16 años. Así mismo algunos autores han ampliado el espectro de DMB leve a aquellos pacientes con concentración elevada de creatinin fosfocinasa y

distrofina anormal en biopsia de músculo pero con involucro subclínico del músculo esquelético.[25]. Cuando estos pacientes desarrollan cardiomiopatía es imposible distinguir entre DMB y cardiomiopatía asociada a DMD.[26]

La cardiomiopatía asociada a DMD se caracteriza por dilatación ventricular izquierda y falla cardíaca congestiva.

La presencia de los siguientes hallazgos clínicos nos hacen sospechar de Cardiomiopatía asociada a DMD:

- Cardiomiopatía dilatada con falla cardíaca congestiva, presente entre los 20 y 40 años de edad en los hombres y en edades más tardías en mujeres.
- Generalmente no hay evidencia clínica de enfermedad en musculo esquelético; puede ser clasificado como Distrofia Muscular de Becker subclínico.
- Progresión rápida a la muerte en hombres y progresión lenta en mujeres.

Las mujeres portadoras de mutaciones en el gen DMD tienen riesgo incrementado a padecer esta cardiomiopatía[4].

### **Datos Moleculares de Las Distrofinopatías**

En los pacientes con DMD y DMB el fenotipo se correlaciona con el grado de expresión de distrofina, lo cual está determinado por la regla del marco de lectura [27, 28].

Pacientes con DMD tienen mutaciones que no conservan el marco de lectura y en consecuencia hay una ausencia de la proteína. En el caso de DMB las mutaciones respetan el marco de lectura y por lo tanto se genera una proteína más pequeña que llega a ser funcional; esta regla tiene una certeza del 91-92% [29-32].

Se sabe que el 53% de pacientes con distrofinopatía en nuestra población presentan deleciones del gen, dato que coincide con lo reportado en el resto de las poblaciones en nuestro país no se han reportado duplicaciones ni mutaciones puntuales[29][30, 31][32][29].

Por otra parte existen casos en los cuales hay cardiomiopatía asociada a DMD en donde no hay alteraciones a nivel de músculo esquelético y se originan por mutaciones que producen afección del promotor muscular; sin embargo promotores alternativos son activos en músculo esquelético, con lo cual la expresión de distrofina es suficiente para prevenir los síntomas del musculo esquelético [18, 33].Esta cardiomiopatía también se puede originar por alteración en dominios de la proteína que son de gran importancia para el funcionamiento del musculo cardíaco [34]. También se han observado alteraciones en la conducción cardíaca en pacientes con distrofinopatías esto relacionado a la expresión disminuida de canales de sodio cardíacos secundario a la deficiencia de distrofina [35].

## **Métodos Diagnósticos de las Distrofinopatías**

Para hacer el diagnóstico de esta enfermedad, se realizan una serie de pasos que se inician con una evaluación clínica completa, enfocándonos en la forma de inicio, distribución de la debilidad muscular y patrón de herencia; se realizan niveles de CPK y electromiografía para diferenciar si es un proceso neuropático o miopático. La biopsia de músculo esquelético se realiza para detectar cambios no específicos de las fibras musculares como variación en el tamaño de las fibras, necrosis focal y regeneración, hialinización y en etapas tardías depósito de tejido conectivo y de grasa [36][37]. Por otra parte se realiza la inmunofluorescencia de biopsia de músculo esquelético para observar el nivel de expresión de la proteína en el tejido.

Combinando las características clínicas de la enfermedad con los estudios de gabinete y la inmunofluorescencia podemos tener una orientación de la enfermedad.[38-40].

En la actualidad son muy empleadas las pruebas genéticas y moleculares en el diagnóstico de las distrofinopatías; dentro de estas tenemos prueba de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple y la prueba de amplificación por sonda dependiente de ligación múltiple (MLPA), una ventaja de esta última es la capacidad de identificar grandes deleciones y duplicaciones; otra técnica es la identificación de mutaciones puntuales por secuenciación, pero la complejidad de esta técnica y sus altos costos la hacen poco accesible [41, 42]. Es importante destacar que estas técnicas son empleadas de manera rutinaria en países de Europa y en Estados Unidos; sin embargo en México la utilización de

éstas como parte del diagnóstico se realiza en muy pocos centro; por lo que en nuestro país continua siendo la inmunofluorescencia de biopsia de músculo esquelético la primer técnica de abordaje para confirmar el diagnóstico de estas enfermedades después de la clínica y la realización de CPK sérica.

La biopsia de músculo por su parte es una técnica invasiva, la mayoría de veces se lleva a cabo en un quirófano con anestesia general (debido a que muchos de los pacientes son niños), así mismo es un procedimiento doloroso que deja cicatriz y muchas veces difícil de realizarla; también es importante recordar que estos pacientes son más susceptibles a presentar complicaciones e incluso muerte por los agentes anestésicos.; por lo que se han buscado alternativas que sean menos invasivas, menos costosas y más sencillas de realizar.

En 1995 A. Marbini, y colaboradores publicaron un artículo en el cual proponían la expresión de distrofina en biopsia de piel como alternativa diagnóstica en pacientes con distrofinopatía; dentro de los resultados encontraron que la distrofina estaba ausente en las biopsias de los pacientes con DMD estaba disminuida en los pacientes con DMB y normal en el resto de los pacientes. Pero el número de pacientes fue muy reducido;[43] posteriormente el mismo grupo de trabajo investigó la distribución de proteínas cito esqueléticas en biopsia de piel de pacientes con DMD/DMB y pacientes con diversas enfermedades neuromusculares; proponiendo a la biopsia de músculo liso como

complementaria a la biopsia de músculo estriado para el diagnóstico de distrofinopatías.

[14]

En el 2002 Niyama y colaboradores estudiaron la expresión de la proteína distrofina en la biopsia de piel de pacientes con enfermedades neuromusculares, observando expresión normal de distrofina en pacientes con enfermedades neuromusculares diferentes a distrofinopatías; en el caso de los pacientes con DMD/DMB la expresión de distrofina estaba ligeramente disminuida, con estos resultados los autores sugirieron que la biopsia de piel era muy útil en el diagnóstico de distrofinopatías y podría ser utilizada en etapas avanzadas de la enfermedad. [44] Sin embargo el número de pacientes fue muy reducido.

En el 2009 Tanveer y colaboradores realizaron un estudio para evaluar el papel de la biopsia de piel en el diagnóstico de distrofinopatías y validar esta prueba para ver su utilidad como prueba complementaria/remplazo de la biopsia de musculo; en sus resultados obtuvieron expresión de la proteína distrofina muy similar en la biopsia de piel comparando con la expresión de esta proteína en la biopsia de musculo; a diferencia del estudio realizado por Niyama, estos autores no encontraron diferencia en la inmunohistoquímica para los diferentes dominios en pacientes con DMD, diciendo que sus resultados son prometedores; pero no concluyen nada en definitivo[45].

Si bien existen antecedentes acerca de la utilidad de la expresión de distrofina en la biopsia de piel, son muy pocos estudios y son poco contundentes al respecto y ninguno de los estudios es en población mexicana.

Así mismo como se mencionó anteriormente el diagnóstico de estas enfermedades es muy complejo, ya que una sola prueba no basta para establecer el diagnóstico definitivo.

En nuestro país aún son poco accesibles los estudios moleculares para toda la población, motivo por el cual es importante la búsqueda de nuevas estrategias menos invasivas y costosas que nos ayuden a determinar el diagnóstico de las distrofinopatías.



## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las distrofinopatías son las distrofias musculares más frecuentes en niños; a pesar de que existen diversas técnicas moleculares y genéticas para realizar el diagnóstico definitivo de estas enfermedades, en nuestro país son muy pocos centros en los que se realizan. La inmunofluorescencia indirecta en biopsia de músculo esquelético junto con la clínica y los estudios de gabinete continúa siendo el estándar de oro para su diagnóstico; sin embargo ésta es una técnica invasiva, que en muchas ocasiones requiere anestesia general, trayendo muchas complicaciones a los pacientes. Por su parte hay estudios en los cuales se sugiere que la biopsia de piel puede ser una buena alternativa a la biopsia de músculo esquelético; tomando en cuenta que es una técnica menos invasiva y más fácil de realizar, en este estudio nos interesa ver la correlación entre la expresión de distrofina en biopsia de músculo esquelético y biopsia de piel de los pacientes con distrofinopatía.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Existirá correlación entre la expresión de la proteína distrofina en músculo esquelético y la expresión de distrofina en biopsia de piel de pacientes con distrofinopatía?

## JUSTIFICACION

El uso de la genética molecular en medicina y sobre todo en el diagnóstico de enfermedades neuromusculares, ha generado un cambio y un avance muy drástico e importante. [46] [7]

Las distrofinopatías se diagnostican por las manifestaciones clínicas, hallazgos de estudios paraclínicos (CPK), análisis de DNA y el análisis de inmunofluorescencia en biopsia muscular que corrobora la ausencia o deficiencia de la proteína [38, 47, 48][49][50]; sin embargo ésta última es una técnica invasiva, dolorosa, que requiere anestesia general y no siempre se cuenta con el equipo ni los especialistas necesarios para realizarla; así como la necesidad de un equipo de microscopio sofisticado hacen que en ocasiones no sea accesible en todos los Centros; por otra parte se ha reportado disminución en la expresión de la proteína distrofina en músculo liso de pacientes con distrofinopatía; por lo cual es importante tener una prueba menos invasiva en la que se requiere menos tiempo para su realización, así como ser menos dolorosa e invasiva y utiliza un equipo de microscopía menos complejo (de luz blanca). Por lo anterior es necesario primero determinar si existe correlación en la expresión de la proteína distrofina de ambos tejidos en pacientes con diagnóstico posible de distrofinopatía (realizado únicamente por clínica y estudios de gabinete) y en pacientes con un diagnóstico de certeza (realizado por clínica y MLPA). [51, 52] [44, 45]

**OBJETIVOS:****OBJETIVO PRINCIPAL:**

- Determinar la correlación entre la expresión de distrofina en biopsia de músculo esquelético y la expresión de distrofina en biopsia de piel de pacientes con distrofinopatía.

**OBJETIVOS SECUNDARIOS:**

- Determinar la expresión de distrofina por inmunohistoquímica en biopsia de piel de pacientes con sospecha clínica de distrofinopatía (Distrofia muscular de Duchenne/Becker).
- Determinar la expresión de distrofina por inmunofluorescencia en biopsia de músculo esquelético de pacientes con sospecha clínica de distrofinopatía (Distrofia muscular de Duchenne/Becker).
- Correlacionar los resultados obtenidos de la expresión de distrofina en biopsia de piel y músculo de los pacientes con sospecha clínica de distrofinopatía.
- Realizar MLPA para la determinación de eliminación o duplicación en el gen de distrofina.

## **MATERIAL Y MÉTODOS:**

### **DISEÑO DEL ESTUDIO**

Descriptivo y transversal.

### **POBLACIÓN A ESTUDIAR**

En el presente estudio se incluyeron pacientes consultados del servicio de Genética, Neurología y especialidades afines del Hospital Centro Médico Nacional XX de Noviembre, del Hospital General de Durango, del Hospital Centro Médico Nacional La Raza-IMSS, del CREED de Durango y Asociaciones de Distrofia Muscular en México (Guadalajara, Chihuahua), así como de centros que refirieron a pacientes, en quienes se sospechó distrofia muscular de Duchenne/Becker.

### **TAMAÑO DE MUESTRA**

Tamaño de la muestra no probabilístico por conveniencia.

Todos los pacientes con diagnóstico clínico de distrofia muscular de Duchenne/Becker que acudieron a consulta en el periodo de abril del 2010 a abril del 2011. (30 pacientes).

### **Criterios de Inclusión:**

- Pacientes con sospecha clínica de distrofia muscular de Duchenne/Becker a los que se les realizó biopsia de piel y músculo.
- Pacientes que aceptaron participar en el estudio.

Pacientes con sospecha de Distrofia Muscular de Duchenne:

- Pacientes que presenten debilidad muscular simétrica proximal progresiva (mayor afección de miembros inferiores que de miembros superiores)
- Pseudohipertrofia de gastrocnemios
- Incremento de Creatinin cinasa sérica más de 10 veces del nivel basal
- Pacientes que se encuentren en silla de ruedas a los 12 años

Pacientes con sospecha de Distrofia Muscular de Becker

- Debilidad muscular proximal simétrica
- Conservación de fuerza muscular el músculos flexores del cuello
- Pseudohipertrofia de gastrocnemios
- Silla de ruedas más de 16 años
- Incremento de nivel creatinin cinasa sérica 5 veces más del nivel basal

Subclínico:

- Incremento de creatinin cinasa sérica
- Hipertrofia de gastrocnemios
- Mialgia y calambres
- Mioglobinuria

Cardiomiopatía dilatada

### **Criterios de Exclusión**

- Pacientes conocidos con Distrofia muscular de Duchenne que acudieron a consulta y que ya habían sido previamente estudiados.

### **Criterios de Eliminación**

- Pacientes en los cuales la muestra fue inadecuada, mal transportada al sitio de procesamiento o mal procesada.

### **Evaluación clínica:**

En cada paciente se realizó una evaluación inicial que incluyó la realización de una historia clínica completa con el relato detallado de los antecedentes familiares, personales y patológicos, así como de las manifestaciones musculares. Además se realizó una exploración física-neurológica completa con determinación exacta de la distribución y el grado de la afección muscular.

