



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE PEDIATRÍA “DR. SILVESTRE FRENK FREUND”, CENTRO MÉDICO NACIONAL
SIGLO XXI

“Impacto de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 en la expresión de *FOXP3* y *anfiregulina* como marcadores de linfocitos T involucrados en la regeneración muscular en Distrofia Muscular de Duchenne”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

Thania Ordaz Robles

TUTORES:
DRA. MARICELA RODRÍGUEZ CRUZ
DR. ALAN CÁRDENAS CONEJO

Ciudad de México. Agosto, 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Tutores:

Dra. Maricela Rodríguez Cruz

Laboratorio de Nutrición Molecular. Unidad de Investigación Médica en Nutrición

Instituto Mexicano del Seguro Social

Correo electrónico: maricela.rodriguez.cruz@gmail.com

Dr. Alan Cárdenas Conejo

Médico con Especialidad en Genética Médica

Departamento de Genética. Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional Siglo XXI

Instituto Mexicano del Seguro Social

Correo electrónico: alan.cardenasc@imss.gob.mx

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
a. Distrofia muscular de Becker.....	1
b. Distrofia muscular de Duchenne.....	1
c. Mutaciones en <i>DMD</i>	2
d. Fisiopatología.....	2
e. Diagnóstico clínico.....	3
i. Evaluación muscular.....	4
f. Diagnóstico molecular.....	4
g. Tratamiento.....	5
i. Suplementos alimenticios.....	6
1. Ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (AGPIO3).....	6
2. MARCO TEÓRICO.....	8
a. Proceso inflamatorio en <i>DMD</i>	8
b. Papel de los linfocitos T reguladores y <i>FOXP3</i> en la regeneración muscular.....	9
c. Papel de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (AGPIO3) en linfocitos T reguladores y <i>FOXP3</i>	11
d. Papel de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (AGPIO3) sobre la <i>DMD</i>	12
i. Estudios en animales.....	12
e. Resultados previos.....	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	16
6. HIPÓTESIS.....	16
7. OBJETIVO GENERAL.....	17
a. Objetivos específicos.....	17
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
a. Diseño del estudio.....	18
b. Lugar del estudio.....	18
c. Población de estudio.....	18
d. Criterios de selección.....	18
i. Criterios de inclusión.....	18

ii. Criterios de eliminación.....	18
e. Tipo de muestreo.....	18
f. Tamaño de la muestra.....	19
g. Definición de variables de interés.....	20
h. Descripción general del estudio.....	22
i. Procedimiento.....	22
ii. Evaluación de la función muscular.....	23
i. Técnicas de laboratorio.....	24
a. Diagnóstico molecular de DMD.....	24
b. Cuantificación de mRNA de <i>FOXP3</i> y <i>AREG</i>	24
c. Extracción del mRNA total.....	24
d. Síntesis de cDNA.....	25
e. PCR en tiempo real.....	25
j. Apego de los pacientes a la suplementación.....	26
i. Extracción de lípidos por el método Folch modificado.....	26
ii. Metilación de ácidos grasos.....	27
iii. Cromatografía de gases.....	27
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
10. RESULTADOS.....	29
k. Expresión de <i>FOXP3</i> y <i>AREG</i> en leucocitos circulantes de pacientes con DMD.....	29
l. Correlación entre la función muscular y el nivel de expresión de <i>FOXP3</i> y <i>AREG</i> en pacientes con DMD.....	31
m. Apego a la suplementación.....	34
n. Efecto de la suplementación de AGPIO3 sobre el nivel de expresión de <i>FOXP3</i> y <i>AREG</i>	35
o. Correlación entre la escala de Vignos y la expresión de <i>FOXP3</i> y <i>AREG</i> de los grupos de suplementación en los meses 3 y 6.....	38
11. DISCUSIÓN.....	40
12. CONCLUSIONES.....	45
13. ASPECTOS ÉTICOS.....	46
14. REFERENCIAS.....	47
15. ANEXO 1	
a. Carta de consentimiento informado	

16. ANEXO 2

- a. Carta de asentimiento informado

17. ANEXO 3

- a. Valoración nutricia
- b. Recordatorio de alimentos de 24 horas

18. ANEXO 4

- a. Sistema de clasificación de la función motora gruesa
- b. Medical Research Council
- c. Sistema de clasificación en la escala de Brooke
- d. Sistema de clasificación en la escala de Vignos

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Diagrama de Consort de los pacientes con DMD en los grupos de suplementación.

ÍNDICE DE TABLAS

1. Datos demográficos de los pacientes con DMD agrupados por edad.
2. Datos demográficos de los pacientes con distrofia muscular de Duchenne antes de ser suplementados con los AGPIO3 o con placebo.

ÍNDICE DE GRÁFICOS

1. Expresión del mRNA de *FOXP3* en niños menores y mayores de 6 años de edad con distrofia muscular de Duchenne.
2. Expresión del mRNA de *AREG* en niños menores y mayores de 6 años de edad con distrofia muscular de Duchenne.
3. Análisis de correlación de Spearman entre el valor de la escala de Vignos y el nivel de expresión de *FOXP3*
4. Análisis de correlación de Spearman entre el nivel de expresión de *FOXP3* y *AREG*.
5. Porcentaje de cambio de EPA en eritrocitos contra placebo durante los 6 meses de suplementación.
6. Porcentaje de cambio de DHA en eritrocitos contra placebo durante los 6 meses de suplementación.
7. Expresión del mRNA de *FOXP3* durante los 6 meses de suplementación con AGPIO3 o placebo en pacientes con distrofia muscular de Duchenne.
8. Expresión del mRNA de *AREG* durante los 6 meses de suplementación con AGPIO3 o placebo en pacientes con distrofia muscular de Duchenne.
9. Análisis de correlación de Spearman entre la escala de Vignos (función muscular) con la expresión de *FOXP3* en el mes 6 de suplementación con AGPIO3

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Nutrición Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS. La investigación financiada por el Instituto Mexicano del Seguro Social con el número en el Fondo de Investigación en Salud de FIS/IMSS/PROT/G16/1609 título y con el número de registro ante el Comité Local de Investigación en salud (CLIS) de R-2017-3603-87.

RESUMEN

“Impacto de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 en la expresión de *FOXP3* y *anfiredulina* como marcadores de linfocitos T involucrados en la regeneración muscular en la Distrofia Muscular de Duchenne”

Dra. Thania Ordaz Robles, Dra. Maricela Rodríguez Cruz, Dr. Alan Cárdenas Conejo, Dr. Juan Carlos Huicochea Montiel, M. en C. Jorge Maldonado Hernández, C. M. en C. Judith Villa Morales.

MARCO TEÓRICO

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) consiste en la ausencia o disminución constitutiva de la distrofina, frecuentemente debido a eliminaciones en uno o más exones del gen *DMD*; esto último provoca inestabilidad en el sarcolema y desencadena una respuesta inflamatoria crónica. Durante la progresión de la enfermedad, los ciclos de degeneración-regeneración se van agotando lo que conduce a un aumento en las células proinflamatorias, las cuales llevan a cabo una reparación mal dirigida. Sin embargo, también se activan células antiinflamatorias como los linfocitos T reguladores, los cuales promueven la regeneración muscular mediante la expresión de *FOXP3* y *ANFIREGULINA* (*AREG*).

Recientemente se han estudiado diversos tratamientos alternativos que permiten disminuir los efectos negativos que se generan durante la fisiopatología de la enfermedad, ejemplo de ello son los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (AGPIO3), los cuales han demostrado reducir significativamente algunas citocinas proinflamatorias en pacientes con DMD. Así mismo, existe información en la literatura sobre el efecto positivo de los AGPIO3 en el aumento del transcrito de *FOXP3*, lo cual es crucial ya que actúa como un regulador maestro aumentando la generación de linfocitos T reguladores en sangre; los cuales una vez activados migran al músculo con función supresora. El aumento en el número de linfocitos T reguladores promueve la liberación de *AREG*, misma que actúa directamente en la célula satélite ayudando a la diferenciación hacia mioblastos; de esta manera estos elementos contribuyen de forma indirecta a la regeneración de fibras musculares.

OBJETIVO

Determinar el impacto de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 sobre la expresión de *FOXP3* y *AREG* como marcadores de linfocitos T reguladores circulantes que participan en la regeneración muscular de pacientes con DMD.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante el periodo de 2007-2017, se realizó la toma de muestra sanguínea periférica para la realización del diagnóstico molecular de DMD a pacientes de 3 a 8 años de edad con un diagnóstico clínico de DMD de los servicios de Genética y Neurología de la UMAE Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Aquellos con el diagnóstico confirmatorio y que cumplían con los criterios de inclusión se les invitó a participar en el presente protocolo de estudio con el correspondiente consentimiento autorizado de los padres o tutores y el asentimiento de los pacientes con 8 años de edad. Los participantes se asignaron al azar en dos grupos; el primero recibió el suplemento con EPA y DHA (2.9 g/dl de aceite de pescado en cápsulas), el segundo recibió un placebo (2.9 g/dl de aceite de girasol en cápsulas) durante 6 meses. El día de la primera cita, el paciente acudió en ayuno al laboratorio acompañado de sus padres o tutores y se le tomó una muestra de sangre periférica de 5 ml aproximadamente por venopunción para caracterizar la expresión de *FOXP3* y *AREG* como marcadores indirectos de regeneración muscular. Posterior a la toma de muestra basal, se inició la suplementación con AGPIO3 o con placebo y se les indicó a los padres o tutores que acudieran al laboratorio con los pacientes en los meses 1, 2, 3, 4, 5 y 6 para tomar una muestra sanguínea y cuantificar la expresión de los transcritos *FOXP3* y *AREG* en leucocitos circulantes cada mes de suplementación. Después de esto, se evaluó la función muscular mediante diferentes escalas (Medical Research Council, Vignos y Brooke). También en cada una de las citas se proporcionó la cantidad de cápsulas suficientes con el suplemento o placebo para un mes. Finalmente, se les aplicó un cuestionario de recordatorio de alimentos de 24 horas para evaluar la ingesta de alimentos y proporcionarles asesoría nutricia.

RESULTADOS

Se encontró un aumento en el nivel de expresión del mRNA de *FOXP3* en el grupo de niños menores de 6 años en comparación con el de mayores de 6 años. En el caso del mRNA de *AREG*, no se encontraron diferencias en el nivel de expresión entre los diferentes grupos de edad. Se determinó que existe una correlación positiva entre el nivel de expresión de

FOXP3 y la función muscular medida con la escala de Vignos, así mismo, la expresión de *FOXP3* correlacionó positivamente con la expresión de *AREG*. Los resultados de la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados omega 3 mostraron una disminución en el nivel de expresión de *FOXP3*, sin embargo, esta disminución no se presentó en los niveles de expresión de *AREG* comparados con el grupo placebo.

CONCLUSIÓN

Los pacientes con DMD en edades tempranas presentan una regeneración preservada y activa de las fibras musculares. El tratamiento con ácidos grasos poliinsaturados omega 3 disminuye la expresión de *FOXP3*. Además, en el grupo de pacientes suplementados con AGPIO3, *FOXP3* correlaciona de forma positiva con la función muscular y en consecuencia podría activar la regeneración muscular.

INTRODUCCIÓN

Los defectos congénitos en los componentes de las células musculares que dan lugar a la disfunción progresiva de los músculos esquelético y liso, son la causa de un grupo de trastornos denominados distrofias musculares. Las distrofias musculares representan un grupo heterogéneo caracterizado por degeneración progresiva del músculo esquelético acompañado de debilidad muscular y los genes afectados codifican para proteínas estructurales necesarias para la estabilidad del sarcolema (Chang *et al.*, 2016).

Las distrofinopatías forman parte de este gran grupo de distrofias musculares causadas por variantes patogénicas en el gen *DMD*, el cual codifica para la proteína distrofina. Las formas clínicas incluyen una leve en la cual los individuos pueden cursar asintomáticos o con aumento en la concentración de creatininfosfocinasa, mioglobulinuria y calambres musculares. La forma severa presenta degeneración muscular progresiva e incluye un espectro clínico que engloba la Distrofia muscular de Duchenne y Becker. La distinción entre la distrofia muscular de Duchenne y Becker se basa en la edad de dependencia de la silla de ruedas (Darras *et al.*, 2014).

a. DISTROFIA MUSCULAR DE BECKER

La distrofia muscular de Becker (DMB) se caracteriza por un inicio tardío de debilidad muscular con progresión lenta de la enfermedad, por lo que algunos pacientes pueden permanecer deambulando incluso después de los 20 años de edad. El diagnóstico clínico se realiza con la presencia de debilidad muscular simétrica y progresiva, hipertrofia de gastrocnemios, aumento en los niveles de creatininfosfocinasa de 5 veces lo normal y de forma característica los pacientes se encuentran confinados a una silla de ruedas después de los 16 años de edad.

La causa más común de mortalidad en el 50% de los casos es la cardiomiopatía dilatada con una edad promedio de muerte de 40 años. Las mujeres heterocigotas de una variante patogénica tienen un riesgo aumentado de cardiomiopatía dilatada (Darras *et al.*, 2014).

b. DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) MIM #310200 es la forma más común y grave. Se trata de una enfermedad con modelo de herencia recesivo ligado al cromosoma X por lo que afecta mayoritariamente a varones, tiene una incidencia de 1 por cada 3500 recién nacidos varones y es causada por mutaciones en el gen *DMD*; el cual se conoce como el

gen con mayor número de bases nucleotídicas en el genoma humano. El gen *DMD* está formado por 2.5 Mb, contiene 79 exones, se localiza en la región Xp21 y codifica para la proteína citoesquelética de 427 kDa, distrofina. La distrofina se expresa principalmente en músculo esquelético y cardíaco, tiene un papel primario en la unión del citoesqueleto con la matriz extracelular mediante la unión de la actina con el dominio N-terminal de la distrofina y la unión de β distroglicano del complejo distrofina-glicoproteína con el dominio C-terminal de la distrofina, esto garantiza la integridad del sarcolema durante los ciclos repetidos de contracción muscular (Chang *et al.*, 2016).

c. MUTACIONES EN *DMD*

Las mutaciones se deben frecuentemente a eliminaciones de uno o más exones en un 60% a 70% de los casos, también se han descrito duplicaciones en un 5% a 10% y mutaciones puntuales sin sentido en el 1%, que resultan en la pérdida completa de la expresión o en la producción de una proteína no funcional. La mayoría de los casos son debido a mutaciones heredadas y un 10% corresponde a mutaciones *de novo* (Darras *et al.*, 2014). La expresión fenotípica es variable y se relaciona principalmente al tipo de variantes patogénicas y su efecto en la producción de la distrofina (Bushby *et al.*, 2010).

d. FISIOPATOLOGÍA

La ausencia parcial o completa de distrofina es la base de la fisiopatología de la enfermedad ya que le confiere fragilidad a la fibra muscular e inestabilidad al sarcolema. Sin embargo, el papel del sistema inmunológico también resulta fundamental debido a que el músculo distrófico presenta mayor vulnerabilidad durante el daño inducido por la contracción causando liberación de citocinas provenientes del mastocito y acumulación de células mononucleares lo cual desencadena una respuesta inflamatoria persistente (Hussein *et al.*, 2006). Además, durante el proceso de contracción-relajación de la fibra muscular frágil se presenta estrés mecánico lo que conduce a un incremento de calcio intracelular y activación de la necrosis; sin embargo, también puede desencadenar apoptosis y autofagia de las fibras musculares dañadas. Posteriormente, estos mecanismos de muerte celular disparan la activación de macrófagos residentes para fagocitar desechos celulares y activar localmente células inflamatorias a través de la presentación de antígenos a linfocitos T reclutados de la circulación. Durante este proceso, también migran neutrófilos, eosinófilos y monocitos desde el torrente sanguíneo hacia las fibras musculares dañadas, quienes inician una respuesta inflamatoria específica liberando diferentes moléculas con acción

proinflamatoria. Diversas moléculas con acción antiinflamatoria son liberadas por macrófagos y linfocitos T reguladores, los cuales en conjunto promueven la regeneración muscular indirecta mediante la proliferación de células satélite (Sciorati *et al.*, 2016). Las células satélite son células madre del músculo esquelético que se localizan entre la lámina basal y el sarcolema de la fibra muscular. En el músculo sano permanecen quiescentes hasta que son activadas por trauma muscular o ejercicio, posteriormente entran al ciclo celular y rápidamente proliferan hacia progenitores miogénicos o mioblastos los cuales expresan MyoD, llevan a cabo múltiples divisiones celulares y finalmente se fusionan entre ellas o junto a una miofibrilla dañada para regenerarse y reparar el músculo dañado. En la DMD, se ha propuesto que existe un agotamiento del proceso de degeneración-regeneración resultando en la incapacidad de la célula satélite para regenerar eficazmente las fibras musculares dañadas (Schiaffino *et al.*, 2016).

e. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

La mayoría de los pacientes con DMD son diagnosticados alrededor de los 5 años de edad y las primeras manifestaciones clínicas incluyen retraso en la deambulación, caídas frecuentes, problemas al gatear, dificultad en el aprendizaje y problemas en el lenguaje. Durante el curso clínico de la enfermedad muestran signos de debilidad muscular proximal a los 2 a 7 años de edad, caracterizada por alteración en la marcha como primer síntoma mayormente descrito, dificultad para subir escaleras, correr, saltar o levantarse de una posición en cuclillas; es frecuente que presenten pérdida de la deambulación en la etapa puberal con uso de silla de ruedas alrededor de los 12 años de edad. Al ponerse de pie, se ayudan de los brazos para suplir la debilidad de los músculos proximales de la cintura pélvica, este signo se conoce como maniobra de Gowers y se encuentra positivo en los pacientes con DMD. En la exploración física los músculos gastrocnemios se palpan firmes con hipertrofia aparente debido al reemplazo fibroadiposo causado por el estado de inflamación crónica (Darras *et al.*, 2014).

El diagnóstico clínico de DMD se debe sospechar ante la presencia de historia familiar de la enfermedad junto con las manifestaciones clínicas de debilidad muscular proximal progresiva e hipertrofia de músculos gastrocnemios antes de los 5 años de edad o uso de silla de ruedas antes de los 12 años (Bushby *et al.*, 2010).

La evaluación clínica en la DMD incluye la realización de una historia clínica detallada, árbol genealógico y exámenes de sangre para la cuantificación de enzimas musculares y

hepáticas. Los pacientes suelen presentar elevación de la concentración sérica de la enzima creatininfosfocinasa de hasta 10 veces lo normal, este aumento es secundario a la destrucción de fibras musculares distróficas (Darras *et al.*, 2014). El 90% de los casos suelen presentar alguna complicación cardíaca, a menudo manifestada como cardiomiopatía y/o arritmia cardíaca. El riesgo de cardiomiopatía se incrementa durante la adolescencia y usualmente se presenta después de los 18 años, por ello, se requiere de estudios adicionales para establecer un tratamiento oportuno. La cardiomiopatía progresiva es actualmente una causa importante de morbimortalidad, debido a esto es primordial el inicio del manejo oportuno para ayudar a retrasar en lo posible el proceso subyacente de la enfermedad y mejorar la condición física de los pacientes con DMD (Bushby *et al.*, 2010).

i. Evaluación muscular

Para monitorear el curso de la enfermedad es necesario llevar a cabo diversas evaluaciones regulares mediante la determinación del tono muscular, rango de movimiento, postura, marcha, pruebas medidas con tiempo, monitoreo de la habilidad para realizar actividades de la vida diaria así como la aplicación de escalas de función motora y fuerza muscular; las cuales en conjunto ayudan a evaluar la respuesta al tratamiento y progresión de la enfermedad. Como parte de la evaluación muscular se encuentra la escala MRC (Medical Research Council) la cual evalúa la fuerza de miembros inferiores mediante pruebas musculares manuales; también existen las escalas de función motora como la escala de Vignos para miembros inferiores y Brooke para miembros superiores las cuales permiten la evaluación de la motricidad en esferas específicas para dar un puntaje compuesto. Todas permiten el monitoreo de la progresión y respuesta al tratamiento (Bushby *et al.*, 2010).

f. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Al tener una sospecha clínica de DMD es necesaria la confirmación mediante pruebas moleculares. El diagnóstico molecular de la DMD inició a partir de la identificación del gen de la distrofina, esto permitió conocer que la mitad de los pacientes con esta condición tienen eliminaciones grandes que incluyen varios exones localizados principalmente en dos puntos calientes; uno menor que va del exón 1 al 12 y otro mayor que va del exón 44 al 52 de *DMD* (Coral *et al.*, 2012).

El estudio molecular estándar es la Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiple (PCR múltiple) (Flanigan K., 2014). En México, se han diseñado pruebas de PCR múltiple para la localización del punto caliente mayor permitiendo detectar que 52% de los pacientes

presentan eliminaciones en dicha región. Esta técnica ha demostrado ser eficiente para la detección de eliminaciones, sin embargo, sólo cubre aproximadamente 30% del gen y no es útil para la detección de portadoras, duplicaciones y/o mutaciones puntuales (Coral *et al.*, 2012). Actualmente existen estudios que analizan el número de copias de cada exón como la amplificación de sonda dependiente de ligadura múltiple (MLPA por sus siglas en inglés) y la hibridación genómica comparativa usando microarreglos (aCGH por sus siglas en inglés); estas pruebas identifican a portadoras, duplicaciones de exones y definen la extensión de la eliminación fuera de los puntos calientes. Las mutaciones en el sitio de corte y empalme alternativo, mutaciones puntuales de sentido equivocado, sin sentido y pequeñas inserciones subexónicas requieren del análisis por secuenciación completa del gen debido a que estas mutaciones no ocurren en los puntos calientes (Flanigan K., 2014). Además del diagnóstico molecular, en algunos casos se debe realizar biopsia muscular para discernir del fenotipo Becker, también es útil para realizar diagnóstico diferencial con otras distrofias musculares; cuando no se han identificado eliminaciones por las técnicas convencionales y cuando los datos clínicos y los niveles de creatininfosfocinasa sugieren fuertemente DMD, sin embargo, este estudio está contraindicado como método diagnóstico confirmatorio de primera elección (Bushby *et al.*, 2010).

g. TRATAMIENTO

Actualmente las intervenciones farmacológicas en la DMD están dirigidas a optimizar la fuerza y funcionamiento muscular mediante terapia farmacológica y física que involucra el uso del sistema músculo-esquelético mediante ejercicios para prevenir o minimizar contracturas y deformidades, además de poder modificar la historia natural de la enfermedad. Hasta el momento no existe tratamiento específico eficaz para curar la DMD, no obstante, los glucocorticoides son el único medicamento que ha mostrado la desaceleración de la pérdida de fuerza y función muscular, reduce el riesgo de escoliosis y estabiliza la función pulmonar y cardíaca tanto a corto como a largo plazo. Una dosis de 0.75 mg/kg diarios de prednisona como primera opción muestra el perfil más favorable en niños entre 5 y 15 años de edad, no obstante, cuando existen problemas de comportamiento y sobrepeso se considera deflazacort a dosis de 0.9 mg/kg/día (Bushby *et al.*, 2010).

El objetivo principal del tratamiento con glucocorticoides es preservar la deambulaci3n, disminuir el deterioro de la funci3n respiratoria, cardíaca y ortopédica; incluso después de

la pérdida de la ambulación permite preservar la fuerza en extremidades superiores y reducir la progresión de la escoliosis. En diversos estudios se ha demostrado que el efecto de la terapia con glucocorticoides durante 6 meses mejora la función motora de miembros superiores e inferiores en pacientes con DMD y DMB, ya que reduce el número total de células inflamatorias mononucleares y de células dendríticas; inhibe la inflamación mediada por linfocitos T de manera indirecta mediante la supresión de la producción de IL-12 y ayuda a bloquear la diferenciación de monocitos hacia células dendríticas vía IL-14. Se postula que los glucocorticoides tienen un efecto inhibitorio en la expresión de moléculas coestimuladoras y sobre la presentación de antígeno de la célula dendrítica. Además, contribuyen a mejorar los cambios histológicos del músculo como son la variación del tamaño de la fibra, internalización del núcleo, degeneración, necrosis, regeneración de la miofibrilla y proliferación del tejido conectivo endomisial (Hussein *et al.*, 2006).

La terapia con glucocorticoides no es obligada en la guía médica para el tratamiento de la DMD, es una decisión personalizada basada en el estado funcional y edad del paciente. También se debe tener especial cuidado al elegir el tipo de glucocorticoide, en qué momento iniciar el tratamiento y considerar factores de riesgo para presentar efectos secundarios adversos comunes de la administración de este fármaco. Dentro de estos efectos causados por el uso crónico de dosis altas de glucocorticoides se encuentran el síndrome de Cushing, obesidad, hirsutismo, acné, verrugas, retraso del crecimiento, pubertad retrasada, cambios de comportamiento, supresión inmunológica con riesgo de infecciones, hipertensión arterial, intolerancia a la glucosa, úlcera péptica y catarata, los cuales requieren de un monitoreo cercano y cuidadoso (Bushby *et al.*, 2010).

i. Suplementos alimenticios

Actualmente se han propuesto algunas terapias alternativas a los glucocorticoides para el manejo de la DMD como los suplementos alimenticios (Bushby *et al.*, 2010). Entre estas terapias los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (AGPIO3) por su acción antiinflamatoria e inmunomoduladora podrían ser utilizados ya que se ha probado su efecto benéfico en el ratón *mdx*, modelo de la DMD.

1. Ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (AGPIO3)

Los ácidos grasos son componentes estructurales de las membranas celulares ya que el número de carbonos de la cadena y el número y posición de los dobles enlaces le confiere

fluidez permitiendo la interacción con otras células; además de permitir una adecuada señalización y regulación de la transcripción de una variedad de genes. Los ácidos grasos se clasifican por sus diferentes grados de saturación en tres clases principales; los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. Los ácidos grasos saturados se componen de una cadena simple sin dobles enlaces, mientras que los ácidos grasos monoinsaturados contienen un doble enlace y los ácidos grasos poliinsaturados contienen dos o más dobles enlaces (Stewart *et al.*, 2015).

En mamíferos, el ácido graso linoléico y el ácido graso α linolénico son ácidos grasos esenciales que no pueden ser sintetizados de manera endógena por lo que deben ser consumidos en la dieta y posteriormente ser metabolizados hasta ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga por medio del complejo enzimático desaturasa/elongasa (Rodríguez-Cruz M *et al.*, 2010). Existen dos familias de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, los omega 6 y omega 3. Los ácidos grasos omega 3 están definidos por contener varios dobles enlaces, sin embargo, el primer doble enlace se encuentra en el tercer carbono a partir del extremo metilo de la cadena de carbono; en los ácidos grasos omega 6 el primer doble enlace se encuentra en el sexto carbono (Stewart *et al.*, 2015). El ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA) son los ejemplos más representativos de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3; por el contrario, el ácido araquidónico (AA) es ejemplo de un ácido graso omega 6. Los AGPIO3 omega 3 se han estudiado ampliamente por sus efectos inmunomoduladores, antiinflamatorios y citoprotectores (Sciorati *et al.*, 2016).