Se tomaron en cuenta datos clínicos incluyendo: género, edad, lugar de nacimiento y residencia, ocupación, exposición a tóxicos, antecedentes familiares de patología

muscular, escolaridad, edad de inicio de manifestaciones, primeros síntomas y evolución de los mismos, posibilidad de factor desencadenante, fecha de diagnóstico, distribución de la afección muscular y su grado, la presencia de manifestaciones cardíacas y/o respiratorias. Los datos clínicos fueron escritos en un formato único de recolección de datos. (Anexo 1)

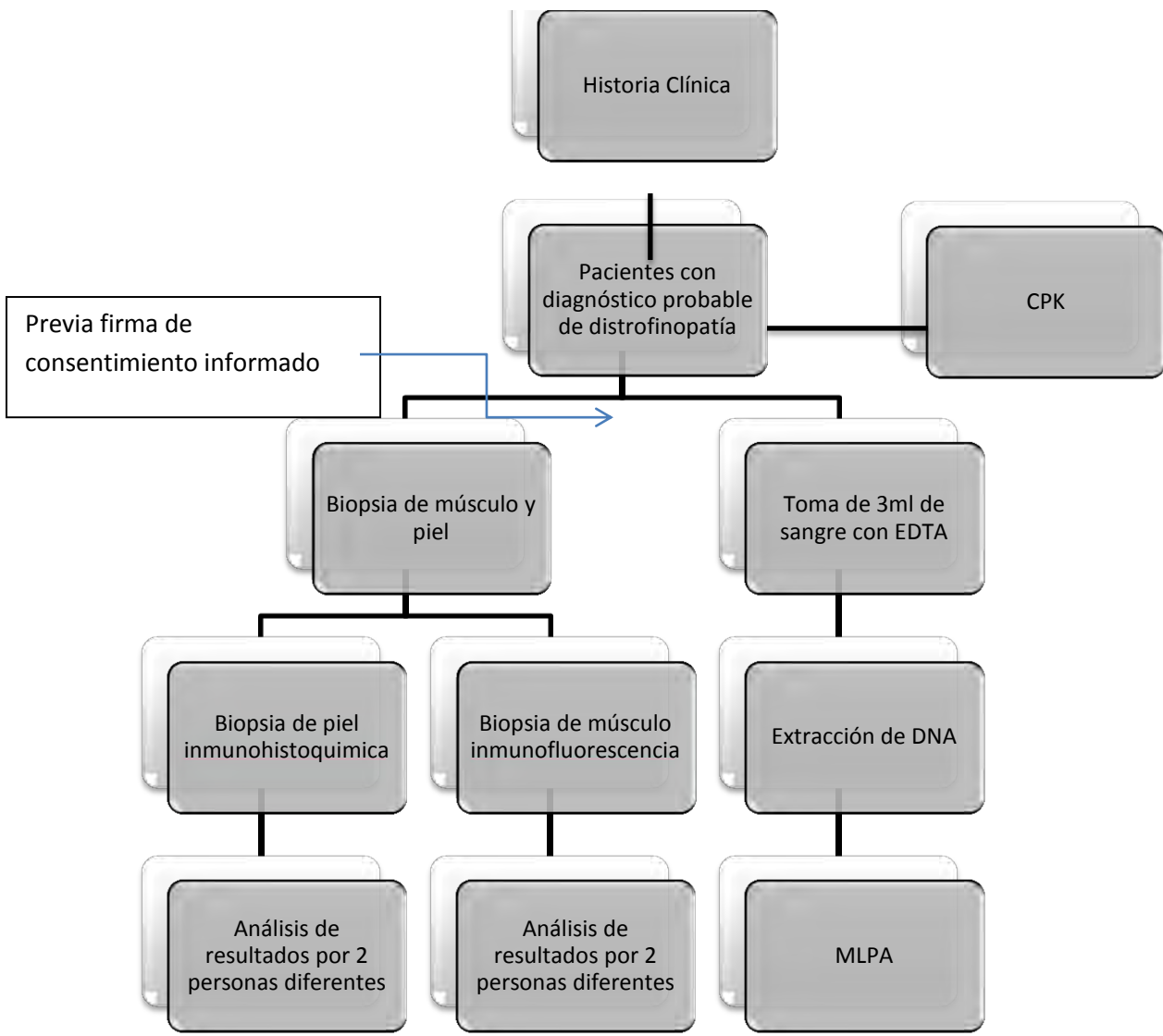
En cada caso identificado se realizó árbol genealógico con antecedentes familiares de mismas manifestaciones para posterior análisis genético.

### **Estudios paraclínicos**

Se solicitaron niveles séricos de CPK. No se excluyeron a los pacientes que no contaban con niveles de CPK

**Biopsia de musculo esquelético y piel:** Previa firma de consentimiento informado (anexos 2 y 3) a todos los pacientes se les realizó una biopsia de músculo esquelético abierta y de piel en un mismo tiempo quirúrgico y en el mismo sitio ambas (cuadriceps o músculo deltoides), mediante anestesia local. Se obtuvieron muestras de músculo estriado y piel para análisis por inmunofluorescencia e inmunohistoquímico respectivamente y en caso de que fuera factible se tomó muestra de sangre (3ml) en tubo con EDTA para extracción de DNA y análisis molecular por técnica de MLPA.

El análisis inmunohistoquímico de la distrofina se realizó en biopsias de piel normales y se estandarizó la técnica.





## ESCALA DE MEDICIÓN

Se realizó estandarización de expresión inmunohistoquímica de distrofina en biopsias de piel y músculo de pacientes sin distrofinopatía y posteriormente se compararon las biopsias de músculo y piel de pacientes con distrofia muscular de Duchenne/Becker y se determinó si existe expresión, si esta normal, disminuida o ausente (cualitativamente).

Nivel de expresión	Reflejo
+++	Normal
++-	Disminución moderada
+--	Disminución marcada
---	Ausente

El análisis de las biopsias se realizó por 2 personas diferentes de manera cegada e independiente.

Se realizará la prueba estadística de índice de kappa para observar concordancia entre los observadores, también se realizará la prueba de correlación de Pearson.

MLPA:

Se realizó toma de sangre con EDTA para extracción de DNA y realización de técnica de MLPA y se analizaron los 79 exones y se observó si hay presencia de deleciones o duplicaciones en el gen.

## **Técnicas de fijación de biopsias por congelación**

Las biopsias se trasladaron a nuestro laboratorio.

- 1) En un vaso metálico se coloca isopentano y se mete en nitrógeno líquido para que precipite.
- 2) Se corta un pedazo de corcho de 1cm x 1cm además de un pedazo de acetato
- 3) Sobre el corcho instalado se coloca 1 gota de tissuteck y colocar la biopsia sobre este.
- 4) Con el isopentano precipitado dejar caer la biopsia montada en el frasco metálico con isopentano y dejarla alrededor de 3min.
- 5) Sacar la biopsia del vaso y colocarla en un tubo (membretado)
- 6) Dejar el tubo en refrigerador a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
- 7) Corte de biopsia en criostato, los cortes serán de 7micras

La técnica de fijación y los cortes se realizaron con la misma técnica independientemente de que se trate de biopsia de piel o biopsia de musculo esquelético.

En el caso de las biopsias de piel al momento de fijarlas, se fijaron de tal forma que todas las capas de la piel se encontraran en dirección transversal con respecto al corcho.

## **Técnica de inmunofluorescencia indirecta**

- 1) Preparar la cámara húmeda con agua bidestilada
- 2) Etiquetar cada laminilla (control negativo, control positivo, Dys 2(extremo carboxilo), Dys3 (extremo amino) y DysR(dominio en barra))

- 3) Limitar el contorno con plumón hidrófobico
- 4) Agregar 1ml de solución bloqueadora a cada laminilla y dejarlo por 1 hora
- 5) Diluir el anticuerpo primario de distrofina(dilución de anticuerpo primario Dys 2 y Dys 3 1:250µl y Dys R 1:200µl).
- 6) Adicionar 300 microlitros de dilución a la laminilla correspondiente y PBS al control negativo
- 7) Dejar el anticuerpo primario 1 hora
- 8) Retirar el anticuerpo primario con PBS al 1X mediante 2 lavados: uno rápido y el segundo de 10 minutos
- 9) Diluir el anticuerpo secundario anti-ratón Cy3 en PBS (Dilución 1:250µl)
- 10) Con la luz apagada adiciono 200-500 microlitros de anticuerpo secundario a cada laminilla y dejar 1 hora.
- 11) Hacer 3 lavados con PBS de 10 minutos el primer y segundo lavado y 15 minutos el tercero.
- 12) Retirar el exceso de PBS
- 13) Poner 1 gota de Vectashield con DAPI
- 14) Poner cubreobjetos y se sella la laminilla con esmalte
- 15) Ver al microscopio.
- 16) Guardar las laminillas a 4°C protegiéndolas de la luz.

El análisis inmunohistoquímico de la distrofina se realizó en biopsias de piel normales para estandarizar técnica.

## Técnica de inmunohistoquímica con peroxidasa

Se utiliza el Kit Comercial DakoCytomation LSAB2 System HRP.

Con las biopsias de piel montadas es portaobjetos con Poly L lisina.

1. Se colocan las laminillas en una cámara húmeda.
2. Se traza una línea en el extremo superior de los tejidos y otra en el extremo inferior con plumón hidrofóbico y se etiqueta cada laminilla (control negativo, Extremos Carboxilo, extremo amino y dominio Rod)
3. Se realiza bloqueo con peroxidasa. Con el frasco etiquetado como "PEROXIDASE BLOCK" se aplican gotas sobre nuestro tejido, la suficiente cantidad como para que quede bien cubierto, se deja por media hora, posteriormente se hace 1 lavado rápido con PBS al 1% y se vuelve a cubrir nuestro tejido con "PEROXIDASE BLOCK" por media hora más.
4. Se realiza lavado rápido
5. Se realiza bloqueo por 1 hora con solución bloqueadora (Albumina al 5%, suero fetal al 0.5%, Tritón al 0.5% y gelatina al 0.05%)
6. Se incuba con anticuerpo primario por 1 hora. (Anticuerpos monoclonales primarios de laboratorios VECTOR, No. Catálogos: VP-D508, VP-D505 y VP-D507)  
  
Las diluciones de los anticuerpos primarios son:
  - a. Extremo carboxilo 1:250.

- b. Extremo amino 1:250.
  - c. Dominio Rod 1:200.
7. Se realizan 3 lavados de 5, 10 y 15 minutos con PBS 1%
  8. Se aplican gotas de frasco etiquetado como "BIOTINYLATED LINK", se incuba 11min y posteriormente se realizan 3 lavados rápidos de las laminillas.
  9. Se aplican gotas del frasco etiquetado como "STREPTAVIDIN-HRP", se incuba 11min y posteriormente se realizan 3 lavados rápidos de las laminillas.
  10. Se prepara Solución DAB y posteriormente se aplican gotas para que cubran los tejidos, se incuba por 10min y se lava con agua destilada.
  11. Se montan las laminillas con entellan.
  12. Se pone cubreobjetos.
  13. Se observan al microscopio.

### **Extracción de DNA**

Método modificado de Gustinchich S. y colaboradores.

- 1) Se toma una muestra de sangre (5-10 ml) en un tubo con EDTA como anticoagulante.
- 2) Se colocan 300µl de sangre en un tubo Eppendorf de 1.5ml estéril.
- 3) Se añaden 600µl de DTAB al 8% (Sigma) (1.5M, EDTA 50Mm, Tris 100Mm pH 8.7) al tubo Eppendorf con sangre. Se mezcla y calienta en termoblock a 65°C durante 5 minutos.
- 4) Se añaden 550µl de Cloroformo al 100% y se agita manualmente con fuerza durante 5 minutos.

- 5) Se centrifuga a 13, 000 rpm durante 10 minutos.
- 6) Después de la centrifugación quedarán 2 fases: una fase proteínica al fondo del tubo y una fase acuosa transparente en la superficie, la fase acuosa se transfiere a un nuevo tubo Eppendorf del mismo volumen sin tomar partículas de la fase proteínica.
- 7) Al nuevo tubo con la fase acuosa se le añaden 100µl de CTAB al 5% (Sigma) (NaCl 0.4M), se mezclan y se añaden 750µ de H<sub>2</sub>O estéril (ampolleta). Se mezcla despacio hasta que las fases se mezclan, se dejan reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 8) Se centrifuga a 1000rpm durante 5 minutos.
- 9) Se descarta el sobrenadante y se conserva el precipitado.
- 10) Al nuevo tubo con el precipitado se le añaden 200µl de NaCl 1.2M, se re suspende el precipitado y se agregan 850µl de etanol al 100% frío, mezclar y dejar precipitar en frío durante 10 minutos.
- 11) Centrifugar a 10, 000 rpm durante 5 minutos.
- 12) Descartar sobrenadante y conservar precipitado. Agregar 500µl de Etanol al 70%.
- 13) Centrifugar a 10, 000rpm durante 5 minutos y repetir el lavado con etanol al 70% una vez más y centrifugar en las mismas condiciones.
- 14) Descartar el sobrenadante y conservar el precipitado, secar el precipitado en un secador al vacío o en un lugar a temperatura ambiente.
- 15) Resuspender el precipitado en H<sub>2</sub>O estéril o TE.

- 16) Se cuantifican las muestras en Nano Drop 1000 para dejar las muestras en una concentración de DNA de 100ng/ $\mu$ l.

### **Técnica de MLPA**

1. Desnaturalización del DNA (DÍA 1)
  - a. Marcar tubos de 0.2ml
  - b. Agregar 5 $\mu$ l de DNA de trabajo a cada tubo (o TE/H<sub>2</sub>O para la reacción control)
  - c. Colocar los tubos en el termociclador e iniciar el programa de MLPA (ver posteriormente el programa): desnaturalizar la muestra de DNA por 5 minutos a 98° C y enfriar las muestras a 25° C antes de abrir el termociclador
2. Reacción de hibridación (día 1)
  - a. Preparar mezcla maestra de hibridación que contiene para cada reacción: 1.5ml de buffer de MLPA (tapa amarilla) + 1.5 $\mu$ l de mezcla de sonda (tapa negra). Mezclar bien pipeteando o con vortex. Cuando el termociclador alcance 25° C, agregar 3  $\mu$ l de mezcla maestra de hibridación a cada tubo muestra. Mezclar bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo
  - b. Continuar el programa de termociclador: Incubar 1 minuto a 95o C, posteriormente 16-20hrs a 60° C.
3. Reacción de ligación (día 2)



- a. Preparar mezcla maestra de ligasa, para cada reacción: 3µL de buffer A Ligasa-65 (tapa transparente) + 3µL de buffer B Ligasa-65 (tapa blanca) + 25µL de agua destilada. Mezclar bien pipeteando o por vortex.
- b. Agregar 1µL de Ligasa-65 (tapa verde) a cada reacción de mezcla maestra de ligasa. Mezclar bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- c. Continuar el programa del termociclador: pausarlo a 54° C.
- d. Cuando las muestras estén a 54° C, agregar 32 µl de mezcla maestra de ligasa a cada tubo de reacción. Mezclar pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- e. Continuar el programa de termociclador: 15 minutos de incubación a 54° C (para ligación) seguido de 5 minutos a 98°C para inactivación por calor de la enzima Ligasa-65 y pausar el programa a 15°C

#### 4. Reacción de PCR (día 2)

- a. Marcar nuevos tubos para la reacción de PCR.
- b. Preparar la mezcla de buffer de PCR que contiene para cada reacción: 4µl de buffer PCR SALSA + 26µl de agua destilada. Mezclar bien con el vortex.
- c. Agregar 30 µl de mezcla de PCR buffer a cada tubo nuevo.
- d. A temperatura ambiente transferir 10µl de cada producto de ligación a cada tubo de PCR correspondiente.
- e. Preparar mezcla maestra de polimerasa agregando para cada reacción: 2µl de primers de PCR SALSA (tapa café) + 2µl de enzima dilución buffer SALSA

(tapa azul) + 5.5µl de agua destilada + 0.5µl de polimerasa SALSA (tapa naranja).

- f. Mezclar bien pipeteando arriba y abajo, no con vortex. Almacenar en hielo hasta que se use.
- g. Continuar el programa de termociclador: pausa a 60° C y poner los tubos de PCR en el termociclador.
- h. Mientras estos tubos se encuentran en el termociclador a 60° C, agregar 10µl de mezcla de polimerasa a cada tubo. Mezclar pipeteando hacia arriba y hacia abajo y continuar el programa de termociclador inmediatamente: 35 ciclos: 30 segundos a 95° C; 30 segundos a 60° C, 60 segundos a 72° C. Terminar con 20 minutos de incubación a 72° C y posteriormente pausar a 15° C.

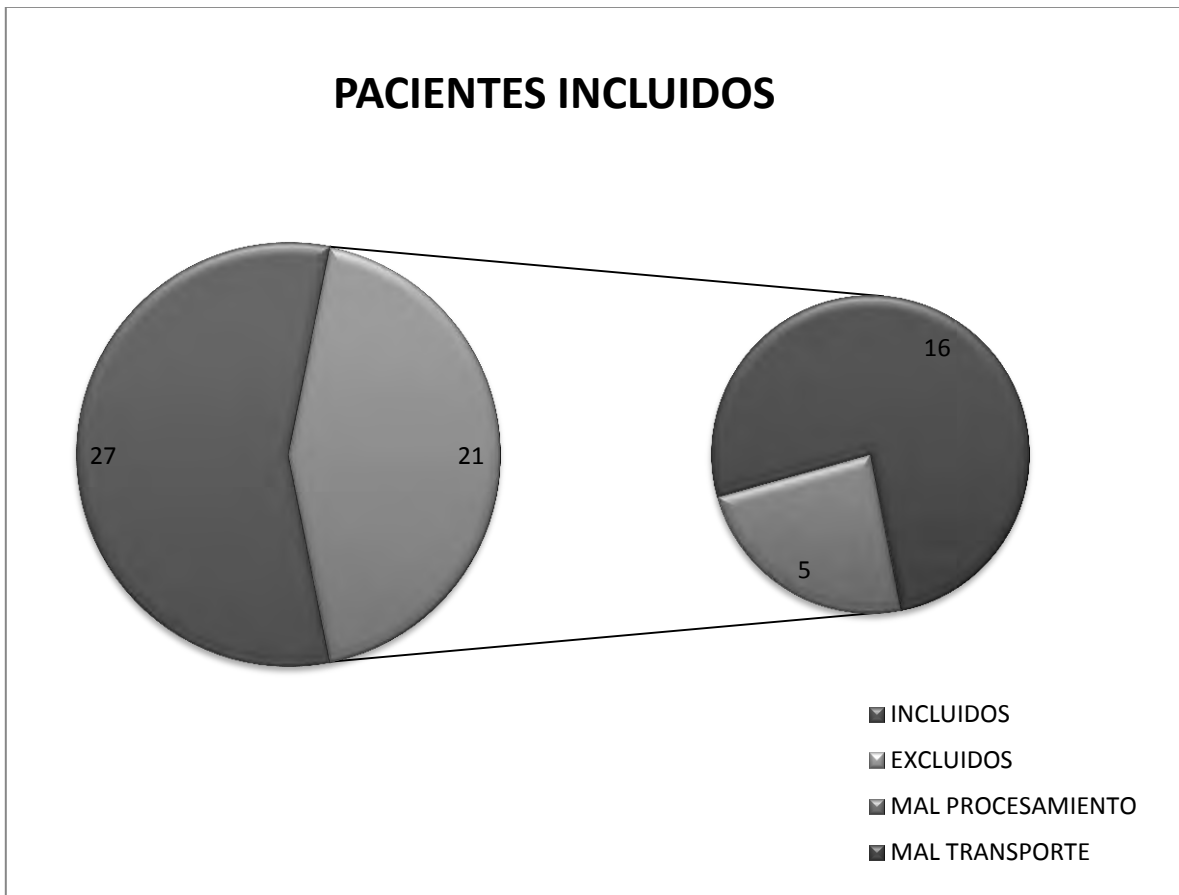
Programa de PCR para reacción de MLPA

Separación de fragmentos

- Posterior a la reacción de PCR, mezclar 0.7µl de reacción de PCR + 0.2µl de tamaño standard LIZ + 9ml de formamida. Sellar el plato de inyección e incubar por 2 minutos a 80° C.

## RESULTADOS

En el presente proyecto se obtuvo un total de 46 pacientes, de los cuales cuatro de los pacientes provinieron de la Asociación de Distrofia Muscular de Guadalajara, siete del Centro Médico Nacional “La Raza”, 31 de la Asociación de Distrofia Muscular de Chihuahua y seis del Hospital General de Durango. Del total de pacientes obtenidos, 21 pacientes se excluyeron del estudio; quedando un total de 27 pacientes (Gráfica 1).



**Gráfica 1.** Se muestra el total de pacientes que se reclutaron en un inicio para el estudio y cuantos se excluyeron y los motivos por los cuales fueron excluidos.

Con el objetivo de tener la caracterización clínica de nuestro universo muestral, consideramos importante enmarcar las principales manifestaciones los pacientes incluidos, ya que estas características pueden correlacionarse con la presencia, deficiencia o ausencia de niveles de expresión de distrofina en las biopsias de músculo esquelético y piel. Del total de pacientes que se estudiaron cinco tenían sospecha de DMB y formas leves de distrofinopatía por clínica y 21 tuvieron sospecha de DMD y en un paciente no se pudo determinar el fenotipo. La mayoría de los pacientes con sospecha de DMD presentaron síntomas de la enfermedad a edades tempranas (3.16 años en promedio) con retraso en el inicio de la de ambulación y caídas frecuentes. De los pacientes con DMB y formas leves de la enfermedad, la edad de inicio de síntomas fue a los 17 años con debilidad muscular.

En la tabla 1 se engloban las principales características clínicas encontradas en los pacientes; podemos observar que en la mayoría de ellos la edad a la que se tomó la biopsia fue a los 13.9 años, cuando la enfermedad está ya en estadios avanzados; haciendo difícil el análisis de la misma debido a que a esta edad la mayoría de los pacientes presentan mucha sustitución de músculo por tejido conectivo y tejido celular subcutáneo. Contrario a lo escrito en la literatura, solo uno de los pacientes presentó antecedentes familiares de distrofinopatía (3.2%) y el resto de los pacientes (96.8%) fue por mutación *de novo*.

Cinco pacientes tuvieron pérdida de la deambulaci3n y el resto tuvo alteraciones en la marcha; cuatro de los pacientes con p3rdida de la de ambulaci3n tuvieron la sospecha cl3nica de DMD y en uno de ellos no se determin3 el diagn3stico. En seis pacientes (24%) se present3 alteraciones del aprendizaje. En cuatro pacientes (14.81%) se encontr3 escoliosis, dos de los cuales se encontraban en silla de ruedas; otra alteraci3n encontrada fue quiste aracnoideo, que no es caracter3stico de la enfermedad.

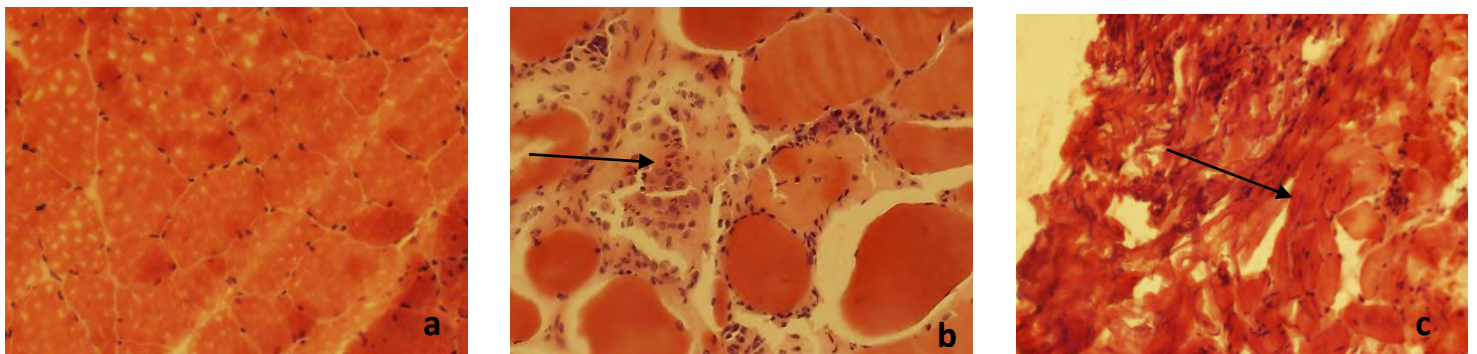
**Tabla 1.** Características clínicas de los pacientes

Número Paciente	Edad de biopsia <sup>a</sup>	Diagnóstico <sup>b</sup>	Antecedentes familiares	Perdida de ambulación	Alteración en Aprendizaje	Alteraciones sistémicas	Niveles de CPK
1	17	DMB	NO	NO	NO		600
2	8	DMD	NO	NO	NO		
3	67	ND	NO	SI	NO		
4	11	DMD	NO	NO	NO		9000
5	8	DMD	NO	NO	SI		10000
6	19	DMD	NO	SI	SI		3000
7	14	DMD	NO	SI	SI	ESCOLIOSIS	
8	37	DMB	NO	NO	NO	CARDIOPATÍA	1600
9	14	DMD	SI	SI	SI	ESCOLIOSIS	
10	27	FORMAS LEVES	NO	NO	NO		
11	10	DMD	NO	NO	NO		12000
12	10	DMD	NO	SI	NO		7000
13	12	DMD	NO	NO	NO		7708
14	10	DMB	NO	NO	NO		77
15	2	DMD	NO	NO	SI		2971
16	11	DMD	NO	NO	NO		5460
17	1	DMD	NO	NO	NO		16000
18	8	DMD	NO	NO	NO		13145
19	8	DMD	NO	NO	NO		4714
20	8	DMD	NO	NO	NO		
21	7	DMD	NO	NO	NO		8007
22	25	FORMAS LEVES	NO	NO	NO		10726
23	9	DMD	NO	NO	NO	ESCOLIOSIS	12689
24	8	DMD	NO	NO	NO		18886
25	8	DMD	NO	NO	SI		
26	9	DMD	NO	NO	NO	ESCOLIOSIS	8815
27	9	DMD	NO	NO	NO	QUISTE ARACNOIDEO	9725

<sup>a</sup>La edad a la que se tomó la biopsia coincide con la edad actual del paciente.

<sup>b</sup>La presentación clínica de los pacientes se clasificó en distrofia muscular de Duchenne (DMD), distrofia muscular de Becker (DMB), formas leves y no determinado (ND).