1. MARCO TEÓRICO

Como se ha mencionado anteriormente, la fibra muscular con ausencia o disminución constitutiva de distrofina es más susceptible para que se dañe el sarcolema por contracciones persistentes provocando inestabilidad y un ambiente alterado con respuesta inflamatoria crónica, esto contribuye significativamente a la progresión de la enfermedad con eventual pérdida ambulatoria (Hussein *et al.*, 2006).

a. PROCESO INFLAMATORIO EN DMD

Los daños crónicos en la membrana de la fibra muscular y la liberación del contenido citoplasmático al espacio extracelular activan la respuesta inmune innata mediante la estimulación persistente de receptores tipo Toll (TLR4 y TLR7), activación de NF- κ B, expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC clase I) en células musculares, liberación de moléculas asociadas al daño muscular o necrosis (DAMP) y de ligandos TLR en el espacio extracelular (Rosenberg A., 2015). Los ligandos TLR son activados por medio de DAMP como las proteínas de choque térmico, proteínas de alta movilidad (HMGB1), ATP, ácidos nucleicos y especies reactivas de oxígeno; los cuales son liberados después de la lesión por fibras dañadas y que a su vez pueden contribuir en el reclutamiento de fagocitos, los activan y estimulan la inmunogenicidad. Las moléculas de RNA liberadas por la degeneración de las miofibrillas son los DAMPs más potentes que mantienen la respuesta inmunológica innata. Al mismo tiempo, la transcripción de moléculas como TNF- β , IL-1, IL-6, IL-10 entre otras son reguladas por el factor de transcripción NF- κ B, que a su vez, activan el reclutamiento de neutrófilos, macrófagos, linfocitos y células cebadas de la circulación (Rosenberg A., 2015).

Durante el proceso patológico de la enfermedad también existe un daño en los ciclos repetidos de degeneración-regeneración, las fibras son infiltradas por neutrófilos y macrófagos los cuales llevan a cabo una reparación mal dirigida. Las fibras regeneradas permanecen deficientes en distrofina conduciendo a un daño sucesivo en el ciclo de degeneración-regeneración, las fibras musculares vecinas también entran en necrosis durante estos ciclos manteniendo una inflamación crónica y exacerbando la activación de vías inmunitarias innatas y presentación de antígenos (Rosenberg *et al.*, 2015). Adicionalmente, las mismas citocinas proinflamatorias inducen la expresión de moléculas MHC de clase I en el músculo que incluye a las quimiocinas. Las quimiocinas tales como CCL14, CCL2, CXCL12, CXCL14 están sobreexpresadas en la DMD. CXCL14 ha mostrado ser un quimioatrayente y activador de células dendríticas, CXCL12 está altamente

expresado en fibras musculares distróficas en regeneración y atrae a macrófagos M1 los cuales en conjunto con el aumento de IFN- γ , son activados participando en la fagocitosis de fibras musculares necróticas y en leucocitos apoptóticos. Adicionalmente los macrófagos M1 tienen un papel proinflamatorio activando linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ de la circulación quienes generan una respuesta adaptativa en el músculo mediante la presentación de antígeno (Rosenberg *et al.*, 2015). A su vez, los macrófagos M1 se pueden convertir en macrófagos M2 por acción de los linfocitos T reguladores en músculo, los macrófagos M2 juegan un papel antiinflamatorio, promueven la fusión de mioblastos e hipertrofia de los miotúbulos (Schiaffino *et al.*, 2016).

Otras interleucinas son las liberadas por los eosinófilos como IL-4 e IL-13, las cuales, están implicadas en la regeneración muscular en condiciones normales, sin embargo en las enfermedades musculares crónicas los progenitores fibroadiposos (FAPs) se pueden diferenciar hacia fibroblastos y adipocitos, resultando en una pseudohipertrofia muscular (Schiaffino *et al.*, 2016).

A pesar de la activación de FAPs, durante la regeneración muscular participa la IL-10 producida por linfocitos TH2, la cual induce a macrófagos M2 a reparación tisular, ayudan a la diferenciación de las células satélite en el músculo persistentemente inflamado mediante el aumento de IL-1 β , TGF- β , IGF-1. Es importante destacar que los linfocitos T reguladores en músculo son activados y mediante IL-33 liberan anfiregulina (AREG), miembro de la familia de factores de crecimiento epidérmico (EGF), actuando directamente sobre la célula satélite e induciendo su diferenciación hacia miofibrillas (Schiaffino *et al.*, 2016).

b. PAPEL DE LOS LINFOCITOS T REGULADORES Y FOXP3 EN LA REGENERACIÓN MUSCULAR

Los linfocitos T reguladores constituyen una línea celular única con un papel relevante en el mantenimiento de la homeostasis y tolerancia inmunológica periférica, también se pueden diferenciar con capacidad supresora, permiten la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ a través del contacto célula-célula y por medio de citocinas como IL-10 y TGF- β (Huehn *et al.*, 2009).

En el timo se originan todas las líneas celulares T, éstas emigran a su vez hacia la periferia como linfocitos T sencillos CD45RA⁺, se activan y se pueden diferenciar hacia los subtipos de linfocitos T convencionales o linfocitos T reguladores. Los linfocitos T convencionales expresan CD45R⁺ y CD127⁺ que pueden diferenciarse hacia células de memoria, las

cuales presentan niveles bajos de FOXP3, HLA-DR⁺, CTLA4, CD69, IL2 y niveles altos de CD25. Los linfocitos T sencillos diferenciados hacia linfocitos T reguladores, expresan CD45R⁺, niveles bajos de FOXP3, altos de CD25; estos últimos linfocitos T reguladores se pueden diferenciar hacia linfocitos T reguladores efectores o efectores terminales, ambos con elevada expresión de FOXP3 y CD25. Por lo tanto, el linaje de los linfocitos T reguladores más comúnmente conocido es el CD4⁺CD25^{alto}FOXP3⁺ quienes tienen un papel directo en la regeneración muscular. Se ha considerado que FOXP3 es un marcador fenotípico de linfocitos T CD4⁺ reguladores en sangre periférica (Sakaguchi *et al.*, 2016).

FOXP3 es un factor de transcripción maestro determinante del linaje celular del subtipo CD4⁺CD25^{alto}FOXP3⁺ de linfocitos T reguladores, se expresa de manera constitutiva y es un factor decisivo en la función inmunosupresora del subtipo de linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ tanto en humanos como en ratones. (Tao *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que FOXP3 se requiere para el desarrollo de linfocitos T CD4⁺CD25⁺ en timo y que también le confiere función supresora. Esta propuesta se ha demostrado en el estudio de Fontenot y col. en el 2003 quienes revelaron que los niveles de expresión de *Foxp3* en ratones se incrementa 40 veces en linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺ aislados y detectaron niveles muy bajos de mRNA de *Foxp3* en linfocitos T CD4⁺CD25^{negativos}; estos hallazgos sugirieron que los linfocitos T CD4⁺CD25^{negativos} son menos potentes al tener menor función supresora y menor bloqueo de la proliferación homeostática de linfocitos T CD8⁺ activados. Por otro lado, el aumento de la expresión de *Foxp3* en linfocitos T CD4⁺CD25⁺ activados se relaciona con un aumento en la actividad supresora sobre el ligando del receptor de células T (TCR). Estos datos sugieren una relación estrecha entre la señalización de TCR y el nivel de expresión de *Foxp3*, además de ser un regulador maestro en el desarrollo de linfocitos T CD4⁺CD25⁺ y ser suficiente para activar la capacidad supresora durante la migración al músculo dañado (Fontenot *et al.*, 2003).

En resumen, la expresión constitutiva de FOXP3 es un factor decisivo en la función inmunosupresora de los linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺ tanto en humanos como en ratones. FOXP3 determina el número y función de los linfocitos T reguladores y mantiene el equilibrio inmunológico normal a través de la regulación a nivel de gen y de proteína (Sakaguchi *et al.*, 2016).

Los linfocitos T CD4⁺ reguladores efectores y efectores terminales circulantes llegan al sitio de la lesión para reparar el tejido. En el caso del músculo esquelético con daño agudo o

crónico, los linfocitos T reguladores expresan niveles altos de *FOXP3* y *CD25*; lo cual les confiere una función supresora y un papel importante en la regeneración muscular. Burzyn y col. en el 2013 sugieren que los linfocitos T reguladores restringen el desarrollo de una respuesta inflamatoria en el músculo, en su estudio observaron un aumento de linfocitos T reguladores en músculos de pacientes con DMD y en ratones *mdx*; no así en músculos sin lesión. De acuerdo a esto, encontraron niveles altos de IL-10 sugiriendo que la respuesta supresora de linfocitos T reguladores depende de esta citocina, ya que al suprimir IL-10 en ratones *mdx* incrementa la severidad de la distrofia muscular. Apoyando esta evidencia, en el mismo estudio observaron que la disminución de linfocitos T reguladores en ratones *mdx* impide la infiltración celular, aumenta la lesión muscular y la expresión de IFN- γ por los linfocitos T convencionales. (Burzyn *et al.*, 2013).

Las acciones moleculares de los linfocitos T reguladores sugieren que su función va más allá de ser simples reguladores de la inmunidad, o simples reparadores y remodeladores de tejidos. Esta propuesta se basa en el estudio de Burzyn y col. en el 2013 quienes demostraron que los linfocitos T reguladores de músculo expresan un factor de crecimiento como la anfiregulina que también tiene un papel en la regeneración muscular, posiblemente mediante la promoción directa de la diferenciación de células satélite.

La anfiregulina también conocida como AREG, es liberada por linfocitos T reguladores del músculo por medio de IL-33 para actuar directamente en la célula satélite promoviendo la regeneración muscular (Schiaffino *et al.*, 2016). Recientemente se informó que AREG también podría controlar a los linfocitos T reguladores directamente y mejorar su capacidad para suprimir la respuesta inmune (Burzyn *et al.*, 2013). Burzyn y col. reportaron que los linfocitos T reguladores de músculo expresan AREG, y que al agregar AREG exógena al músculo dañado se mejora la regeneración muscular, posiblemente promoviendo la diferenciación de las células satélite. También se conoce que el IFN- γ puede inhibir directamente la proliferación de mioblastos a través de AREG y al mismo tiempo, los linfocitos T reguladores pueden actuar sobre IFN- γ inhibiendo la actividad anti-miogénica y permitiendo la regeneración de la miofibrilla (Burzyn *et al.*, 2013).

c. PAPEL DE LOS AGPIO3 SOBRE LOS LINFOCITOS T REGULADORES Y FOXP3

En relación al efecto de los AGPIO3 sobre *FOXP3*, se ha mostrado un aumento en la generación de linfocitos T $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ reguladores (Iwami *et al.*, 2011), sin embargo el efecto de DHA es dosis dependiente por lo que una concentración de 100 $\mu\text{mol/L}$ es suficiente para revertir el efecto supresor de los linfocitos T reguladores. Por otro

lado, se ha demostrado que el tratamiento con DHA *in vitro* e *in vivo* en ratones aumenta la expresión del mRNA de *FOXP3*, *CTLA-4* y *TGF-β* (Issazadeh *et al.*, 2012). En relación al efecto de los AGPIO3 sobre linfocitos T reguladores se ha mostrado un aumento en esta población y secundariamente una supervivencia del injerto en un modelo de trasplante murino al inyectar EPA intraperitoneal (Iwami *et al.*, 2011).

Actualmente no existen datos en la literatura que establezcan la expresión de *FOXP3* y *AREG* en la DMD posterior al tratamiento con AGPIO3 ya que no se han realizado estudios en humanos.

d. PAPEL DE LOS AGPIO3 SOBRE LA DMD

Es conocido que en humanos y animales las dietas ricas en EPA y DHA disminuyen la generación de productos proinflamatorios derivados del ácido araquidónico como la prostaglandina E2, tromboxano A2 y leucotrieno B4; así mismo el EPA inhibe la producción de citocinas proinflamatorias como IL-2, IL-12 e IFN-γ (Valenzuela *et al.*, 2011). Hasta el momento existen estudios publicados por nuestro grupo que demuestran el impacto de los AGPIO3 sobre la inflamación crónica en los pacientes con DMD. Sin embargo, la mayor parte de la evidencia está demostrada en ratones *mdx* (modelo de la DMD).

i. Estudios en animales

Fogagnolo y col., en el 2012 evaluaron el efecto del tratamiento combinado de EPA y DHA en el músculo de ratones *mdx*, los resultados demostraron un aumento de 4 veces los niveles séricos de creatininfosfocinasa en ratones no tratados; por el contrario se reportó una disminución del 40% de creatininfosfocinasa en ratones *mdx* tratados con estos ácidos grasos. Se encontró que los ratones tratados presentaban una reducción en los niveles de TNF-α, estos resultados sugieren que EPA y DHA promueven la estabilidad del sarcolema y aumentan el flujo normal de calcio en la fibra posiblemente mediante la incorporación de DHA a la membrana. En estos estudios, se concluye que los AGPIO3 reducen significativamente el área de inflamación y protegen contra la necrosis en las fibras musculares (Fogagnolo *et al.*, 2012).