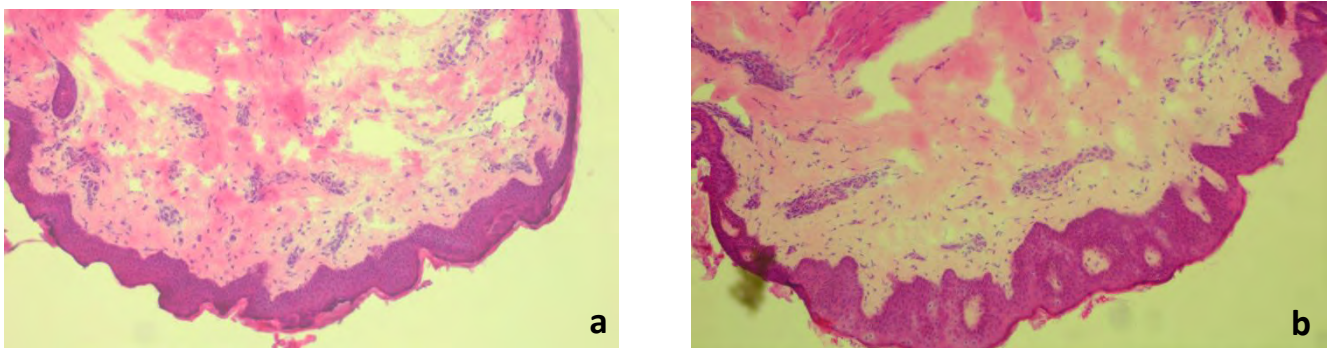
Posteriormente ya que se realizó la Historia Clínica y Exploración Física a cada uno de los pacientes, se procedió a la toma de biopsia de musculo esquelético y de piel en un mismo tiempo quirúrgico, todas las biopsias se realizaron de forma ambulatoria con anestesia local por un médico especialista; las biopsias se tomaron del músculo cuádriceps o del músculo deltoides de manera indistinta. A todas se les realizó la técnica de tinción de hematoxilina-eosina para valorar la morfología general de las fibras de músculo esquelético y de la piel (Figuras 1 y 2).



**Figura 1.** Técnica de Tinción de hematoxilina-eosina. a) Biopsia de músculo de control en donde se observa tejido muscular con tamaño de fibras simétrico y núcleos en la periferia. b) Biopsia de músculo de paciente número 26, se observan fibras asimétricas, con infiltración de tejido conectivo y tejido celular subcutáneo (flecha) así como centralización de núcleos. c) Biopsia de músculo de paciente número 12, se observa abundante sustitución de tejido muscular por tejido celular subcutáneo, así como deformación de las fibras musculares (flecha) y centralización de los núcleos.

Con esta técnica pudimos observar cambios en los pacientes con distrofinopatía, los cuales consistieron principalmente en el cambio del tamaño y forma de las fibras musculares, centralización de los núcleos y sustitución de tejido muscular por tejido conectivo y tejido celular subcutáneo; siendo más evidentes estos cambios en pacientes con enfermedad en estadios avanzados.(Figura 1 a y b )

Se realizó tinción de hematoxilina-eosina en piel, no se observaron cambios en los pacientes con distrofinopatía en comparación con la piel de controles (Figura 2 ).



**Figura 2.** Técnica de Tinción de hematoxilina-eosina a) Biopsia de piel control, se observan todas las capas de la piel con sus núcleos. b) Biopsia de piel de paciente número 9, observamos todas las capas de la piel.

Una vez que se realizó la técnica de hematoxilina-eosina de las biopsias de músculo y piel de los pacientes, se procedió a realizar la técnica de inmunofluorescencia indirecta de los cortes de las biopsias. Ésta técnica en músculo esquelético se tenía previamente estandarizada, por lo cual no hubo ningún contratiempo al momento de realizarla; en el caso de la piel la técnica no estaba estandarizada, así que se realizaron diversos experimentos con modificaciones entre ellos para encontrar las condiciones óptimas, pero se observó que con la técnica de inmunofluorescencia indirecta había mucho fondo generado por inmunofluorescencia inespecífica y además se perdía la estructura normal de la piel lo que hacía imposible su análisis (Figura 3), por lo cual se decidió cambiar

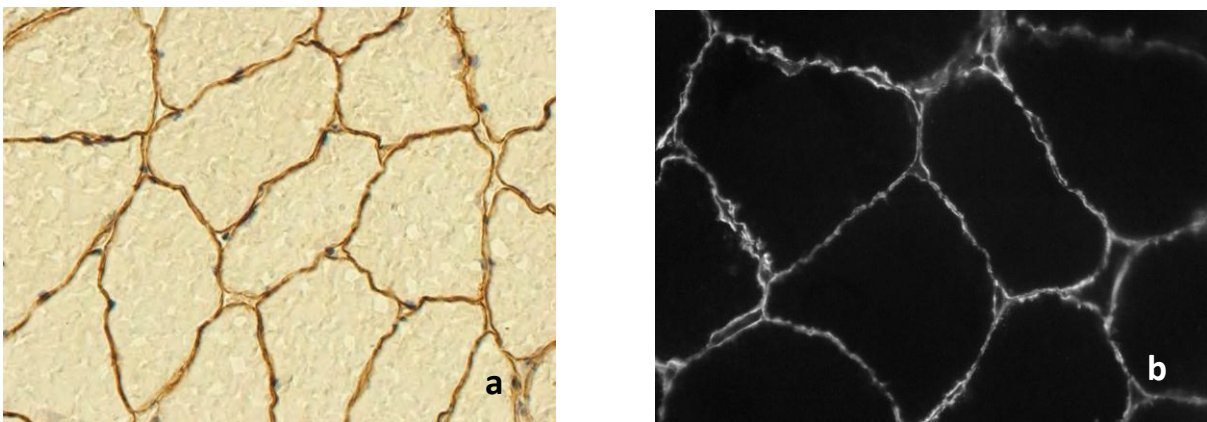


de técnica a inmunohistoquímica con peroxidasa debido a que con ésta se puede hacer una localización más precisa de la reacción, generando menor inespecificidad; para esto se utilizó un kit comercial.



**Figura 3.** Técnica de inmunofluorescencia indirecta de biopsia de piel. Se observa inmunofluorescencia inespecífica en todo el tejido, no se distingue la estructura de la piel; solo se diferencian unos núcleos que pudieran corresponder a epidermis (flecha).

Para valorar si eran comparables las técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica, se realizaron ambas técnicas en músculo esquelético de algunos pacientes y controles y se observó que si eran equiparables (Figura 4), motivo por el cual se decidió utilizar la técnica de inmunofluorescencia para las biopsias de músculo (debido a que se tenían los recursos para realizar inmunofluorescencia y no los kits necesarios para realizar inmunohistoquímica a todas las muestras).



**Figura 4. a)** Técnica de Inmunohistoquímica con peroxidasa de músculo esquelético normal, se observa la expresión de distrofina (de color café bien delimitado) en el contorno de las fibras musculares. **b)** Técnica de Inmunofluorescencia indirecta en biopsia de músculo esquelético normal, se observa la expresión de distrofina en el contorno de las fibras musculares.

Una vez que se tuvieron las inmunohistoquímicas de la piel y las inmunofluorescencias de músculo, todos los cortes se valoraron por 2 observadores (Tabla2).

**Tabla 2.** Comparación de resultados de observación de inmunofluorescencia de biopsia de músculo entre 2 observadores.

Paciente	Observador 1			Observador 2		
	D2	D3	DR	D2	D3	DR
1	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
2	(+--)	(+--)	(++)	(+--)	(+--)	(+--)
3	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)
4	(++)	(--)	(--)	(++)	(--)	(--)
5	(+--)	(--)	(--)	(+--)	(--)	(--)
6	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)
7	(+--)	(+++)	(+++)	(+--)	(+++)	(+++)
8	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)
9	(++)	(--)	(--)	(++)	(--)	(--)
10	(+--)	TMI*	(+--)	(+--)	TMI	(+--)
11	(+--)	(+++)	(+++)	(+--)	(+++)	(+++)
12	(--)	(+--)	(--)	(--)	(+--)	(--)
13	(--)	(+--)	(+--)	(--)	(+--)	(+--)
14	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
15	(++)	(+--)	(++)	(++)	(+--)	(++)
16	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	(++)
17	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
18	(--)	(+--)	(--)	(--)	(+--)	(--)
19	(++)	(+--)	(+--)	(++)	(+--)	(+--)
20	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)
21	(+++)	(++)	(+--)	(+++)	(++)	(+--)
22	(+--)	(+--)	(+++)	(+--)	(+--)	(+++)
23	(--)	(--)	(+--)	(--)	(--)	(+--)
24	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	(++)
25	(--)	(--)	(++)	(--)	(--)	(++)
26	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)
27	(--)	(--)	(+--)	(--)	(--)	(+--)

TMI\* Tejido muy infiltrado

Al analizar las biopsias de musculo esquelético por 2 observadores de manera independiente y cegada, concordaron el 100% de las observaciones.

**Tabla 3.** Comparación de resultados de observación de inmunohistoquímica de biopsia de piel entre 2 observadores.

Paciente	Observador 1			Observador 2		
	D2	D3	DR	D2	D3	DR
1	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
2	(---)	(---)	(---)	(---)	(+--)	(+++)
3	(+++)	(++-)	(+++)	(+++)	(+--)	(---)
4	(---)	(---)	(---)	(+++)	(---)	(+++)
5	(+++)	(+--)	(+--)	(+++)	(+--)	(+++)
6	(---)	(---)	(---)	(---)	(---)	(---)
7	(+--)	(+++)	(+++)	(+--)	(+++)	(+++)
8	(+++)	(++-)	(+++)	(+++)	(++-)	(+++)
9	(---)	(---)	(---)	(---)	(---)	(+++)
10	(+++)	(---)	(---)	(+++)	(---)	(---)
11	(+--)	(+++)	(+++)	(+--)	(+++)	(+++)
12	(---)	(---)	(---)	(---)	(---)	(---)
13	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
14	(---)	(++-)	(+++)	(---)	(++-)	(+++)
15	(+--)	(---)	(---)	(---)	(---)	(---)
16	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(---)
17	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
18	(---)	(---)	(---)	(---)	(---)	(---)
19	(---)	(---)	(+++)	(---)	(---)	(+++)
20	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
21	(+++)	(++-)	(+--)	(+++)	(++-)	(+--)
22	(+++)	(+--)	(+++)	(+++)	(+--)	(+++)
23	(---)	(---)	(---)	(---)	(---)	(---)
24	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
25	(+--)	(---)	(+--)	(+--)	(+--)	(+--)
26	(---)	(---)	(---)	(---)	(---)	(---)
27	(---)	(---)	(+--)	(---)	(---)	(---)

En la biopsia de piel al analizarlas por 2 observadores de manera independiente y cegada hubo concordancia de los resultados en 19 de los 27 pacientes que corresponde al 70%. Al realizar la prueba estadística se observó que esta concordancia fue de .438 con una  $p$  de 0.022 no significativa; concluyendo que hay concordancia moderada.

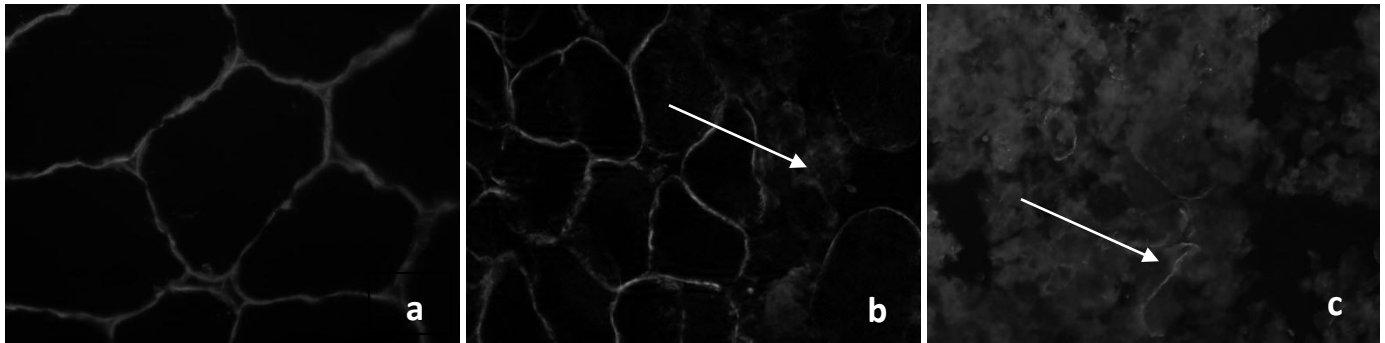
Una vez realizadas las comparaciones entre los observadores para cada una de las técnicas, se decidió buscar la correlación entre los resultados obtenidos en la biopsia de músculo y piel de cada uno de los pacientes; al hacer esta comparación hubo correlación en 12 de las 27 muestras (44%) (Tabla 4). Haciendo el análisis estadístico de correlación de Pearson se obtuvo una correlación de 0.378 con  $p$  de 0.52, con lo cual concluimos que no hay correlación.

**Tabla 4.** Comparación entre los resultados obtenidos en las observaciones de biopsia de músculo y piel de cada uno de los pacientes.

Paciente	Biopsia músculo			Biopsia piel		
	D2	D3	DR	D2	D3	DR
1	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
2	(+--)	(+--)	(+++)	(---)	(+--)	(+++)
3	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	(+--)	(---)
4	(++)	(---)	(---)	(+++)	(---)	(+++)
5	(+--)	(---)	(---)	(+++)	(+--)	(+++)
6	(---)	(---)	(---)	(---)	(---)	(---)
7	(+--)	(+++)	(+++)	(+--)	(+++)	(+++)
8	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	(++)	(+++)
9	(++)	(---)	(---)	(---)	(---)	(+++)
10	(+--)	(---)	(+--)	(+++)	(---)	(---)
11	(+--)	(+++)	(+++)	(+--)	(+++)	(+++)
12	(---)	(+--)	(---)	(---)	(---)	(---)
13	(---)	(+--)	(+--)	(+++)	(+++)	(+++)
14	(+++)	(+++)	(+++)	(---)	(++)	(+++)
15	(++)	(+--)	(++)	(---)	(---)	(---)

16	(+++)	(+++)	(++-)	(+++)	(+++)	(---)
17	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
18	(---)	(+--)	(---)	(---)	(---)	(---)
19	(++-)	(+--)	(+--)	(---)	(---)	(+++)
20	(---)	(---)	(---)	(+++)	(+++)	(+++)
21	(+++)	(++-)	(+--)	(+++)	(++-)	(+--)
22	(+--)	(+--)	(+++)	(+++)	(+--)	(+++)
23	(---)	(---)	(+--)	(---)	(---)	(---)
24	(+++)	(+++)	(++-)	(+++)	(+++)	(++-)
25	(---)	(---)	(++-)	(++-)	(+--)	(+--)
26	(---)	(---)	(---)	(---)	(---)	(---)
27	(---)	(---)	(+--)	(---)	(---)	(+--)

Con los datos obtenidos en nuestro estudio observamos que hay correlación moderada entre ambas técnicas y que por lo tanto la biopsia de músculo esquelético continua siendo el estándar de oro en el diagnóstico de las distrofinopatías en nuestro país; ahora bien hay que tomar en cuenta que la mayoría de los pacientes llegan al especialista y se les realiza la biopsia de músculo a edades avanzadas y esto al momento de analizar la biopsia trae complicaciones debido a que ya hay mucha infiltración del músculo por tejido conectivo y tejido celular subcutáneo; esta infiltración hace difícil la interpretación de los resultados ya que se genera una señal de fluorescencia muy intensa e inespecífica que se llega a confundir con la expresión esperada o en muchas ocasiones es tanta la sustitución del tejido que es muy difícil encontrar fibras musculares y no se realiza una adecuada interpretación de la expresión de distrofina en estas biopsias (Figura 5).