Otro estudio reportó el efecto del tratamiento aislado con EPA en músculos de ratones *mdx* mostrando una reducción significativa de la expresión de TNF-α, los mecanismos implicados aún no se conocen con precisión, sin embargo se propone un bloqueo de la transcripción de TNF-α. Así mismo, de acuerdo a estos resultados, se postula que el EPA ejerce un efecto protector en la fibra en degeneración mediante una acción supresora de

mediadores inflamatorios eicosanoides en el metabolismo del ácido araquidónico ayudando a la reducción del daño en fibras musculares distróficas (Ventura *et al.*, 2010).

Montanholi y col. en el 2015 demostraron que el tratamiento tanto a corto como a largo plazo de AGPIO3 es efectivo para disminuir los niveles de NF- κ B y TNF- α , además de aumentar los niveles de MyoD en músculos distróficos de ratones; dando como resultado una protección contra la mionecrosis e incremento en la regeneración muscular en etapas tardías de la enfermedad.

e. RESULTADOS PREVIOS

Estudios previos realizados por nuestro grupo han demostrado la asociación entre el nivel de inflamación sistémica de niños con DMD y la función muscular de los mismos. Los resultados de este estudio mostraron que las citocinas proinflamatorias (IL-1 y TNF- α) circulantes de pacientes con una edad promedio de 13.43 ± 1.70 años se encuentran disminuidas y presentan una menor función muscular; en cambio, aquellos pacientes con un promedio de edad de 8.04 ± 2.08 años tienen mayor concentración de citocinas proinflamatorias, muestran mejor función muscular y presentan deambulación independiente (Rodríguez-Cruz, *et al.*, 2015). Esto sugiere que hay una elevación de las citocinas en circulación cuando las fibras musculares de pacientes menores de 8 años con DMD se dañan.

En un segundo estudio, nuestro grupo evaluó el papel de DHA y EPA sobre marcadores circulantes de inflamación en pacientes con DMD. En este ensayo los pacientes se suplementaron con 2.9 g/dl de AGPIO3 (aceite de pescado) y con 2.9 g/dl de aceite de girasol como placebo durante 6 meses, se midió la expresión del mRNA de NF- κ B, IL-1 β , IL-6 y TNF- α en leucocitos circulantes durante el mes 1, 2, 3, y 6 en ambos grupos. Los resultados de este estudio detectaron una reducción importante en la expresión de un panel clásico de genes de inflamación, mostraron una disminución significativa ($p < 0.05$) del transcrito de NF- κ B durante el mes 2, 3 y 6, también se encontró una disminución importante ($p < 0.05$) del mRNA de IL-6 en los meses 2, 3 y 6 de suplementación y del mRNA de IL-1 β en el mes 3 y 6 en comparación con el grupo de pacientes suplementados con placebo. La expresión del mRNA de TNF- α no se modificó en ninguno de los dos grupos.

Por el contrario, en el mismo estudio se observó un incremento significativo de la citocina antiinflamatoria IL-10 en circulación durante el mes 3 ($p = 0.012$) y 6 ($p < 0.005$) de suplementación con EPA y DHA comparado con los pacientes que recibieron placebo. Estas evidencias sugieren que los AGPIO3 inhiben a NF- κ B posiblemente mediante el

mecanismo ya conocido que resulta en la disminución de la fosforilación de I κ B (factor inhibidor de NF- κ B); de esta manera evita la migración de NF- κ B hacia el núcleo, bloquea la transcripción y a su vez la unión a la región promotora de ciertas citocinas proinflamatorias como IL-1 e IL-6 (Rodríguez-Cruz *et al.*, 2017).

2. JUSTIFICACIÓN

La distrofia muscular de Duchenne afecta a uno por cada 3500 varones, los pacientes cursan con pérdida progresiva de la fuerza muscular lo que conlleva a una disminución en la esperanza de vida. Hasta el momento no existe una terapia efectiva para tratar la enfermedad y aunque los glucocorticoides ayudan a retrasar la pérdida de la ambulación y mejoran la función muscular tienen varios efectos secundarios adversos que deterioran la calidad de vida del paciente. Estos efectos han dado lugar al interés reciente en el desarrollo de terapias que no sólo mitiguen la inflamación muscular, sino que también puedan activar la regeneración del músculo. Tal es el caso de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3, los cuales han sido ampliamente estudiados por su efecto antiinflamatorio. Se ha demostrado su papel en pacientes con DMD al disminuir significativamente algunas citocinas proinflamatorias en comparación con un grupo suplementado con placebo. También existe una evidencia en la literatura sobre el efecto positivo de DHA en el aumento del transcrito *FOXP3*, lo cual es relevante ya que podrían aumentar la generación de linfocitos T reguladores en sangre; los cuales una vez activados migran al músculo con función antiinflamatoria. El aumento en el número de linfocitos T reguladores promueve la liberación de AREG, misma que actúa directamente en la célula satélite ayudando a su diferenciación hacia mioblastos; de esta manera se estaría contribuyendo de forma indirecta a la regeneración muscular en los pacientes con DMD.

Por lo anterior, los AGPIO3 podrían tener un potencial terapéutico en la DMD; por un lado ayudando a disminuir el entorno inflamatorio del músculo y por otro promoviendo la regeneración muscular indirectamente. Esta evidencia permitirá aportar conocimiento acerca de los AGPIO3 como alternativa terapéutica en los pacientes con DMD. Nuestro estudio previo demuestra el papel antiinflamatorio de los ácidos grasos en la DMD, sin embargo, no se conoce el mecanismo, por lo que resulta necesario conocer si el incremento en la expresión de *FOXP3* y *AREG* podría ser uno de los mecanismos mediante el cual los AGPIO3 podrían incrementar la regeneración muscular en pacientes con DMD. Además, se espera un beneficio en la disminución de la debilidad muscular, reducción en la progresión de la enfermedad y mejora en la calidad de vida.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es sabido que el proceso inflamatorio tiene una participación importante en la fisiopatología de la DMD. Por otro lado, existe suficiente evidencia científica que la suplementación con AGPIO3 disminuye las moléculas circulantes con acción proinflamatoria. Además, se conoce que el aumento en el nivel de expresión de *FOXP3* promueve la proliferación de linfocitos T reguladores, sin embargo, aún no existen datos sobre la expresión de los transcritos de *FOXP3* y *AREG* en linfocitos circulantes, moléculas que colaboran a la activación de la regeneración muscular normal y en niños con DMD; es por ello que surge la siguiente pregunta de investigación.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el impacto de la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (EPA y DHA) durante 6 meses sobre el nivel de expresión de *FOXP3* y *AREG* como marcadores indirectos de regeneración muscular en niños con Distrofia Muscular de Duchenne?

5. HIPÓTESIS

La suplementación con ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (EPA y DHA) incrementará el nivel de expresión de *FOXP3* al aumentar la actividad supresora de linfocitos T reguladores, los cuales a su vez aumentarán el nivel de expresión de *AREG* y de forma indirecta se activará la regeneración resultando en la mejoría de la función muscular en niños con DMD.

***Proponemos la dirección de esta hipótesis con base a los resultados de dos artículos de la literatura internacional dado que aún no existen trabajos publicados que informen resultados acerca del impacto de la suplementación de ácidos grasos en pacientes con distrofia muscular de Duchenne sobre *FOXP3* y *AREG*, sólo existen datos publicados en modelos animales.

1. Issazadeh-Navikas S, Teimer R, Bockermann R. Influence of dietary components on regulatory T cells. *MOL MED*.2012;18:95-110.
2. Iwami D, Nonomura K, Shirasugi N, Niimi M. Immunomodulatory effects of eicosapentaenoic acid through induction of regulatory T cells. *International Immunopharmacology*. 2011;11:384-389.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar el impacto de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 sobre el nivel de expresión de *FOXP3* y *AREG* como marcadores de linfocitos T reguladores circulantes que participan en la regeneración muscular de pacientes con DMD.

a. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la suplementación con AGPIO3 (EPA y DHA) durante 6 meses sobre la expresión de *FOXP3* como marcador de linfocitos T reguladores en sangre periférica en niños con diagnóstico de DMD.
2. Analizar el efecto de la suplementación con AGPIO3 (EPA y DHA) durante 6 meses sobre la expresión de *AREG* de linfocitos T reguladores circulantes en niños con diagnóstico de DMD.
3. Evaluar el efecto de la suplementación con AGPIO3 (EPA y DHA) durante 6 meses sobre la función muscular mediante la escala de Vignos.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

- a. **DISEÑO DEL ESTUDIO:** Ensayo clínico controlado, aleatorizado y doble ciego.

- b. **LUGAR DEL ESTUDIO:** Laboratorio de Nutrición Molecular, Unidad de Investigación Médica en Nutrición de la UMAE Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional siglo XXI, IMSS.

- c. **POBLACIÓN DE ESTUDIO:** Niños de 3 a 8 años de edad con diagnóstico clínico y molecular de DMD de la UMAE Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional siglo XXI, IMSS.

- d. **CRITERIOS DE SELECCIÓN:**
 - i. **Criterios de inclusión:** Niños de 3 a 8 años de edad con diagnóstico clínico y molecular de DMD que no hayan recibido tratamiento con glucocorticoides, que no consuman suplementos alimenticios ricos en EPA y/o DHA, que hayan manifestado su asentimiento al protocolo y que los padres o tutores también hayan aceptado participar en el protocolo firmando la carta de consentimiento informado solicitada por la investigadora responsable y/o alumna de la presente tesis (Anexo 1).
 - ii. **Criterios de eliminación:** Pacientes que hayan presentado reacciones alérgicas (enrojecimiento de la piel, comezón, vómito, hinchazón de cara, ojos, labios, lengua o faringe) a los componentes del pescado, que no hayan asistido a una cita, aquellos pacientes que fueron incluidos inicialmente y que posterior a la firma del consentimiento hayan decidido retirarse del protocolo o que hayan mostrado un apego de la suplementación menor al 80%, que hayan abandonado el estudio y si desarrollaron alguna complicación propia de la enfermedad que impida su participación en el protocolo.

- e. **TIPO DE MUESTREO:** no probabilístico de casos consecutivos que hayan reunido los criterios de inclusión.

f. TAMAÑO DE LA MUESTRA:

Debido a que no existen estudios a nivel internacional de pacientes con distrofia muscular de Duchenne suplementados con AGPIO3, para el cálculo del tamaño de la muestra se utilizaron datos de un estudio previo realizado por el grupo de investigación: Rodríguez-Cruz M, *et al.* Potential therapeutic impact of omega-3 long chain-polyunsaturated fatty acids on inflammation markers in Duchenne muscular dystrophy: A double-blind, controlled randomized trial, *Clinical Nutrition*, 2017:1-12.

El tamaño de la muestra se calculó utilizando la fórmula de diferencia de medias. La variable considerada fue el porcentaje de cambio de la concentración (basal – mes 6) en circulación de la citocina antiinflamatoria IL-10 en el grupo suplementado con AGPIO3 con una media de 108.85 pg/ml, desviación estándar de 173.88; o del grupo placebo que tuvo una media de -41.21pg/ml y desviación estándar de 52.6. El tamaño de la muestra calculado fue de 12 pacientes por cada grupo (suplementación y placebo). Considerando una pérdida del 20% (3 pacientes por grupo) durante los 6 meses de suplementación, el tamaño de muestra resultó en 15 pacientes por grupo.

Tamaño de la muestra para comparar dos medias			
Información de entrada			
Intervalo de confianza (2 lados)		95%	
Potencia		80%	
Razón del tamaño de la muestra (Grupo2/ Grupo 1)		1	
	Grupo 1	Grupo 2	Diferencia *
Media	108.85	-41.21	150.06
Desviación estándar	173.88	52.6	
Tamaño de muestra del grupo 1	12		
Tamaño de muestra del grupo 2		12	
Tamaño total de la muestra		24	
Diferencia entre media			

Al año se reciben alrededor de 3 - 4 pacientes con DMD en la UMAE Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional siglo XXI, por lo que contamos con 33 pacientes candidatos, referidos y evaluados por los servicios de genética y neurología pediátrica durante el periodo comprendido del 2007-2017, con edades de 3 a 8 años, quienes fueron diagnosticados clínica y bioquímicamente, además de contar con el diagnóstico molecular de distrofia muscular de Duchenne. Las pérdidas y abandonos se representan en el *Consort* descrito más adelante. Se seleccionaron a los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y se les invitó a participar en el protocolo con el asentimiento del paciente y la autorización del consentimiento por los padres o tutores para reunir el tamaño de muestra correspondiente.

g. DEFINICIÓN DE VARIABLES DE INTERÉS:

Variable independiente	Definición conceptual	Definición operacional	Clasificación	Escalas de medición
Suplementación de AGPIO3 (EPA y DHA)	Ácidos grasos poliinsaturados omega 3 de cadena larga con varios dobles enlaces, sin embargo, el primer doble enlace se encuentra en el tercer carbono del extremo metilo de la cadena de carbono	Se cuantificó la proporción de AGPIO3 (EPA y DHA) inicialmente y durante la suplementación en los eritrocitos como un indicador en los tejidos.	Cualitativa dicotómica	0 = placebo 1 = AGPIO3