**Figura 5.** Técnica de inmunofluorescencia indirecta para distrofina en biopsia de músculo esquelético **a)** Paciente 17 en el cual se observa la expresión normal, las fibras están bien delimitadas y simétricas, aún no hay infiltrado de tejido conectivo. **b)** Paciente 9, observamos que hay fibras musculares de diferentes tamaños con forma es irregular y observamos tejido celular subcutáneo sustituyendo a las fibras musculares normales (flecha blanca). **c)** Paciente 10, observamos que hay mucho infiltrado de tejido celular subcutáneo sustituyendo a las fibras musculares normales, nos queda duda que haya presencia de fibra muscular (flecha blanca).

Con lo anterior recalcamos la importancia de que el diagnóstico se realice a edades tempranas para poder obtener una biopsia adecuada y hacer un buen análisis de la expresión de la proteína distrofina.

En México las distrofinopatías se diagnostican tardíamente, ya que generalmente solo se realiza una evaluación clínica que en ocasiones no es muy precisa, motivo por el cual no es fácil tener un grupo de pacientes clínicamente homogéneo; además de que hay distrofias musculares que clínicamente son muy similares a distrofinopatía, pero a nivel molecular son otras las proteínas causantes de la enfermedad [42]. Por tal motivo, en un grupo de pacientes se realizó la técnica de MLPA a algunos de los pacientes cuando se tuviera acceso a la muestra de sangre, esto con el fin de corroborar la presencia de deleciones y duplicaciones del gen y así poder

dar un diagnóstico definitivo de la enfermedad y poder correlacionar también en este grupo la deficiencia de la distrofina en la biopsia de piel y músculo. (Tabla 5)

**Tabla 5.** Datos moleculares de los pacientes con distrofinopatía

Número de Paciente	Biopsia de músculo <sup>a</sup>	Biopsia de piel <sup>b</sup>	MLPA	Mutación <sup>c</sup>	Fenotipo
1	(---)	(+--)	DEL 52	No fase.	DMD
2	(++-)	(---)	NEGATIVO		DMD
3	(++-)	(---)	DUP 1, 42 -43	No fase.	DMD
4	(++-)	(++-)	DEL 45-47	Fase	DMB
5	(++-)	(---)	DUP 2	No fase.	DMD
6	(+--)	(+++)	NEGATIVO		Formas leves
7	(++-)	(+++)	NEGATIVO		DMD
8	(+--)	(+--)	DEL 10	Fase.	DMD
9	(+--)	(---)	DEL 5-6	No fase.	DMD
10	(+--)	(+--)	NEGATIVO		DMD
11	(---)	(---)	DEL 35	Fase.	DMD
12	(---)	(+++)	NEGATIVO		DMD
13	(---)	(---)	NEGATIVO		DMD
14	(++-)	(---)	NEGATIVO		DMD
15	(+--)	(+++)	NEGATIVO		DMB
16	(++-)	(+++)	NEGATIVO		DMD
17	(+--)	(+++)	Del 19	No fase	DMD
18	(---)	(---)	DEL 51-54	No fase	DMD

<sup>a</sup>se refiere al promedio de la expresión de distrofina en los 3 dominios en la biopsia de músculo.

<sup>b</sup>se refiere al promedio de la expresión de distrofina en los 3 dominios de la biopsia de piel.

<sup>c</sup>Efecto de la mutación sobre el marco de lectura del gen: No fase- no respeta el marco de lectura del gen; Fase-Respeto el marco de lectura del gen.



Se analizó la muestra de DNA de 18 pacientes por medio de MLPA (Tabla 5); a partir de esto se obtuvieron nueve (50%) resultados negativos; en siete (38.89%) pacientes se mostró delección y dos (11.1%) pacientes tuvieron duplicación. Del total de mutaciones encontradas, cuatro (44.44%) se localizaron en el *punto caliente* mutacional menor (exón 2-20) y uno más se localizó en el *punto caliente* mayor (11.11%).

Considerando el resultado del análisis por la técnica de MLPA nueve (33.33%) de los pacientes incluidos en nuestro estudio tuvieron el diagnóstico definitivo de distrofinopatía y a 18 (66.66%) pacientes se les realizó el diagnóstico de posible distrofinopatía. Del total de pacientes con diagnóstico definitivo de distrofinopatía, en cuatro (44.4%) hubo correlación entre los niveles de expresión de proteína distrofina en la biopsia de piel y músculo esquelético y en cinco (55.55%) pacientes no hubo correlación. Al aplicar la prueba estadística de coeficiente de correlación de Pearson obtuvimos una correlación de .132 con lo cual decimos que no existe correlación entre los niveles de expresión de distrofina entre las biopsias.

La prueba de MLPA para el paciente dos resultó negativa; al comparar éste resultado con la expresión de distrofina en biopsia de músculo esquelético y piel, encontramos disminución marcada y ausencia de la expresión de la proteína respectivamente, con estos resultados hacemos el diagnóstico de posible DMD; lo cual hace complejo el asesoramiento genético, debido a que a pesar de que no se encontraron duplicaciones/delecciones del gen, no se puede descartar que existan mutaciones puntuales no identificadas por esta técnica. Por otra parte si solo tomamos en cuenta la biopsia de músculo observamos que hay disminución leve de la expresión de distrofina, que en dado caso de que la clínica no fuera sugerente del diagnóstico tendríamos que sospechar otro tipo de distrofia muscular; si tomamos en cuenta los resultados de la biopsia de músculo esquelético y la biopsia

de piel, a pesar de que resultados no concuerdan, ambos nos orientan a una alteración en la expresión de la proteína.

En el paciente seis la prueba de MLPA fue negativa, nos enfrentamos al mismo problema que el paciente anterior, debido a que en la biopsia de músculo hay disminución de la expresión moderada, pero este resultado no concuerda con la biopsia de piel cuya expresión es normal; si tomamos en cuenta que fenotípicamente el paciente se clasificó como forma leve de la enfermedad, podría haber la posibilidad de pensar en otro tipo de distrofia. Este tipo de situaciones hace difícil el asesoramiento genético de los pacientes, ejemplificando así que el abordaje y diagnóstico no siempre es tan sencillo aun cuando se cuenta con múltiples herramientas para su diagnóstico; un fenómeno que nos podría explicar la falta de concordancia entre la biopsia de piel y músculo son los fenómenos de procesamiento alternativo que se llevan a cabo en el gen.

En los pacientes 7 y 8 observamos que a pesar de que el MLPA es negativo, la expresión de distrofina en las biopsias tuvo disminución leve y moderada respectivamente y analizando nuestra tabla concluimos que los resultados entre la biopsia de piel y músculo concuerdan no dejando duda de que existe disminución de la expresión de distrofina, siendo casos posibles de distrofinopatía.

El paciente uno tuvo delección del exón 52, afectando el marco de lectura, esperando que no haya producción de proteína o que la proteína sea tan pequeña o anómala que se degrade, dándonos un fenotipo grave (DMD); al analizar la expresión de distrofina en biopsia de músculo se encuentra ausente y en biopsia de piel está disminuida de manera marcada; fenotípicamente el paciente se clasificó como DMD. En este caso en particular podemos ver que a pesar de que la expresión de distrofina en biopsia de piel y músculo no concuerdan, en ambas

hay disminución marcada y ausente, variación que podría deberse a que es un método cualitativo. En este paciente concordó la clínica con la expresión de distrofina y lo molecular.

El paciente cinco presenta duplicación del exón 2, que es la duplicación más frecuentemente reportada en los pacientes con distrofinopatía (DMD), al analizar la mutación con el programa *frame checker* se observó que esta duplicación no respeta el marco de lectura, concordando con la clínica, ya que al paciente se le clasificó fenotípicamente como DMD. Al buscar la expresión de la proteína en biopsia de músculo esquelético hubo disminución leve de la expresión de distrofina y en la biopsia de piel hubo ausencia de la expresión, si analizamos no concordaron los resultados de las biopsias de piel y músculo a pesar de que en ambas hubo disminución de la expresión proteínica.

El paciente nueve presenta delección de los exones 5-6 que no respeta el marco de lectura, concordando con la clínica que es un fenotipo DMD y al buscar la expresión de distrofina en la biopsia de músculo esquelético y piel se observa que hay disminución marcada y ausencia de la expresión respectivamente y a pesar de que no concuerdan los resultados entre las biopsias, en ambas hay disminución importante de la proteína.

El paciente 11 presenta delección del exón 35 que respeta el marco de lectura, pero fenotípicamente el paciente presenta fenotipo DMD y al buscar comparar la expresión de distrofina en biopsias de músculo esquelético y piel, ambas concuerdan que hay ausencia de la expresión de distrofina, observando que en este paciente hubo mayor relación entre las biopsias y la clínica que entre la clínica y el MLPA, lo cual nos deja ver que aún hay muchas cosas que comprender de esta y de la mayoría de las enfermedades genéticas.

El paciente tres presentó una mutación compleja que consiste en una doble duplicación del exón 1 y 42-43, la cual es muy interesante, ya que hasta el momento no se ha reportado esta mutación. Fenotípicamente tiene DMD, al analizar la expresión de distrofina en biopsia de piel y músculo esquelético no concuerda a pesar de que en ambas hay deficiencia.

El paciente cuatro tuvo delección del exón 45-47 con fenotipo DMB y concuerda la expresión de distrofina en piel y músculo.

## DISCUSIÓN

Las distrofinopatías son la forma de distrofia muscular más frecuente en niños; a pesar de que se describieron desde 1861[5] y su gen se identificó en 1987 [6],su diagnóstico continua siendo tardío [48], situación que es perjudicial para nuestros pacientes, ya que existen reportes en los cuales con un diagnóstico temprano, el uso de esteroides y otras alternativas terapéuticas se puede mejorar de manera importante su calidad de vida [53, 54].

En la actualidad se cuentan con múltiples técnicas moleculares y genéticas para el diagnóstico de estas enfermedades [55-57]; sin embargo, en nuestro país son muy pocos los Centros Hospitalarios que cuentan con los equipos necesarios y el personal capacitado para realizarlas de manera habitual; por lo cual es de suma importancia buscar alternativas diagnósticas sencillas y más accesibles a nuestro medio. La exploración clínica, la evaluación de niveles séricos de CPK y la biopsia de músculo esquelético continúan siendo los elementos diagnósticos principales; no obstante la biopsia de músculo esquelético es un método muy invasivo y en etapas tardías es compleja su interpretación, por lo que se han buscado técnicas más sencillas y accesibles; entre estas tenemos resultados muy alentadores en cuanto al uso de la biopsia de piel como herramienta diagnóstica alternativa [14, 43, 45]; no obstante existen resultados contradictorios y este tipo de estudios no se ha realizado en población mexicana.

Considerando lo anterior, como parte principal de este trabajo se realizó la comparación entre la expresión de distrofina en biopsia de músculo esquelético y de piel en pacientes con diagnóstico de distrofinopatía.

Se incluyeron 27 pacientes del sexo masculino, la mayoría de ellos originarios del Norte del país (Chihuahua); en este estado de la República hay una “Asociación de Distrofia Muscular” la cual posiblemente difunde información sobre la enfermedad, ayudando a identificar un mayor número de pacientes.

Solo uno de los pacientes tuvo antecedentes familiares de distrofinopatía, contrario a lo descrito en la literatura internacional [1, 3, 9], pero situación que coincide con un reporte realizado por Alcántara et al (1999), en donde se refiere que el 62% de los pacientes con distrofinopatía en México se presentan por mutaciones *de novo*.

Del total de nuestra población incluida en el estudio, 18 pacientes (66.66%) tuvieron el diagnóstico de posible distrofinopatía; debido a que a pesar de presentar alteraciones clínicas concordantes con distrofinopatía y disminución o ausencia de los niveles de expresión de distrofina en la biopsia de músculo, no se demostró la presencia de mutación en el gen. En nueve pacientes (33.33%) se realizó el diagnóstico definitivo de distrofinopatía. De los pacientes con diagnóstico definitivo de distrofinopatía, uno (9.6%) tuvo la sospecha de DMB por clínica y el resto (88.8%) tuvo sospecha clínica de DMD. En relación a los pacientes con diagnóstico posible de distrofinopatía, en cuatro (22.22%) se tuvo la sospecha de DMB, en uno (0.55%) no se pudo establecer el diagnóstico y en 13 (72.22%) se tuvo el diagnóstico de DMD por clínica. Estudios previos indican que la incidencia de DMD es mayor que la DMB y formas leves de la enfermedad [9]. Los datos de esta tesis concuerdan con lo anterior.