Variable dependiente	Definición conceptual	Definición operacional	Clasificación	Unidades de medición
Expresión de <i>FOXP3</i>	<i>FOXP3</i> es un factor de transcripción maestro determinante del linaje celular del subtipo CD4 ⁺ CD25 ^{high} FOXP3 ⁺ de linfocitos T reguladores circulantes, se expresa de manera constitutiva y es un factor decisivo en la función inmunosupresora de los linfocitos T reguladores	Se midió el nivel de expresión del mRNA de <i>FOXP3</i> de linfocitos T reguladores circulantes	Cuantitativa	Unidades relativas de expresión
Expresión de <i>AREG</i>	Miembro de la familia de factores de crecimiento epidérmico (EGF), promueve la regeneración actuando directamente sobre las células satélite del músculo	Se midió el nivel de expresión del mRNA de <i>AREG</i> circulante como marcador indirecto de regeneración muscular	Cuantitativa	Unidades relativas de expresión
Escalas de función muscular	La función principal del músculo estriado es la contracción y relajación de las miofibrillas para la realización de cualquier movimiento.	Se evaluó mediante tres sistemas: el sistema de clasificación de la función motora gruesa	Cuantitativa discreta	Sistema de clasificación de la función motora gruesa: Nivel 1-5

		en niveles, un sistema de clasificación en la escala de Brooke y un sistema de clasificación en escala de Vignos		<p>Escala de Brooke: 1-6</p> <p>Escala de Vignos: 1-10</p>
Escala de fuerza muscular	La fuerza muscular es la expresión de la tensión muscular transmitida al hueso a través del tendón	Se evaluó mediante un sistema de puntuación en grados (MRC: Medical Research Council).	Cuantitativa discreta	Grados: 5, 5-, 4+, 4, 4-, 3+, 3, 3-, 2, 1, 0.
Proporción de AGPIO3 en eritrocitos	Es la cantidad de AGPIO3 que se encuentran en eritrocitos como indicador de reservas tisulares	Se cuantificó mediante cromatografía de gases	Cuantitativa continua	Porcentaje de ácidos grasos totales

h. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

i. Procedimiento:

Se invitó a participar a los padres o tutores y a los pacientes de 3 a 8 años de edad con el diagnóstico molecular confirmado de DMD del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS. Los padres o tutores firmaron una carta de consentimiento informado (anexo 1) para otorgar su autorización por escrito y los niños de 8 años también firmaron una carta de asentimiento (anexo 2), ambas solicitadas por la alumna de la presente tesis y/o la investigadora encargada. Los pacientes que participaron en el estudio se incluyeron en un proceso de aleatorización utilizando el programa Random Allocation

(Saghaei, 2004), de manera que los participantes se asignaron al azar en dos grupos de comparación. Uno de los grupos ($n=17$) recibió el suplemento con EPA y DHA (2.9 g/dl de aceite de pescado en cápsulas) de acuerdo a lo reportado sobre el beneficio en procesos inflamatorios y a los niveles máximos seguros recomendados por la Food and Drug Administration (FDA) en niños, el segundo grupo ($n=13$) recibió un placebo (2.9 g/dl de aceite de girasol en cápsulas) ambos durante 6 meses. El día de la primera cita, el paciente acudió en ayuno al laboratorio y se le tomó una muestra de sangre periférica de 5 ml aproximadamente por venopunción para caracterizar la expresión basal de *FOXP3* en linfocitos T reguladores, además de la expresión de *AREG* como marcador indirecto de regeneración muscular. También se cuantificó la proporción de EPA y DHA en los eritrocitos antes de la suplementación y durante los 6 meses de suplementación como indicador de AGPIO3 en los tejidos.

Posterior a la toma de muestra basal se inició la suplementación mensual con AGPIO3 y se les indicó a los padres o tutores que debían acudir al laboratorio con los pacientes en los meses 1, 2, 3, 4, 5 y 6 para tomar una nueva muestra sanguínea y conocer la expresión de los transcritos *FOXP3* y *AREG* en cada mes. También en cada una de las citas se proporcionó la cantidad de cápsulas suficientes con el suplemento o placebo para un mes; el padre o tutor debe supervisar al paciente en el consumo diario de las cápsulas.

Finalmente, se les aplicó un cuestionario de recordatorio de alimentos de 24 horas (anexo 3) para la evaluación de la ingesta de alimentos y se les proporcionó asesoría nutricia ya que más del 50% de los pacientes pueden desarrollar sobrepeso u obesidad (Rodríguez-Cruz M, *et al.* Evidence of insulin resistance and other metabolic alterations in boys with Duchenne or Becker muscular dystrophy. Hindawi Publishing Corporation. International Journal of Endocrinology, 2015:8).

ii. Evaluación de la función muscular

La evaluación de la función muscular en los pacientes con DMD se realizó antes de la suplementación y a los 3 y 6 meses después de la suplementación mediante escalas de evaluación clínica para pacientes con distrofia muscular de Duchenne, las cuales están contenidas en el Anexo 4: Sistema de clasificación de la función motora gruesa, Medical Research Council (MRC), escala de Vignos y Brooke y se evaluaron por la alumna de la presente tesis.

i. TÉCNICAS DE LABORATORIO

a. Diagnóstico molecular de DMD.

El diagnóstico molecular de los pacientes con diagnóstico clínico de DMD se realizó mediante la toma de muestra de sangre periférica en un tubo con EDTA como anticoagulante con capacidad de 5 ml BD Vacutainer®. A partir de la muestra sangre de total se extrajo el DNA y se analizó la detección de eliminaciones en el gen DMD mediante la prueba de PCR múltiple, los casos en los que no se identificó ninguna eliminación y tenían una alta sospecha clínica se enviaron a un laboratorio particular donde se realizó MLPA con la finalidad de obtener o descartar el diagnóstico de DMD, esta última prueba consiste en la detección simultánea de varias regiones genómicas que presentan distinto número de copias o dosis y se basa en la hibridación del DNA con una mezcla de sondas específicas para cada región cuya dosis se desea conocer.

b. Cuantificación de mRNA de *FOXP3* y *AREG*

La cuantificación de los transcritos *FOXP3* y *AREG* se efectuó por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real y fue realizada por la tesista Thania Ordaz Robles residente de genética médica, asesorada por la M en C. Judith Villa Morales.

c. Extracción de RNA total

Se realizó la extracción del RNA total como primer paso, la cual se describe a continuación. En un tubo Eppendorf se homogenizó la muestra con 1 ml de reactivo TRIzol, se dejó incubando a -70°C durante 24 horas y se mezcló suavemente con micropipeta. En la fase de separación se incubó la muestra homogenizada durante 15 minutos a temperatura ambiente después se agregó 200 µl de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos, posteriormente se incubó por 2 a 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 minutos a 4-8 °C. Luego de centrifugar la mezcla, se obtuvo una fase incolora superior que contiene exclusivamente RNA. Para la fase de precipitación, se transfirió la fase acuosa a un tubo Eppendorf nuevo y se agregó 0.5 mL de isopropanol posteriormente, el tubo se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos a 2-8 °C y se eliminó el sobrenadante. Por último, se secó a temperatura ambiente, se agregó agua libre de RNAsas y se disolvió por pipeteo.

Para la cuantificación de RNA total, se utilizó un espectrofotómetro (NanoDrop 3300, USA) usando 1 µL de muestra de RNA total concentrado y empleando como blanco agua

bidestilada. La absorbancia de las muestras de RNA total se leyeron a una longitud de onda de 260 nm. Adicionalmente, se determinó la pureza mediante la relación 260/280 proporcionada por el equipo. Valores de 1.7-2.0 de la relación 260/280 son aceptables. El equipo realizó la cuantificación de RNA mediante la ecuación de Lambert-Beer:

$$C = (A * \epsilon) / b$$

Donde:

C= concentración de ácidos nucleicos en ng/μl.

A= absorbancia en unidades de absorbancia.

ε = coeficiente de extinción dependiente de la longitud de onda ng-cm/μl

d. Síntesis de cDNA

El cDNA se sintetizó partir de 2 μg de RNA total utilizando la transcriptasa reversa MMLV. El RNA total se pre-incubó con randomprimers y dNTPs (100 mM) a 65°C por 5 minutos. Posteriormente el producto se incubó con un buffer de reacción (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, y 15 mM MgCl₂) y DTT (0.1 M) a 37°C durante 2 minutos. Finalmente, la síntesis de cDNA se realizó con la transcriptasa reversa MMLV y agua grado biología molecular libre de RNAsas en un volumen final de 20 μL. La síntesis se realizó a 25°C por 10 minutos seguida de una incubación a 37°C durante 50 minutos y finalmente a 70°C por 15 minutos.

e. PCR en tiempo real

La cuantificación del mRNA de *FOXP3* y *AREG* se realizó mediante PCR en tiempo real y se utilizó a β- 2 microglobulina (*B2M*) como gen de normalización. El cDNA sintetizado se amplificó mediante la enzima DNA polimerasa del kit LightCyclerFastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche, Indianapolis, IN) con los *primers* diseñados que se muestran en la siguiente tabla:

Gen	Forward	Reverse
<i>FOXP3</i>	GGC GGA CCA TCT TCT GGA T	GCT GCT CCA GAG ACT GTA CCA TCT
<i>AREG</i>	ATG CTG CTG GAT TGG ACC TC	GTA GTC ATA GTC GGC TCC CG
Gen de referencia		
<i>B2M</i>	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Lightcycler Nano, Roche) para PCR en tiempo real, que mide continuamente la amplificación de productos de PCR en cada ciclo, usando *primers* comunes para PCR y el fluorocromo SYBR Green que se intercala en el surco menor de las hebras de doble cadena de DNA, emitiendo fluorescencia.

La amplificación se realizó en un volumen total de 20 μL conteniendo 2 μL de cDNA, 40 pmol de cada primer y 4 μL de Master^{PLUS} SYBR Green que contiene la enzima polimerasa FastStart, amortiguador para PCR, SYBR Green y MgCl_2 3.5 mM en capilares de borosilicato de 20 μl . Durante la reacción, la polimerasa se activa y el cDNA se desnaturalizó pre-incubando a 95°C durante 10 minutos. La amplificación se desarrolló durante 35 ciclos a 95°C por 10 segundos y un alineamiento 60°C por 7 segundos. La adquisición de la fluorescencia se realizó al terminar este ciclo de PCR.

Todas las reacciones se realizaron por duplicado. Para el análisis de la expresión se determinó el ciclo donde inició el aumento de la fluorescencia, denominado punto de corte (Cp, por las siglas en inglés de crossing point) o ciclo de umbral (Ct, por las siglas en inglés de threshold cycle), se determinó el Ct del gen de normalización, y se calculó el valor de $\Delta\Delta\text{Ct}$ en unidades relativas y el resultado final se reporta como $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

j. Apego de los pacientes a la suplementación

El apego a la suplementación se realizó por medio del método del conteo de cápsulas.

También se evaluó mediante la incorporación de EPA y DHA en los eritrocitos como un indicador de la presencia de los mismos en los tejidos. Si el paciente consume el suplemento con AGPIO3 hay un incremento en la proporción de EPA y DHA en los eritrocitos. Por lo que, para evaluar el apego de los pacientes a la suplementación se determinó el porcentaje de cambio de EPA y DHA en eritrocitos durante los 6 meses de suplementación con respecto al estado inicial.

Para conocer el porcentaje de EPA y DHA en los eritrocitos, se determinó el perfil de ácidos grasos obtenido por cromatografía de gases, descrita a continuación:

- i. Extracción de lípidos por el método de Folch modificado: Los eritrocitos obtenidos se lavaron tres veces con solución salina (0.9%) y se colocaron en tubos de vidrio COREX, posteriormente, los tubos se pesaron y se agregaron lentamente 10.5 ml

de una solución isopropano/hexano (4.5:6.0). Para evitar que las células se aglomeren, las muestras se mantuvieron en agitación con vórtex. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 1200 rpm por 4 minutos y la mezcla se transfirió en tubos previamente pesados y se evaporó en una corriente de nitrógeno. Estos tubos se pesaron nuevamente y se les agregó 900 µl de hexano para disolver la grasa extraída, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La solución de hexano se pasó a tubos previamente pesados, se evaporó con corriente de nitrógeno y se pesó una vez más. Se cuantificó la grasa extraída por diferencia de pesos, entre los tubos sin muestra y los tubos con la muestra evaporada. Esta grasa se utilizó para realizar la metilación de los ácidos grasos.

ii. Metilación de los ácidos grasos

- a. Los ácidos grasos son transformados en ésteres metílicos para volverlos volátiles, mediante un proceso conocido como cis-esterificación, esto con la finalidad de hacer factible el análisis cromatográfico.
- b. A la muestra de grasa extraída de eritrocitos se agregó 1 ml de HCl 3N y 500 µl de ácido margárico como estándar y la mezcla se incubó a 90°C durante 60 minutos. Posterior al calentamiento, los viales se enfriaron con agua corriente y se agregó 1 ml de solución de trifloruro de boro disuelto en metanol con una concentración al 14%, se agitó durante 30 segundos y se calentó en las mismas condiciones. Al término, se enfrió y se agregó 1 ml de isooctano y 4 ml de solución saturada de NaCl (130 g en 500 ml de agua), se agitó durante 2 minutos y se centrifugó a 2500 rpm a 4°C durante 10 minutos. Finalmente, la fase superior se transfirió a un vial previamente pesado, con tapa de rosca y se evaporó con corriente de nitrógeno. El vial se volvió a pesar, se diluyó hasta obtener una concentración de 1 mg/µl y se inyectó en el cromatógrafo de gases.

iii. Cromatografía de gases

- a. Los metil ésteres de ácidos grasos se separaron y cuantificaron en un cromatógrafo de gases con un autoinyector (Hewlett-Packard™ 5890 series I, Palo Alto US) unido a una columna capilar. Se utilizó una columna cromatográfica de sílica de 60 metros, con 0.25 mm de diámetro interno y 0.20 µm de grosor (J&W DB-225). El volumen de inyección fue de 1 µl y se usó

helio como gas acarreador con un flujo de 1.2 ml/min. La temperatura del inyector fue de 240°C, la del detector se ajustó a 270°C y el horno se programó inicialmente a 70°C, aumentando 30°C por minuto hasta alcanzar 175°C y luego incrementó a 1.2°C por minuto hasta llegar a 230°C, una vez que se alcanzó la temperatura se mantuvo así durante 5 minutos. La identificación de los ácidos grasos de las muestras se realizó con base a la comparación con el tiempo de retención de estándares de ácidos grasos purificados comerciales (Supelco™ 37 Component FAME Mix). En las muestras se identificaron los ácidos grasos y se integró su área para saber el porcentaje de ácido graso con base a la suma de las áreas de todos los ácidos grasos identificados.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó con el programa SPSS (v. 22.0). Se determinó la distribución de los datos con la prueba de Shapiro-Wilk. Se calculó el valor delta (final menos basal) de la expresión de transcritos de *FOXP3* y *AREG* y se comparó con la prueba *U* de Mann Whitney para muestras independientes. Para evaluar el efecto de la suplementación durante el tiempo se realizó un análisis de varianza de mediciones repetidas mediante el enfoque del modelo general de regresión lineal en el cual se consideró como variable independiente la expresión de transcritos. Los datos se expresan como porcentaje de cambio.

9. RESULTADOS

En este estudio se incluyeron 30 pacientes con diagnóstico clínico y molecular de distrofia muscular de Duchenne para determinar el nivel de expresión de *FOXP3* y *AREG*, se correlacionó con la función muscular y posteriormente se observó el efecto de la suplementación de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 sobre el transcrito de estas moléculas.

k. EXPRESIÓN DE *FOXP3* Y *AREG* EN LEUCOCITOS CIRCULANTES DE PACIENTES CON DMD

Los datos demográficos de los grupos de estudio menores y mayores de 6 años se muestran en la tabla 1. En los menores de 6 años se encontró que la edad, talla y peso corporal fueron significativamente ($p < 0.05$) menores en comparación con los niños mayores de 6 años. Sin embargo, el índice de masa corporal y la escala de Vignos fueron iguales en ambos grupos.

Tabla 1. Datos demográficos de los pacientes con DMD agrupados por edad.

	MENORES DE 6 AÑOS	MAYORES DE 6 AÑOS	P
Edad (años)	5.15 (3.0, 5.9)	7.9 (6.8, 8.9)	<0.001
Talla (cm)	100.68 ± 6.75	123.04 ± 7.67	<0.001
Peso (kg)	15.12 (11.7, 21.7)	22.42 (19.55, 58.20)	<0.001
IMC (percentil)	39.57 ± 28.93	54.52 ± 36.05	0.210
Vignos	2.0 (1.0, 3.0)	3.0 (1.0, 9.0)	0.227

Los datos se muestran como media ± DE o mediana y mínimo, máximo. *U* de Mann Whitney. IMC = Índice de masa corporal.

Los resultados en el gráfico 1 muestran que la expresión del transcrito *FOXP3* en leucocitos circulantes fue significativamente menor ($p = 0.0001$) en los niños mayores de 6 años que la observada en los niños menores de 6 años. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en el nivel de expresión de *AREG* entre los grupos de edad, como se representa en el gráfico 2, $n = 30$.

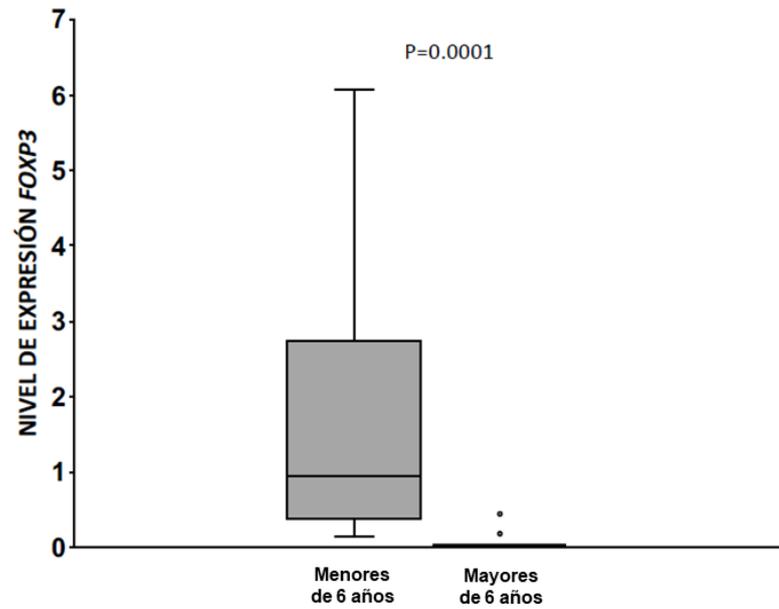


Gráfico 1. Expresión del mRNA de *FOXP3* en niños menores y mayores de 6 años de edad con distrofia muscular de Duchenne. *U* de Mann Whitney, $n = 30$.

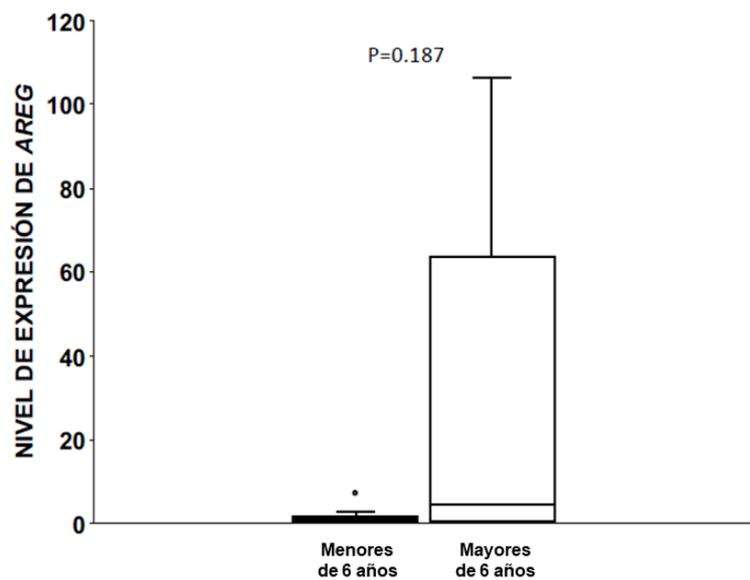


Gráfico 2. Expresión del mRNA de *AREG* en niños menores y mayores de 6 años de edad con distrofia muscular de Duchenne. *U* de Mann Whitney, $n = 30$.

I. CORRELACIÓN ENTRE LA FUNCIÓN MUSCULAR (ESCALA DE VIGNOS) Y EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE FOXP3 Y AREG EN PACIENTES CON DMD.

Se realizó un análisis de correlación entre la escala de Vignos que evalúa la función muscular y los niveles de expresión de *FOXP3* y *AREG* en los pacientes con DMD. Se observó una fuerte correlación positiva ($r = 0.534$, $p = 0.007$) indicando que a mayor pérdida de función muscular, incrementa el nivel de expresión de *FOXP3*; tal como se muestra en el gráfico 3. Sin embargo, en la expresión de *AREG* no se asoció con la función muscular ($r = 0.065$, $p = 0.773$).

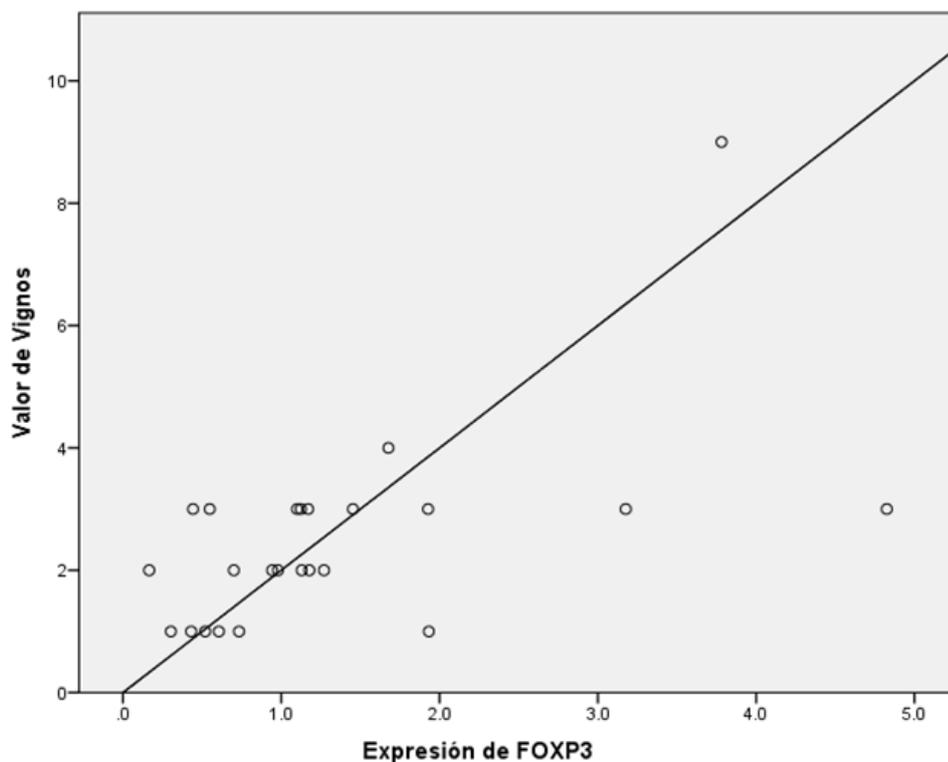


Gráfico 3. Análisis de correlación de Spearman entre el valor de la escala de Vignos y el nivel de expresión de *FOXP3*, $n = 30$.

Debido a que *FOXP3* influye a través de los linfocitos T reguladores $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ sobre la expresión de *AREG*, decidimos analizar si existe correlación entre ambos transcritos. En el gráfico 4 se observa la correlación entre el nivel de expresión de *FOXP3* y el de *AREG* en los pacientes con DMD. Los resultados muestran una correlación positiva ($r = 0.463$, $p = 0.046$), es decir, que a mayor expresión de *FOXP3* aumenta la expresión de *AREG*.

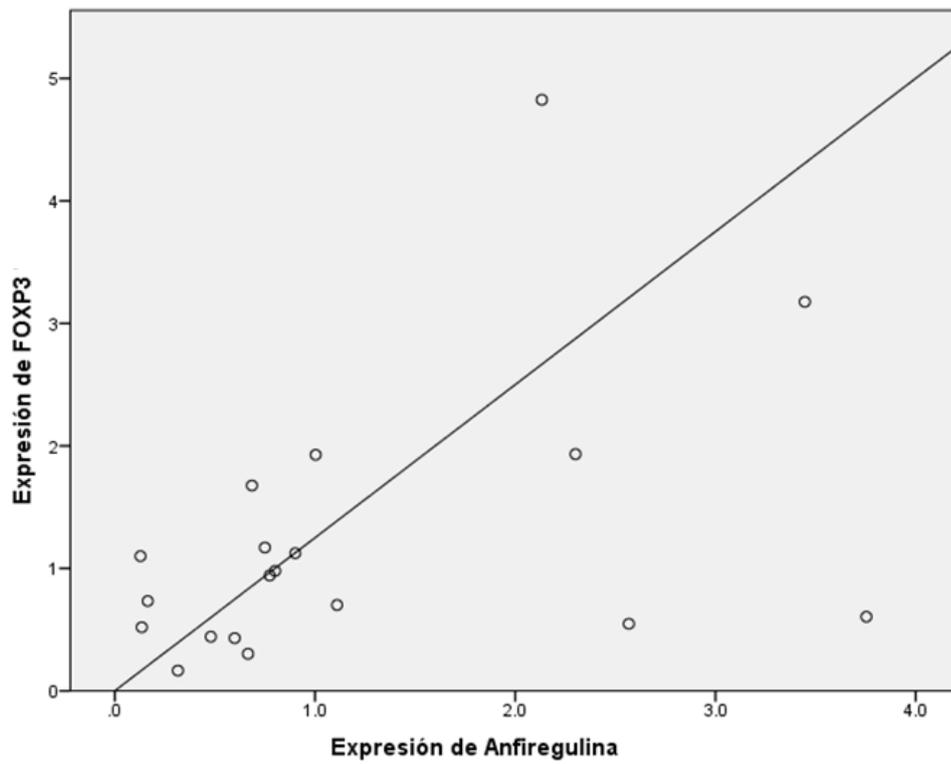


Gráfico 4. Análisis de correlación de Spearman entre el nivel de expresión de *FOXP3* y *AREG*, $n = 30$.

En este estudio contamos con una población elegible de 33 pacientes con diagnóstico clínica de sospecha de distrofia muscular de Duchenne, a quienes se les realizó estudio molecular y de los cuales 2 fueron negativos para la enfermedad; a su vez, un paciente decidió no participar en el estudio. Por lo que obtuvimos una muestra total de 30 pacientes, quienes se sometieron a aleatorización y resultaron 17 pacientes para el grupo suplementado con AGPIO3 y 13 pacientes correspondientes al grupo placebo. Todos los pacientes recibieron suplementación en ambos grupos y no presentamos pérdidas en seguimiento ni retiros voluntarios. De la misma forma, no se excluyó a ningún paciente del análisis estadístico. Lo anterior se demuestra en el diagrama de *Consort* (figura 1).