El 22% de los pacientes presentó alteraciones del aprendizaje, pero no se corroboró si estas alteraciones se debían a un coeficiente intelectual bajo o eran debido a un abandono y mala rehabilitación de los pacientes; pero hay reportes en los cuales se ha observado que el complejo de proteínas asociadas a distrofina juegan un papel

importante en la maduración de receptores de neurotransmisores y en la regulación de su liberación durante la sinapsis, generando alteraciones en la memoria y retraso mental[62].

La mayoría de los pacientes presentan síntomas a edades tempranas (3.16 años en promedio), siendo los más frecuentes la alteración en la marcha y la debilidad muscular proximal; no obstante la biopsia de músculo esquelético y el diagnóstico se realizan en promedio a los 9.23 años (6.07 años después de los primeros síntomas), situación que no es exclusiva de nuestro país; ya que en países de Latinoamérica como Brasil se reporta un retraso en el diagnóstico de 5 años e incluso en países industrializados como Estados Unidos éste es de 2.6 años[48, 58-61]. El hecho de que a los pacientes se les realice la biopsia de músculo después de varios años de evolución, da pie a que aparezcan cambios histológicos propios de la enfermedad (sustitución de músculo por tejido conectivo). Para evitar estos problemas, se ha descrito que en estos pacientes se puede realizar una Resonancia Magnética, para valorar las zonas con mayor porcentaje de músculo y así poder obtener una muestra adecuada para la biopsia; sin embargo, en nuestro medio no es factible, debido a que no en todos los Centros Hospitalarios se cuenta con resonancia magnética y es un procedimiento costoso [65].

Se encontró pérdida de la deambulación en cinco de los 27 pacientes (18%), cuatro de los cuales tenían diagnóstico de DMD y uno no se pudo clasificar; la edad a la que dejaron de caminar fue alrededor de los 11 años; lo que concuerda con la literatura[62]. En el paciente que no se estableció el fenotipo la edad de la pérdida de deambulación fue más allá de los 16 años y actualmente tiene 67 años, lo cual nos puede sugerir que se trate de otro tipo de distrofia[63].

A pesar de que la mayoría de nuestros pacientes ya tenían varios años de evolución de la enfermedad, solo seis presentaron alteraciones sistémicas, cuatro (14.81%) de los cuales tuvieron escoliosis; el 50% de estos pacientes ya no deambulaban. Si tomamos en cuenta que el 75-90% de los pacientes con DMD que no deambula presenta escoliosis, podemos inferir que dos de los pacientes que perdieron capacidad de la deambulación y aún no presentan escoliosis es muy factible que en un futuro la desarrollen[64], anticipándonos a esta complicación se podría sugerir hacer una intervención temprana.

Uno de los pacientes que se clasificó como DMB presentó cardiomiopatía dilatada que requirió trasplante cardíaco; el otro paciente clasificado como DMB no presentó esta alteración al momento del diagnóstico, pero hay que tomar en cuenta que el 100% de los pacientes con DMB desarrollan cardiopatía subclínica o asintomática[65], ante lo cual se recomienda realizar valoración cardiológica completa. Uno de los pacientes clasificados como DMD tuvo un quiste aracnoideo, alteración sistémica que no forma parte de las complicaciones habituales en la DMD[66].

Comparando nuestros datos con lo descrito por Marbini et al (1995), Niiyama et al (2002) y Tanveer et al (2009) [43-45], nosotros no observamos una buena correlación entre la expresión de distrofina en biopsia de músculo esquelético y piel; puesto que solo el 44% de los resultados coincidieron. Otro punto que es importante recalcar es que Marbini et al (1995) y Tanveer et al (2009) no reportan la edad a la que se realizó el diagnóstico de las distrofinopatías, cosa que puede influir en la correlación, debido a que en etapas avanzadas de la enfermedad cuando existe mucha sustitución de músculo por tejido conectivo y tejido celular subcutáneo, al no encontrar fibras musculares es difícil establecer los niveles de expresión de la proteína distrofina, y como sabemos este proceso degenerativo no se presenta en piel, pudiendo influir en esta pobre correlación. Por otra parte estos



autores reportan la expresión de distrofina como presente, ausente o en patrón en parche para controles, DMD y DMB respectivamente; sin embargo, nosotros hemos observado que la expresión de distrofina es diferente en cada uno de los dominios de la misma, independientemente que se trate de DMD, DMB o formas leves de la enfermedad, por lo que consideramos que es mejor reportar la expresión de cada dominio por separado.

Uno de los principales problemas al que nos enfrentamos en nuestro estudio fue que debido a que nos enviaban las biopsias de diferentes Centros Hospitalarios, no siempre eran de buena calidad (a pesar de haber enviado con anterioridad las especificaciones de como se necesitaban) y debido a que la mayoría de los pacientes son niños (con poco vello), no se encontró músculo piloerector, teniendo que eliminar 15 muestras del estudio; lo ideal hubiera sido que se tomaran en un solo Hospital como en el estudio realizado por Tanveer [45].

En los resultados obtenidos en nuestro estudio podemos observar que a pesar de que hay pobre correlación en los niveles de expresión de la proteína distrofina en ambos tejidos, cuando en una de las biopsias se reporta disminución, en la biopsia del otro tejido también hay disminución, probablemente no es igual el grado de disminución de la expresión, pero por lo general en ambos tejidos concuerdan cuando hay disminución o presencia de los niveles de proteína.

Una de las debilidades de nuestro estudio fue el de tener un grupo heterogéneo, ya que solo se pudo tener el diagnóstico definitivo en 33.33% de los pacientes, en el estudio realizado por Tanveer se realizó Western Blot a todos los pacientes, pudiendo tener un nivel cuantitativo de la deficiencia en los niveles de proteína; pero aun así el Western Blot de los pacientes tampoco determina que el diagnóstico de distrofinopatía sea definitivo.

Hubiera sido ideal que en nuestro estudio hubiéramos podido hacer el diagnóstico definitivo de distrofinopatía en todos los pacientes y en base a un grupo más homogéneo poder establecer la correlación que existe entre la expresión de distrofina en biopsia de piel y músculo esquelético, pero debido a que existe poco financiamiento en ésta área clínica en nuestro país, es difícil encontrar Centros Hospitalarios que realicen estudios moleculares en busca de mutaciones en el gen de distrofina de manera rutinaria. Por otra parte, en muchas ocasiones las distrofias musculares tienen un diagnóstico clínico tardío lo que ocasiona que los pacientes comiencen a ser estudiados en etapas muy avanzadas de la enfermedad, lo que dificulta el estudio de la distrofina por inmunofluorescencia ya que existen muy pocas fibras musculares.

El gen de la distrofina es el segundo más grande en el humano; la caracterización de mutaciones nos ha ayudado a comprender mejor la enfermedad, hacer un diagnóstico de certeza y dar un mejor asesoramiento genético. Existen diversos estudios moleculares que nos ayudan a la búsqueda de mutaciones (PCR múltiple, CGH, secuenciación, etc.), dentro de estos estudios el más empleado en la actualidad es el MLPA, debido a que es capaz de amplificar los 79 exones del gen logrando identificar deleciones/duplicaciones (60-70%) que son las mutaciones más frecuentes[67]. En nuestro estudio se realizaron un total de 18 pruebas de MLPA, de las cuales nueve fueron negativas (50%); en siete (38.89%) hubo deleción y en dos (11.11%) duplicación. La frecuencia de deleciones concuerda con lo descrito en estudios anteriores [29].

Del total de mutaciones encontradas, cuatro (44.44%) se localizaron en el *punto caliente* mutacional menor (exón 2-20) y una mutación (11.11%) se localizó en el *punto caliente* mayor (45-50), en la literatura se reporta mayor frecuencia de mutaciones en el punto caliente mayor[67], sería de interés analizar un mayor número de

pacientes para determinar si este patrón de mutaciones en el *punto caliente menor* se conserva, lo cual reflejaría el efecto que tiene el acervo genético de los individuos mexicanos sobre la distribución de estas mutaciones.

El paciente tres presenta una doble duplicación del exón 1 y del 42-43, fenómeno muy interesante. No obstante hasta donde sabemos la doble duplicación encontrada por nosotros no ha sido publicada con anterioridad. Se publicó una mutación compleja en dos hermanos que presentaron duplicación de los exones 52-55 y 63-67, aunadas a una triplicación parcial de 68-79 (no mencionan el fenotipo de los pacientes). Fenotípicamente nuestro paciente se clasificó como DMD y al buscarse la expresión de distrofina en biopsia de músculo se encontró disminución leve de la expresión de la proteína, lo cual nos puede indicar que a pesar de que hay proteína, esta tal vez sea degradada y por lo tanto no funcional, al buscar la expresión de distrofina en biopsia de piel se observó ausencia de su expresión; la diferencia tan importante en la expresión de distrofina en biopsia de piel y músculo esquelético pudiera deberse a procesamiento alternativo diferente en piel y músculo; al analizar el efecto de la mutación en el programa *frame checker* cuando se busca la duplicación del exón 1 no se espera encontrar ningún efecto en la proteína debido a la presencia de promotores alternativos en este exón; pero cuando se buscó la duplicación del exón 42-43 no se respeta el marco de lectura, lo que concuerda con la clínica; en este paciente nos interesó saber si una de la mutación debía a mutación *de novo* y la otra heredada o que una de las mutaciones hubiera sido a nivel germinal, motivo por lo cual se realizó MLPA a la madre del paciente, encontrando la misma mutación que el paciente (duplicación del exón 1, 42-43) lo cual nos indica que el paciente heredó ambas mutaciones de la madre. En la literatura hay muy pocos reportes de re arreglos complejos, los cuales se calcula que constituyen el 4% de las mutaciones[68].

El paciente cuatro presentó delección del exón 45-47, que respeta el marco de lectura, lo cual concuerda con la expresión de distrofina en las biopsias de músculo esquelético y piel, ya que en ambas hay disminución leve de la expresión de distrofina, lo cual nos indica que hay proteína y al observar la clínica de nuestro paciente asumimos que esta proteína es funcional; este paciente es muy interesante debido a que inició sus síntomas a los 32 años de edad con disnea de medianos a pequeños esfuerzos, en un inicio se hizo diagnóstico solo de cardiomiopatía dilatada, motivo por lo cual requirió trasplante cardíaco con buenos resultados, al revisar nuevamente al paciente y despertarse la sospecha de una probable distrofinopatía se volvió a interrogar, dejando ver durante el interrogatorio la existencia de ligera debilidad muscular que se sobrepuso con la miocardiopatía dilatada; así mismo se volvió a revisar y se encontró debilidad de Miembros Inferiores (+++/++++) e hipertrofia de gastrocnemios que el paciente refiere presenta desde la infancia; las características clínicas del paciente nos orientaron a realizar las biopsias y el MLPA en búsqueda de distrofinopatía, diagnóstico que se corroboró, quedando como DMB leve definitivo debido a la presencia de mutación por la técnica de MLPA y disminución de la expresión proteínica en biopsia de músculo, que en este caso concordó con el nivel de expresión de proteína en biopsia de piel. Yazaki et al (1999) examinaron a cuatro pacientes con DMB de más de 50 años, la edad de inicio de esta enfermedad fue más allá de los 30 años, todos tenían mutación alrededor de los exones 45-55; dos de los pacientes tuvieron pérdida de la de ambulación a los 40 años mientras que otros dos continuaban deambulando alrededor de los 60 y 70 años. Uno de los pacientes tenía hipertrofia de gastrocnemios. Por su parte Nakamura et al (2008) en el que hicieron seguimiento de tres pacientes con delecciones alrededor de los exones 45-55, dos pacientes tuvieron cardiomiopatía dilatada evidente, concluyendo que algunos pacientes con DMB no presentan síntomas hasta que están alrededor de los 50 años e incluso son autosuficientes a los 60-70 años [69][70].

En el paciente ocho se encontró delección del exón 10 que respeta el marco de lectura, fenotípicamente tomando solo en cuenta este criterio esperaríamos encontrar un fenotipo DMB o formas leves de la enfermedad, sin embargo al ver la clínica del paciente se clasificó como DMD y al buscar la expresión de distrofina en biopsias de músculo esquelético y piel ambas concordaron que hay disminución marcada de la expresión de distrofina, con lo cual asumimos que a pesar de que se genera proteína, esta no es funcional; por otra parte, este caso nos ejemplifica como el programa de *frame checker* solo predice lo que pasa con la proteína, pero puede haber errores en la predicción en un 8% de los casos, por lo cual a pesar de tener a la mano herramientas para el diagnóstico molecular de las enfermedades, no debemos dejar de lado la clínica y nos debe quedar muy claro que el diagnóstico de estas enfermedades se hace en conjunto con varias pruebas y con diversos médicos especialistas.

En nuestro estudio la biopsia de piel no es comparable con la biopsia de músculo, por lo cual es necesario seguir buscando nuevas herramientas.

Otra de las aportaciones de nuestro estudio, además de analizar la expresión de distrofina en dos tejidos diferentes; también se empleó la técnica de MLPA para buscar mutaciones y compararlas con la expresión proteínica; cabe resaltar que esta técnica tiene muchas ventajas sobre la PCR múltiple, ya que nos permite buscar delecciones/duplicaciones de manera cuantitativa en los 79 exones y hasta sabemos en México no se realiza esta prueba de manera habitual.

Este trabajo nos permite determinar que todavía queda bastante trabajo por realizar en cuanto al diagnóstico de estas enfermedades y sería recomendable utilizar la prueba de MLPA en pacientes con distrofinopatía, como se

hace en otros países. A partir de esto se podrían inferir la mayoría de las mutaciones mayores de nuestra población con el fin de desarrollar nuevas estrategias diagnósticas, todo esto en conjunción con las valoraciones clínicas de los pacientes.