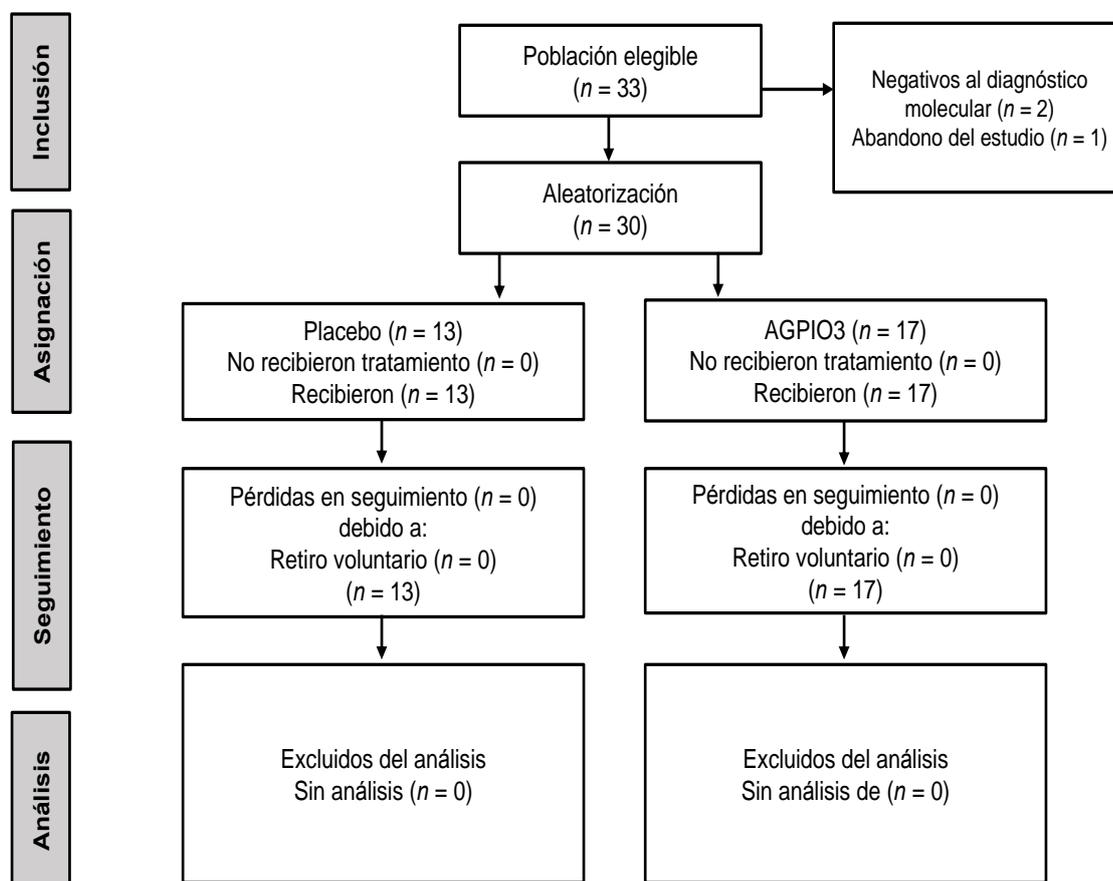


Figura 1. Diagrama de Consort de los pacientes con DMD en los grupos de suplementación

m. APEGO DE LOS PACIENTES A LA SUPLEMENTACIÓN

Para evaluar la incorporación de los AGPIO3 en los tejidos, se midió el porcentaje de cambio de EPA y DHA en eritrocitos durante los 6 meses de suplementación. Se muestra el contenido de EPA (gráfico 5) y DHA (gráfico 6) en eritrocitos contra placebo de los pacientes tratados en un tiempo inicial y durante los 6 meses. Los resultados muestran el incremento de EPA y DHA en los eritrocitos del grupo de pacientes que recibieron el suplemento con AGPIO3, este incremento no se observa en los pacientes que recibieron el placebo.

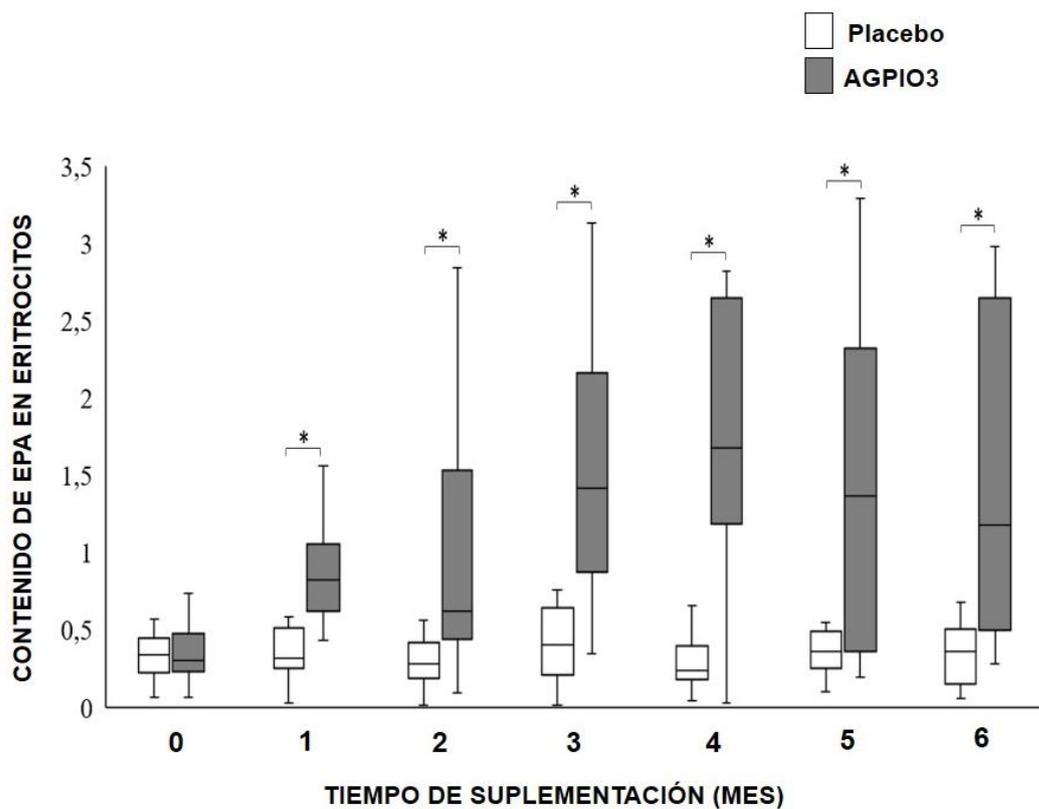


Gráfico 5. Porcentaje de cambio de EPA en eritrocitos contra placebo durante los 6 meses de suplementación. *U de Mann Whitney, Grupo suplementado con AGPIO3 $n = 17$, grupo placebo=13.

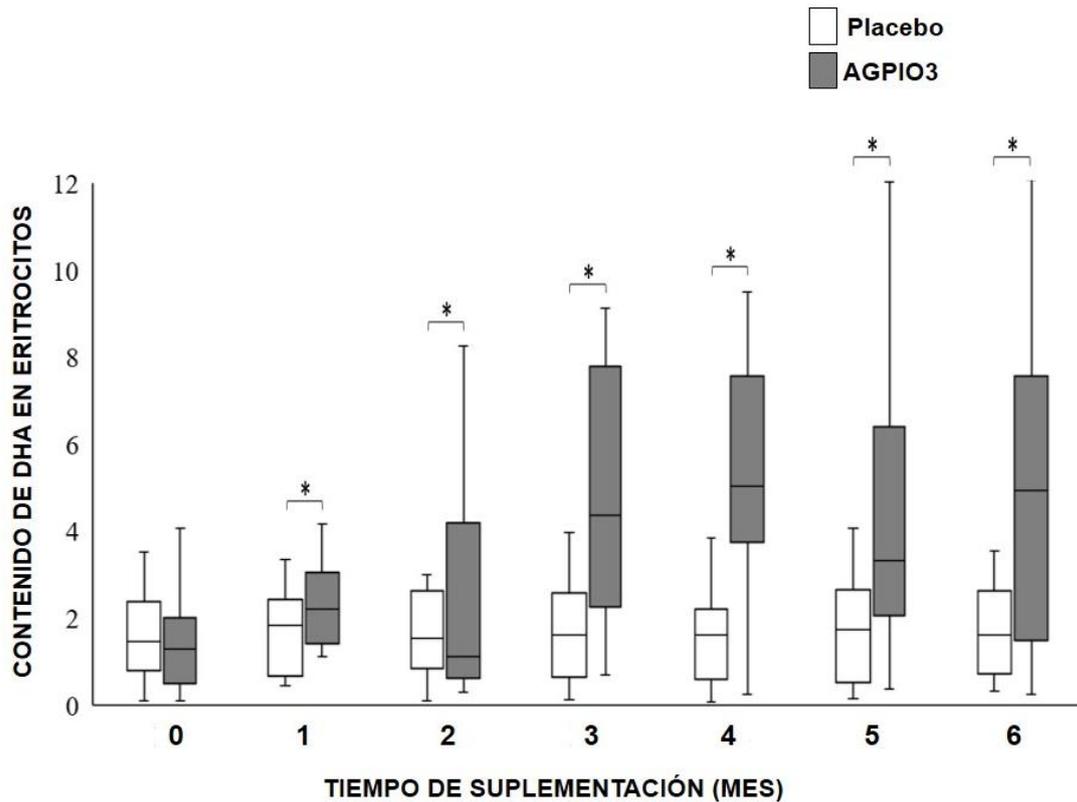


Gráfico 6. Porcentaje de cambio de DHA en eritrocitos contra placebo durante los 6 meses de suplementación. *U de Mann Whitney, $n = 30$. Grupo suplementado con AGPIO3 $n = 17$, grupo placebo=13.

n. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE AGPIO3 SOBRE EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE FOXP3 Y AREG

En la tabla 2 se muestran los datos demográficos antes de la suplementación en ambos grupos de estudio, AGPIO3 y grupo placebo. Los resultados muestran que la talla fue significativamente ($p < 0.05$) menor en el grupo suplementado con AGPIO3 en comparación con los pacientes del grupo placebo. Mientras que la edad, peso, índice de masa corporal y escala de Vignos fueron similares en ambos grupos.

Tabla 2. Datos demográficos de los pacientes con distrofia muscular de Duchenne antes de ser suplementados con los AGPIO3 o con placebo.

	ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS OMEGA 3 (AGPIO3)	PLACEBO	P
Edad (años)	5.58 ± 1.78	6.65 ± 1.67	0.093
Talla (cm)	103.75 (89.7, 132.0)	116.0 (93.3, 142)	0.028
Peso (kg)	18.07 ± 5.55	23.41 ± 11.55	0.099
IMC (percentil)	45.60 ± 30.69	43.21 ± 36.26	0.841
Vignos	2.3 ± 2.0	2.4 ± 2.31	0.808

Los datos se muestran como media ± DE o mediana y mínimo, máximo. *U* de Mann Whitney. IMC = Índice de masa corporal. Grupos de suplementación con AGPIO3 (*n* = 17) y placebo (*n* = 13).

El nivel de expresión de *FOXP3* se comparó en cada mes entre los dos grupos durante la suplementación. Los resultados muestran que existe una disminución significativa en la expresión de *FOXP3* en el mes 1 (*p* = 0.046) y tendencias a disminuir en los meses 2, 3, 4 y 6 del grupo suplementado con AGPIO3 en comparación con el grupo placebo, tal y como se observa en el gráfico 7.

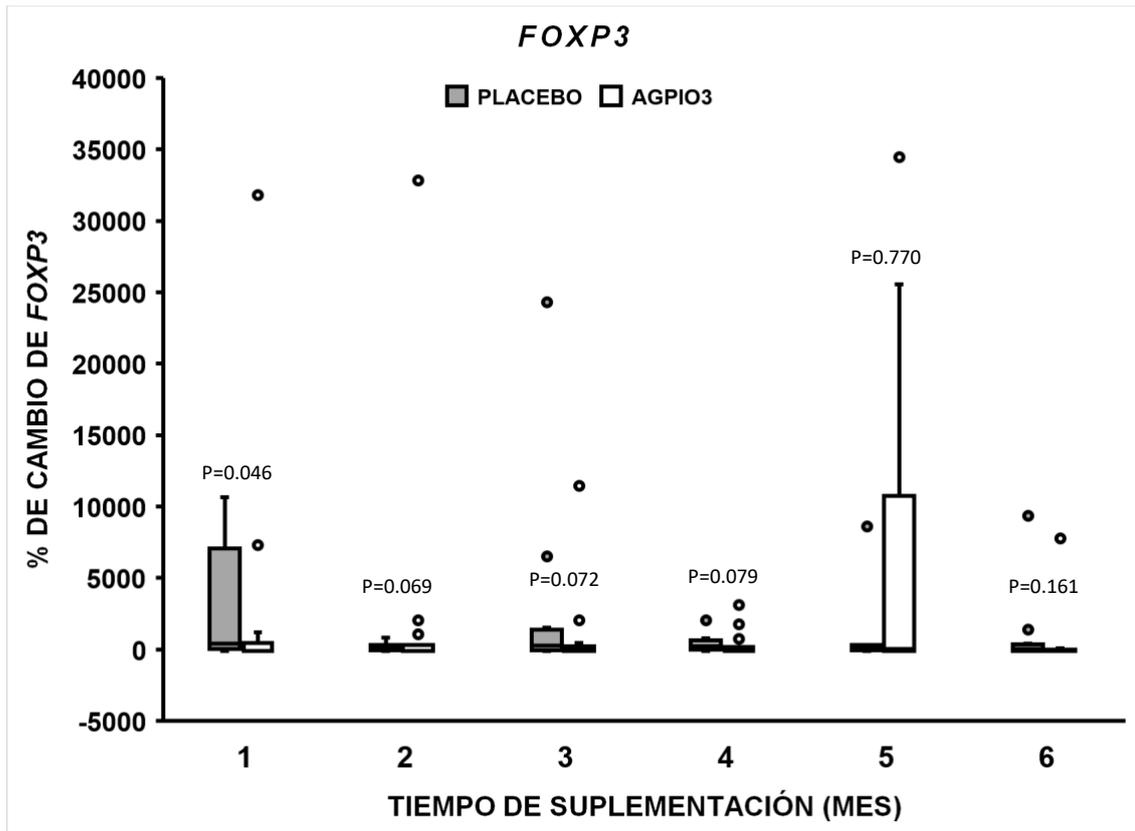


Gráfico 7. Expresión del mRNA de *FOXP3* durante los 6 meses de suplementación con AGPIO3 ($n = 17$) o placebo ($n = 13$) en pacientes con distrofia muscular de Duchenne. Prueba *U* de Mann Whitney.