## CONCLUSIONES

- No observamos una buena correlación entre la presencia de los niveles de la proteína distrofina entre la biopsia de piel y la biopsia de músculo esquelético de pacientes con distrofinopatía.
- Del total de pacientes incluidos en este estudio, solo se encontró correlación entre los niveles de expresión de proteína entre biopsias de músculo esquelético y piel en 12 pacientes (44%).
- En más del 50% no se encontró correlación entre los niveles de expresión de la proteína, por tal motivo podemos proponer que al menos en este estudio, no es factible utilizar la biopsia de piel como posible herramienta para el diagnóstico de distrofinopatía; sin embargo habría que ponderar hacer un estudio con un grupo de pacientes más homogéneos, con diagnóstico temprano y definitivo de distrofinopatía.
- Con los datos obtenidos en nuestro estudio es difícil determinar la utilidad de la biopsia de piel, ya que el diagnóstico de esta enfermedad en México se realiza de manera tardía.
- Debido a que en la mayoría de nuestros pacientes el diagnóstico fue tardío, es difícil establecer una verdadera correlación ya que en estadios avanzados de la enfermedad hay degeneración muscular importante dificultando la visualización de fibras musculares, pudiendo dar ausencia de los niveles de proteína en músculo esquelético, y como en la piel no ocurre este proceso degenerativo se pudiera encontrar deficiencia leve o incluso expresión normal de la proteína, haciendo que nuestros datos no concuerden.
- Por otra parte en el gen distrofina existe procesamiento alternativo para de manera habitual, para dar origen a diversas isoformas. Otro motivo por el cual pudiera no haber buena correlación entre los niveles de expresión de la proteína en ambos tejidos, es debido a la posible existencia de procesamiento alternativo en la piel.

## **ANEXOS**

### **Anexo 1**

#### **FORMATO DE HISTORIA CLÍNICA PARA DISTROFIAS MUSCULARES**

**Fecha de elaboración:**

**Nombre:** **No Expediente**

Fecha de nacimiento:

Lugar de Nacimiento: Lugar de Residencia:

Grupo étnico: Religión:

Edad:

Escolaridad: Ocupación:

Antecedentes o manifestaciones de DMD (clasificar):

Tabaquismo:

Alcoholismo:

Drogadicción:

Género: (Fem) (Mas).

Número de generaciones ascendentes nacidas en México:

Dirección:

Teléfono:

Teléfono de algún familiar:

**N Padre:** Fecha de nacimiento:



Lugar de Nacimiento:

Lugar de Residencia:

Grupo étnico:

Religión:

Edad:

Escolaridad:

Ocupación:

Antecedentes o manifestaciones de DMD (clasificar):

Tabaquismo:

Alcoholismo:

Drogadicción:

**N Madre:**

Fecha de nacimiento:

Lugar de Nacimiento:

Lugar de Residencia:

Grupo étnico:

Religión:

Edad:

Escolaridad:

Ocupación:

Antecedentes o manifestaciones de DMD (clasificar):

Tabaquismo:

Alcoholismo:

Drogadicción:

<b>ANTECEDENTES GINECO-OBSTRETICOS</b>
Menarca:

Ritmo:
FUM:
G: P: A: C:
FUP:

## ÁRBOL GENEALÓGICO

### ANTECEDENTES PRE-PERINATALES

No de producto:

Edad de los padres al momento de nacimiento

Control prenatal:

Intento de aborto:

Enfermedades durante el embarazo

Percepción de movimientos

Exposición a sustancias tóxicas

Ácido fólico y vitaminas

Ultrasonidos            Fechas

Atención del parto

Tipo de parto    Vaginal      Cesárea      Por qué

Anestesia

Complicaciones

### ANTECEDENTES NEONATALES

Peso                      Talla                      PC                      PT                      PA

Lloro y respiro al nacer      APGAR                      SILVERMAN                      CAPURRO

Incubadora

Ventilador

Oxígeno

Presentó: Cianosis      Convulsiones      Fiebre Hipoglicemia Ictericia

Tratamiento:

<b>DESARROLLO PSICOMOTOR BÁSICO</b>			
1.- Sostén cefálico		6.- Inicio de frases	
2.- Sentó sin ayuda		7.- Control de esfínteres	
3.- Posición de pie		8.- Conducta Social	
4.- Marcho sin ayuda		9.- Dentición	
5.- Inicio de monosílabos		10.- Progreso Escolar	

<b>ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLÓGICOS</b>
Habitación:
Higiene:
Alimentación:
Inmunizaciones

<b>ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS</b>
Propios de la Infancia
Congénitos:
Crónicos:
Quirúrgicos:
Transfusionales:
Traumáticos:
Hospitalizaciones Previas:

<b>ANTECEDENTES GINECO-OBSTRETICOS</b>
Menarca:

Ritmo:
FUM:
G: P: A: C:
FUP:

<b>PADECIMIENTO ACTUAL</b>
----------------------------

Motivo de consulta:

Inicio, signos y síntomas:

Evolución:

Estado Actual:

**Dificultad para:**

Miembros inferiores (edad).-

Subir escaleras \_\_\_\_\_

Levantarse de una silla \_\_\_\_\_

Levantarse de decúbito dorsal \_\_\_\_\_

Levantarse de cuclillas (Gowers) \_\_\_\_\_

Pararse de puntas \_\_\_\_\_

Caídas fáciles \_\_\_\_\_

Limitación del perímetro de la marcha \_\_\_\_\_

Miembros Superiores (edad).-

Levantarlos \_\_\_\_\_

Cargar pesos \_\_\_\_\_

Doblarlos (flexión) \_\_\_\_\_

Extenderlos (extensión) \_\_\_\_\_

Cerrar o abrir las manos \_\_\_\_\_

Abrir frascos de botellas \_\_\_\_\_

Debilidad de cuello no si, inicio \_\_\_\_\_

Visión Doble (diplopía) no si, inicio \_\_\_\_\_

Alteración de movimientos faciales no si, inicio \_\_\_\_\_

Dificultad para deglutir (disfagia) no si, inicio\_\_\_\_\_

Dificultad para hablar (disartria) no si, inicio\_\_\_\_\_

Falta de aire (diseña) no si, inicio\_\_\_\_\_

Pérdida de la masa muscular (atrofia) no si, inicio y  
localización\_\_\_\_\_

Dolor muscular (mialgias) no si, inicio y  
localización\_\_\_\_\_ Mioglobinuria (orina roja  
asociada o no a mialgias) no si, inicio/describir\_\_\_\_\_

Calambres no si, inicio/localización\_\_\_\_\_

Problema visual no si, inicio\_\_\_\_\_

Problema auditivo no si, inicio\_\_\_\_\_

Miotonia no si, inicio/especificar\_\_\_\_\_

<b>SIGNOS VITALES</b>
TA: / mmHg FC: X' FR: X' Temp: °C

<b>HABITUS EXTERIOR</b>

<b>SOMATOMETRIA</b>							
Peso:	grs	Talla:	cm	Brazada:	cm	PC:	cm
PC							
PT:	cm	PA:	cm	SS:	cm	SI:	cm

<b>EXPLORACIÓN</b>
1 Forma CRÁNEO:
1.1 Fontanelas
1.2 Suturas
1.3 Implantación del cabello
1.4 Frente
1.5 Implantación de pabellones auriculares
CARA
2.1 Ojos
2.2 Párpados
2.3 Cejas
2.4 Pestañas
2.5 Nariz
2.6 Puente
2.7 Narinas



2.8 Filtrum
2.9 Boca
2.10 Labios
2.11 Paladar
2.12 Dientes
Cuello
TÓRAX Y MAMAS
ABDOMEN
EXTREMIDADES
6.1 Brazos
6.2 Manos y dedos
6.3 Piernas
6.4 Pies
COLUMNA VERTEBRAL
GENITALES Y ANO
PIEL Y ANEXOS
<b>EXPLORACIÓN NEUROLÓGICA</b>
Debilidad                    (grado)
Reflejos                    (normales)    (anormales), especificar
Respuesta plantar        (normal)        (anormal), especificar

Sensibilidad	(normal)	(anormal), especificar
Movimientos oculares	(normal)	(anormal), especificar
Ptosis	(no)	(unilateral) (bilateral)
Afección ortopédica	(no)	(si), especificar

Estudios Previos:

Electromiografía (Si) (No) Resultado\_\_\_\_\_

CPK (Si) (No) \_\_\_\_\_ Referencia\_\_\_\_\_

Biopsia (Si) (No) \_\_\_\_\_

Estudio Molecular Mutaciones (Si) (No) Resultado\_\_\_\_\_

Otros: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Diagnósticos:

Interconsultas:

Cardiología:

Neumología:

Neurología:

Ortopedia:

Rehabilitación:

Genética:

Plan de estudio

**ENFASIS EN**

- Laxitud articular (Si) (No)
- Deformaciones Espinales (Si) (No) Tipo \_\_\_\_\_
- Retinopatía (Si) (No)
- Cardiopatía (Si) (No) Observaciones \_\_\_\_\_
- Problemas De Lenguaje (Si) (No) Observaciones \_\_\_\_\_
- Terapia Física (Si) (No) Tipo \_\_\_\_\_
- Esteroides (Si) (No)

Observaciones \_\_\_\_\_

Efectos secundarios \_\_\_\_\_

- Luxación congénita de cadera (Si) (No)
- Lado afectado (derecho, izquierdo, bilateral) (Si) (No)  
Observaciones \_\_\_\_\_
- Otras malformaciones congénitas (Si) (No)  
Observaciones \_\_\_\_\_

---

Nombre, Firma, Cédula y Especialidad del Médico (a)

## **Anexo 2**

### **CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

México D.F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado: EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE DISTROFINA EN BIOPSIAS DE PIEL DE PACIENTES CON DISTROFINOPATÍA (SALUD-2009-01-115205), registrado ante el Comité de Ética e Investigación del Hospital XX de Noviembre con Número \_\_\_\_\_

El objetivo de este estudio es: Evaluar mediante técnicas inmunohistoquímicas la expresión de distrofina en biopsia de piel y compararla con su expresión en biopsia de piel.

Se me ha explicado que mi participación (la de mi hijo) consistirá en acudir a cita se realizarán preguntas para completar una Historia Clínica y exploración física completa, afirmo estar de acuerdo en colaborar para que se tomen muestras de sangre venosa, la cual será utilizada para medir niveles de CPK .

Se me ha explicado también que mi participación en este estudio incluirá realizarme un estudio de MLPA que consistente en un estudio en el cual se me tiene que sacar 3ml de sangre con un anticoagulante a la cual harán extracción de DNA para analizar mi material genético y buscar un cambio (mutación) en el gen de distrofina.

Así mismo, estoy de acuerdo en que se tome una muestra de 3 mm de mi piel y musculo (cuando se realice la biopsia de rutina para el diagnostico de la distrofia muscular). Estas serán utilizadas para medir la expresión inmunohistoquímica de distrofina.

Los resultados de los estudios realizados me serán proporcionados.

Se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:

**Riesgos del estudio:** Los riesgos del estudio surgen de la necesidad de obtener muestras de sangre. Las punciones venosas pueden causar incomodidad local y posiblemente moretones. La extracción de muestras de sangre puede causar ligero mareo o vértigo.

Después del procedimiento de biopsia de piel y musculo, el área puede quedar sensible. Los riesgos de tomar una biopsia de piel incluyen infección y cicatriz, sin embargo, con las medidas de higiene adecuadas, el riesgo de infección es mínima y dado el pequeño tamaño de la muestra que me será tomada, se me ha explicado que la herida cerrará fácilmente y la cicatriz resultante apenas será visible.

**Beneficios:** Puede haber varios beneficios con mi participación en este estudio como determinar la expresión de distrofina en biopsia de piel puede ayudar a determinar su utilidad como herramienta de menor invasión.

Con respecto a los costos, mi participación en este estudio no tiene ningún costo para mí, y no recibiré ninguna compensación monetaria por mi participación.

El investigador principal se ha comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevaran a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.

El investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque ésta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

---

Nombre y firma del paciente

---

Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez

Dra. Eliganty Bahena Martínez

Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas y preguntas relacionadas con el estudio: Unidad de Investigación y teléfono celular 5533324754.

Testigos \_\_\_\_\_

### **Anexo 3**

#### **CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MENORES DE EDAD**

Yo \_\_\_\_\_, responsable directo del (la) Niño(a) \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ años de edad, manifiesto que se ha obtenido su asentimiento y otorgo de manera voluntaria mi permiso para que se le incluya como sujeto de estudio en el Proyecto de investigación médica EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE DISTROFINA EN BIOPSIAS DE PIEL DE PACIENTES CON DISTROFINOPATÍA (SALUD-2009-01-115205), luego de haber conocido y comprendido en su totalidad, la información sobre dicho proyecto y sobre los riesgos y beneficios directos e indirectos de su colaboración en el estudio, y en el entendido de que:

- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para ambos en caso de no aceptar la invitación;
- Puedo retirarlo del proyecto si lo considero conveniente a sus intereses, aun cuando el investigador responsable no lo solicite, informando mis razones para tal decisión en la Carta de Revocación respectiva;
- No haremos ningún gasto, ni recibiremos remuneración alguna por la colaboración en el estudio;
- Se guardará estricta confidencialidad sobre los datos obtenidos producto de la colaboración
- En caso de que se presentaran efectos adversos para la salud de mí representado, recibirá la atención médica requerida y una indemnización a que legalmente tiene derecho, siempre que éstos sean producto de su colaboración en el estudio.
- Puedo solicitar, en el transcurso del estudio, información actualizada sobre el mismo al investigador responsable

Lugar fecha \_\_\_\_\_

Nombre y firma del responsable \_\_\_\_\_

Parentesco o relación con el participante \_\_\_\_\_

Nombre y firma del médico que proporcionó la información para fines de consentimiento \_\_\_\_\_

TESTIGO 1

TESTIGO 2

NOMBRE \_\_\_\_\_ NOMBRE \_\_\_\_\_

FECHA: \_\_\_\_\_ FECHA: \_\_\_\_\_



## Anexo 4

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### PARA TOMA DE BIOPSIA CONTROL

México D.F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado: **Desarrollo e Implementación de una prueba diagnóstica por *Western Blot* Múltiple para las distrofias musculares más comunes en México**, registrado ante el Comité de Ética e Investigación del Hospital XX de Noviembre con Número **011/2010**

El objetivo de este estudio es: Evaluar mediante técnicas inmunohistoquímicas la expresión de distrofina en biopsia de musculo y compararla con su expresión en biopsia de piel.

Mi participación en este estudio consiste en donar piel y músculo remanentes de la cirugía ya programada. (El tamaño de la biopsia de piel es de 1cm x 1cm y el de la biopsia de musculo es de 1cm x 1.5 cm aproximadamente).

Con esto **NO SE HARÁ UNA INCISIÓN MÁS GRANDE o SERÁ NECESARIO HACER OTRO PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICODIFERENTE O ADICIONAL AL YA DETERMINADO.**

La piel y músculo donada será utilizada para medir la expresión de distrofina (una proteína alterada en patologías bien establecidas) y poder utilizarlos como control sano y comparar la expresión con la de los pacientes. Los resultados de los estudios son confidenciales.

El investigador principal se ha comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevaran a cabo.

El investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque ésta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

---

Nombre y firma del paciente

---

Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez

Dra. Eliganty Bahena Martínez

Testigos

---

Nombre y firma testigo 1

---

Nombre y firma Testigo 2

## BIBLIOGRAFÍA

1. Scriver, *The Metabolic and Molecular Bases of inherited Disease*. 8 ed. 2001, USA: Mc. Graw-Hill
2. Davies, K.E. and K.J. Nowak, *Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(10): p. 762-73.
3. Dalkilic, I. and L.M. Kunkel, *Muscular dystrophies: genes to pathogenesis*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(3): p. 231-8.
4. Dubowitz, V., *The female carrier of Duchenne muscular dystrophy*. Br Med J (Clin Res Ed), 1982. **284**(6327): p. 1423-4.
5. G., D., *L'Electrification Localisee at de son Application a la Pathologie at a la Therapeutique*. 1861: Paris : J.-B. Baillière et Fils ; Londres : Hippolyte Baillière ; New York : Baillière Brothers French
6. Koenig, M., et al., *Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals*. Cell, 1987. **50**(3): p. 509-17.
7. Hoffman, E.P., R.H. Brown, Jr., and L.M. Kunkel, *Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus*. Cell, 1987. **51**(6): p. 919-28.
8. Suzuki, A., et al., *Molecular organization at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin. Three dystrophin-associated proteins bind directly to the carboxy-terminal portion of dystrophin*. Eur J Biochem, 1994. **220**(2): p. 283-92.
9. Le Rumeur, E., S.J. Winder, and J.F. Hubert, *Dystrophin: more than just the sum of its parts*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(9): p. 1713-22.
10. Lapidos, K.A., R. Kakkar, and E.M. McNally, *The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma*. Circ Res, 2004. **94**(8): p. 1023-31.
11. Imamura, M. and E. Ozawa, *Differential expression of dystrophin isoforms and utrophin during dibutyl-tyl-cAMP-induced morphological differentiation of rat brain astrocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6139-44.
12. Wu, J.Y., et al., *Association of Duchenne muscular dystrophy with autism spectrum disorder*. J Child Neurol, 2005. **20**(10): p. 790-5.
13. Ito, K., et al., *Smooth muscle-specific dystrophin expression improves aberrant vasoregulation in mdx mice*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(14): p. 2266-75.
14. Marbini, A., et al., *Immunohistochemical localization of utrophin and other cytoskeletal proteins in skin smooth muscle in neuromuscular diseases*. J Neurol Sci, 1996. **143**(1-2): p. 156-60.
15. Nguyen, T.M., et al., *Localization of the DMDL gene-encoded dystrophin-related protein using a panel of nineteen monoclonal antibodies: presence at neuromuscular junctions, in the sarcolemma of dystrophic skeletal muscle, in vascular and other smooth muscles, and in proliferating brain cell lines*. J Cell Biol, 1991. **115**(6): p. 1695-700.
16. Ervasti, J.M., *Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(2): p. 108-17.
17. Petrof, B.J., et al., *Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3710-4.
18. Beggs, A.H., *Dystrophinopathy, the expanding phenotype. Dystrophin abnormalities in X-linked dilated cardiomyopathy*. Circulation, 1997. **95**(10): p. 2344-7.
19. Bushby, K.M., *The limb-girdle muscular dystrophies-multiple genes, multiple mechanisms*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(10): p. 1875-82.
20. Zalaudek, I., et al., *Early diagnosis in Duchenne muscular dystrophy*. Lancet, 1999. **353**(9168): p. 1975.

21. Hinton, V.J., et al., *Selective deficits in verbal working memory associated with a known genetic etiology: the neuropsychological profile of duchenne muscular dystrophy*. J Int Neuropsychol Soc, 2001. **7**(1): p. 45-54.
22. Wicksell, R.K., et al., *Specific cognitive deficits are common in children with Duchenne muscular dystrophy*. Dev Med Child Neurol, 2004. **46**(3): p. 154-9.
23. Parker, A.E., et al., *Analysis of an adult Duchenne muscular dystrophy population*. QJM, 2005. **98**(10): p. 729-36.
24. Deconinck, N. and B. Dan, *Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses*. Pediatr Neurol, 2007. **36**(1): p. 1-7.
25. Melacini, P., et al., *Myocardial involvement is very frequent among patients affected with subclinical Becker's muscular dystrophy*. Circulation, 1996. **94**(12): p. 3168-75.
26. Cox, G.F. and L.M. Kunkel, *Dystrophies and heart disease*. Curr Opin Cardiol, 1997. **12**(3): p. 329-43.
27. Monaco, A.P., et al., *An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus*. Genomics, 1988. **2**(1): p. 90-5.
28. Koenig, 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): p. 498-506.
29. Coral-Vazquez, R., et al., *Pattern of deletions of the dystrophin gene in Mexican Duchenne/Becker muscular dystrophy patients: the use of new designed primers for the analysis of the major deletion "hot spot" region*. Am J Med Genet, 1997. **70**(3): p. 240-6.
30. Hoffman, E.P., et al., *Is the carboxyl-terminus of dystrophin required for membrane association? A novel, severe case of Duchenne muscular dystrophy*. Ann Neurol, 1991. **30**(4): p. 605-10.
31. Chelly, J., et al., *Effect of dystrophin gene deletions on mRNA levels and processing in Duchenne and Becker muscular dystrophies*. Cell, 1990. **63**(6): p. 1239-48.
32. Aartsma-Rus, A., et al., *Therapeutic modulation of DMD splicing by blocking exonic splicing enhancer sites with antisense oligonucleotides*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1082**: p. 74-6.
33. Towbin, J.A., *A noninvasive means of detecting preclinical cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy?* J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(2): p. 317-8.
34. Ortiz-Lopez, R., et al., *Evidence for a dystrophin missense mutation as a cause of X-linked dilated cardiomyopathy*. Circulation, 1997. **95**(10): p. 2434-40.
35. Gavillet, B., et al., *Cardiac sodium channel Nav1.5 is regulated by a multiprotein complex composed of syntrophins and dystrophin*. Circ Res, 2006. **99**(4): p. 407-14.
36. Teijeira, S., et al., *Subsarcolemmal expression of utrophin in neuromuscular disorders: an immunohistochemical study of 80 cases*. Acta Neuropathol, 1998. **96**(5): p. 481-6.
37. Brown, S.C., F. Muntoni, and C.A. Sewry, *Non-sarcolemmal muscular dystrophies*. Brain Pathol, 2001. **11**(2): p. 193-205.
38. Zubrzycka-Gaarn, E.E., et al., *The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle*. Nature, 1988. **333**(6172): p. 466-9.
39. Tews, D.S. and H.H. Goebel, *Diagnostic immunohistochemistry in neuromuscular disorders*. Histopathology, 2005. **46**(1): p. 1-23.
40. Matei, D., et al., *Value of immunohistochemical investigation in the diagnosis of neuromuscular diseases in children*. Rom J Morphol Embryol, 2011. **52**(1): p. 111-5.
41. Schouten, J.P., et al., *Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(12): p. e57.
42. Schwartz, M., et al., *LGMD2I presenting with a characteristic Duchenne or Becker muscular dystrophy phenotype*. Neurology, 2005. **64**(9): p. 1635-7.
43. Marbini, A., et al., *Dystrophin expression in skin biopsy immunohistochemical. Localisation of striated muscle type dystrophin*. J Neurol Sci, 1995. **129**(1): p. 29-33.
44. Niiyama, T., et al., *Diagnosis of dystrophinopathy by skin biopsy*. Muscle Nerve, 2002. **25**(3): p. 398-401.
45. Tanveer, N., et al., *Diagnostic utility of skin biopsy in dystrophinopathies*. Clin Neurol Neurosurg, 2009. **111**(6): p. 496-502.

46. Navarro, C. and S. Teijeira, [*Myopathology. New concept. New laboratory*]. Neurologia, 2004. **19**(4): p. 168-82.
47. Bonilla, E., et al., *Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface*. Cell, 1988. **54**(4): p. 447-52.
48. Ciafaloni, E., et al., *Delayed diagnosis in duchenne muscular dystrophy: data from the Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network (MD STARnet)*. J Pediatr, 2009. **155**(3): p. 380-5.
49. Culligan, K.G., et al., *Role of dystrophin isoforms and associated proteins in muscular dystrophy (review)*. Int J Mol Med, 1998. **2**(6): p. 639-48.
50. Sadoulet-Puccio, H.M. and L.M. Kunkel, *Dystrophin and its isoforms*. Brain Pathol, 1996. **6**(1): p. 25-35.
51. Miyatake, M., et al., *Possible systemic smooth muscle layer dysfunction due to a deficiency of dystrophin in Duchenne muscular dystrophy*. J Neurol Sci, 1989. **93**(1): p. 11-7.
52. Uchino, M., et al., *Localisation and characterisation of dystrophin in the central nervous system of controls and patients with Duchenne muscular dystrophy*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1994. **57**(4): p. 426-9.
53. Bushby, K., et al., *Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care*. Lancet Neurol, 2010. **9**(2): p. 177-89.
54. Aartsma-Rus, A. and G.J. van Ommen, *Progress in therapeutic antisense applications for neuromuscular disorders*. Eur J Hum Genet, 2010. **18**(2): p. 146-53.
55. Abbs, S., et al., *Best practice guidelines on molecular diagnostics in Duchenne/Becker muscular dystrophies*. Neuromuscul Disord, 2010. **20**(6): p. 422-7.
56. Torella, A., et al., *One hundred twenty-one dystrophin point mutations detected from stored DNA samples by combinatorial denaturing high-performance liquid chromatography*. J Mol Diagn, 2010. **12**(1): p. 65-73.
57. Prior, T.W. and S.J. Bridgeman, *Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy*. J Mol Diagn, 2005. **7**(3): p. 317-26.
58. Alvarez Leal M, M.A.A., Perez Zuno JA, Segura Romero S, Quiroz Gongora MC, Paredes Garcia A. , *Relations between delayed diagnosis and forms of onset in Duchenne muscular dystrophy*. Gac Med Mex 1994. **130**: p. 459-64.
59. Gonzalez-Herrera, L., et al., [*Identifying deletions in the dystrophin gene and detecting carriers in families with Duchenne's/Becker's muscular dystrophy*]. Rev Neurol, 2009. **48**(2): p. 66-70.
60. de los Angeles Avaria, M., et al., [*Delayed diagnosis of Duchenne muscular dystrophy in Chile*]. Rev Med Chil, 1999. **127**(1): p. 65-70.
61. Bellayou, H., et al., *Duchenne and Becker muscular dystrophy: contribution of a molecular and immunohistochemical analysis in diagnosis in Morocco*. J Biomed Biotechnol, 2009. **2009**: p. 325210.
62. Kohler, M., et al., *Disability and survival in Duchenne muscular dystrophy*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2009. **80**(3): p. 320-5.
63. Pilgram, G.S., et al., *The roles of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the synapse*. Mol Neurobiol, 2010. **41**(1): p. 1-21.
64. Kinali, M., et al., *Management of scoliosis in Duchenne muscular dystrophy: a large 10-year retrospective study*. Dev Med Child Neurol, 2006. **48**(6): p. 513-8.
65. Finsterer, J. and C. Stollberger, *Cardiac involvement in Becker muscular dystrophy*. Can J Cardiol, 2008. **24**(10): p. 786-92.
66. Schreiber, A., et al., *Magnetic resonance imaging of children with Duchenne muscular dystrophy*. Pediatr Radiol, 1987. **17**(6): p. 495-7.
67. Tuffery-Giraud, S., et al., *Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase*. Hum Mutat, 2009. **30**(6): p. 934-45.
68. Kohli, S., et al., *Gene changes in Duchenne muscular dystrophy: comparison of multiplex PCR and multiplex ligation-dependent probe amplification techniques*. Neurol India, 2010. **58**(6): p. 852-6.
69. Yazaki, M., et al., *Clinical characteristics of aged Becker muscular dystrophy patients with onset after 30 years*. Eur Neurol, 1999. **42**(3): p. 145-9.
70. Nakamura, A., et al., *Follow-up of three patients with a large in-frame deletion of exons 45-55 in the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene*. J Clin Neurosci, 2008. **15**(7): p. 757-63.