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el nivel de expresión de *AREG* entre los grupos suplementados con AGPIO3 o placebo durante los 6 meses, tal y como se observa en el gráfico 8.

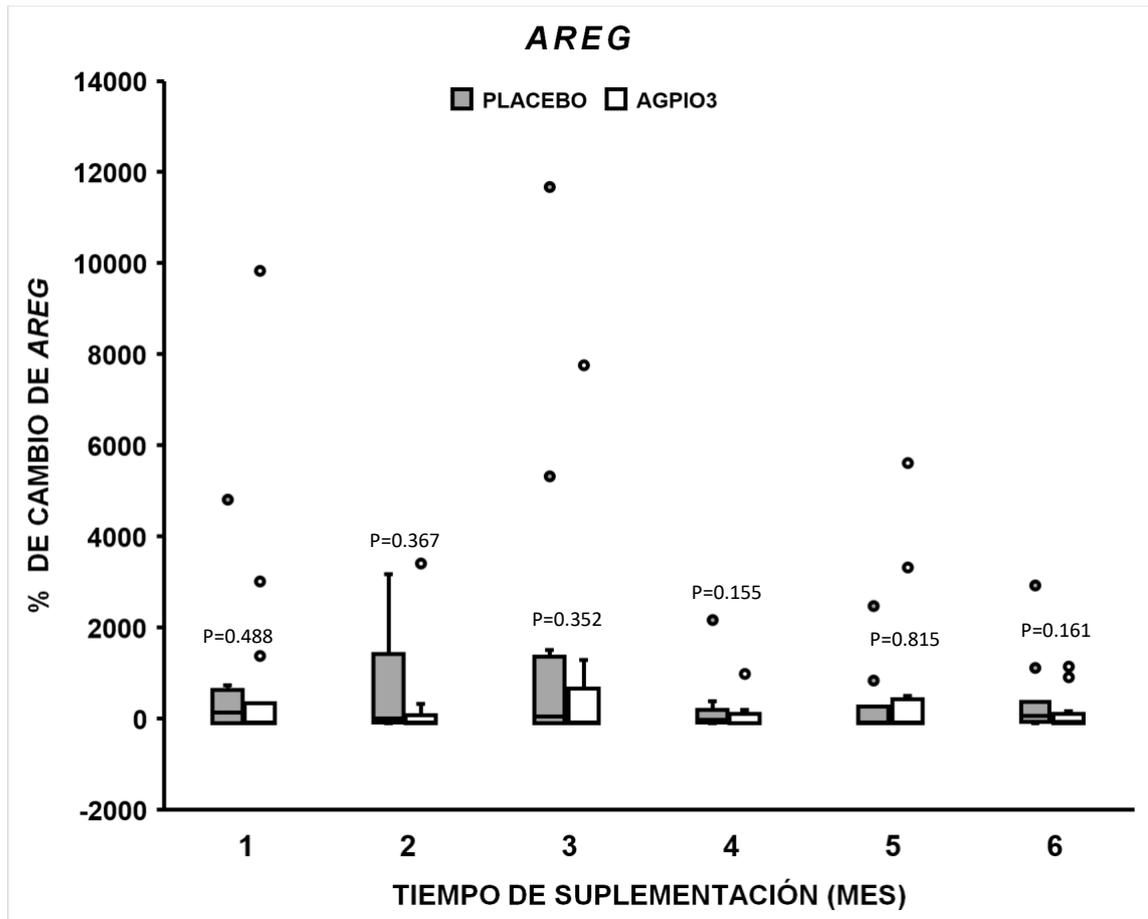


Gráfico 8. Expresión del mRNA de *AREG* durante los 6 meses de suplementación con AGPIO3 ($n = 17$) o placebo ($n = 13$) en pacientes con distrofia muscular de Duchenne. Prueba *U* de Mann Whitney.

o. CORRELACIÓN ENTRE LA ESCALA DE VIGNOS (FUNCIÓN MUSCULAR) Y LA EXPRESIÓN DE *FOXP3* Y *AREG* DE LOS GRUPOS DE SUPLEMENTACIÓN EN LOS MESES 3 Y 6.

Además, en este estudio se evaluó la correlación entre el nivel de expresión de *FOXP3* y *AREG* con la escala de Vignos en el mes 3 y mes 6. Los resultados demuestran una correlación negativa ($r = -0.515$, $p = 0.049$) entre la escala de Vignos que evalúa la función muscular con la expresión de *FOXP3* durante el mes 6 de suplementación en el grupo que recibió AGPIO3, representado en el gráfico 9. Estos resultados indican que a mayor puntaje de Vignos (menor función muscular) disminuye la expresión de *FOXP3* en el grupo suplementado con AGPIO3 en el mes 6 de suplementación. Aunque no se observó correlación entre la escala de Vignos y la expresión de *FOXP3* en el mes 3 de suplementación con AGPIO3 ($r = -0.179$, $p = 0.524$). De la misma forma, tampoco se

encontró correlación entre la escala de Vignos y la expresión de *AREG* en los meses 3 y 6 ($r = -0.190$, $p = 0.497$ y $r = 0.216$, $p = 0.440$ respectivamente).

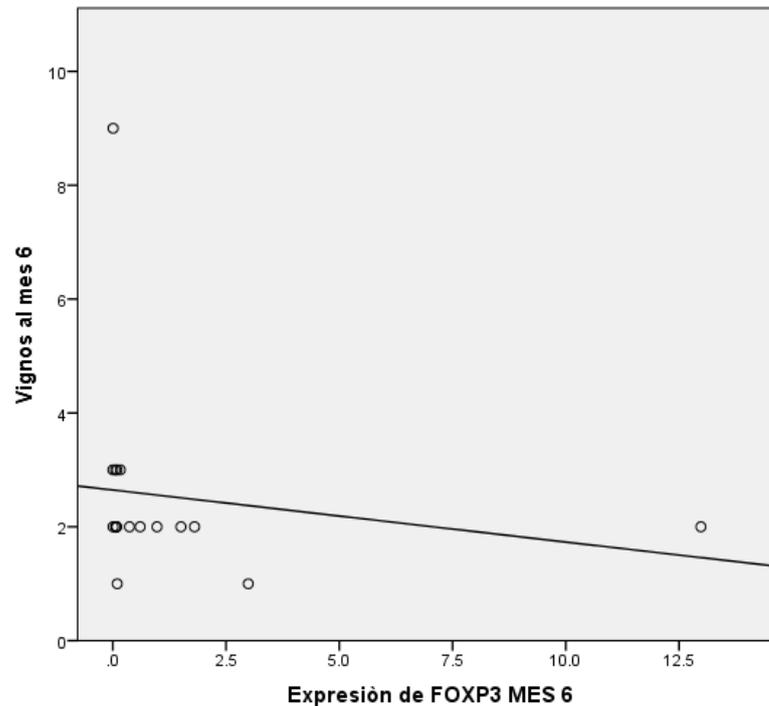


Gráfico 9. Análisis de correlación de Spearman entre la escala de Vignos (función muscular) con la expresión de *FOXP3* en el mes 6 de suplementación con AGPIO3, $n = 17$.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que en el grupo placebo no existe correlación entre la escala de función muscular de Vignos con la expresión de *FOXP3* en el mes 3 ($r = -0.213$, $p = 0.507$) y 6 ($r = -0.450$, $p = 0.142$) de suplementación. En el caso de la *AREG* tampoco se observó correlación en mes 3 ($r = -0.342$, $p = 0.277$) ni en el mes 6 ($r = -0.355$, $p = 0.258$) de suplementación.

10. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue conocer los niveles de expresión de *FOXP3* y *AREG* en niños menores y mayores de 6 años con distrofia muscular de Duchenne, se clasificaron en estas edades de acuerdo al estado de función muscular utilizando la escala de Vignos y con lo reportado por Rodríguez-Cruz y col. en el 2015; en donde, se agruparon en relación a la deambulación independiente, es decir, niños con mayor función muscular en un rango de 1 a 5 años, mientras que a los niños que presentaban deambulación asistida, mostraron una menor función muscular y se incluyeron en un rango de 6 a 8 años (Rodríguez-Cruz *et al.*, 2015). Posteriormente se analizó el impacto de la suplementación con AGPIO3 sobre el nivel de expresión de *FOXP3* y *AREG* como transcritos que participan en el proceso de regeneración del músculo distrófico (Burzyn *et al.*, 2013).

EXPRESIÓN DE *FOXP3* Y *AREG* EN LEUCOCITOS CIRCULANTES DE PACIENTES CON DMD CON Y SIN DEAMBULACIÓN ASISTIDA

El estado de inflamación es un proceso generalizado en el cual participan varias moléculas entre sí, por el contrario, la regeneración muscular es un proceso asincrónico y local que permite la interacción de diversos estados de la fibra muscular (Madaró *et al.*, 2014).

Nuestros resultados mostraron un aumento en los niveles de expresión de *FOXP3* en leucocitos circulantes en pacientes menores de 6 años. Estos hallazgos pueden asociarse a lo descrito por Madaró y col. en el 2014, quienes definen que el estado inflamatorio activo característico de la DMD se debe en parte a la migración de neutrófilos, eosinófilos, monocitos y linfocitos T de la sangre periférica a las fibras musculares dañadas, con aumento en la liberación de diferentes moléculas con acción proinflamatoria y antiinflamatoria. El incremento en las citocinas proinflamatorias de pacientes con DMD a edades tempranas y que presentan deambulación independiente; permiten asociar el estado inflamatorio con la función muscular (Rodríguez *et al.*, 2015). Nuestros resultados sugieren que en etapas iniciales de la enfermedad, los ciclos de degeneración-regeneración de las fibras musculares se encuentran preservados siendo aún efectivos, estos ciclos son característicamente mediados por linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ con función supresora directa sobre las células satélite (Burzyn *et al.*, 2013).

Consistente con lo reportado por nuestro grupo de investigación, en este estudio observamos que a mayor deterioro de la función muscular (evaluada por la escala de Vignos) existe un aumento de los niveles de expresión de *FOXP3*. Considerando que el

mayor daño muscular se presenta en los niños a medida que avanza la edad, los resultados de la presente investigación apoyan la hipótesis de que los pacientes con DMD menores de 6 años aún tienen preservada la regeneración muscular mediante la proliferación y diferenciación de linfocitos T reguladores $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ quienes actúan directamente sobre la célula satélite para el reemplazo y generación de miofibrillas nuevas. Si bien, la especialización de los linfocitos T desde el timo a la periferia es integral porque implican varios marcadores que proveen de funciones específicas; en el caso de los linfocitos T reguladores $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ podemos establecer que *FOXP3* es parte importante de la especialización ya que se ha medido la cantidad de linfocitos T reguladores en músculo y se ha probado que se acumulan en el músculo distrófico de ratón y pacientes DMD (Villalta A, *et al.*, 2014). Sin embargo, se debe considerar que *FOXP3* forma parte de un sistema de regulación indirecta sobre *AREG* mediante los linfocitos T reguladores $CD4^+CD25^+$ (Burzyn *et al.*, 2013). Al analizar los datos observamos una correlación positiva entre los niveles de expresión de *FOXP3* y *AREG*, lo cual apoya la hipótesis de una regulación indirecta. Por lo anterior, *FOXP3* es una pieza esencial de la vía debido a que interviene sobre los linfocitos T reguladores $CD4^+CD25^+$ para la liberación de *Areg* y ésta a su vez activa a la célula satélite; la evidencia científica hasta el momento reportada (Castiglioni *et al.*, 2015) y nuestros resultados sugieren que ambos factores intervienen indirectamente en la vía de regeneración del músculo.

En el mismo sentido y apoyando nuestros resultados, en un estudio realizado por De Pasquale y col. en el 2012, quienes midieron el nivel de expresión de *FOXP3* en biopsia muscular de pacientes con una edad promedio de 4 años con diagnóstico de DMD, encontraron niveles significativamente bajos ($p < 0.01$) del mRNA de *FOXP3* en comparación con los niveles de pacientes sin DMD.

De forma contraria, encontramos niveles atenuados de la expresión de *FOXP3* en los pacientes mayores de 6 años, lo cual permite inferir el agotamiento de los ciclos de degeneración-regeneración en el músculo distrófico con una reparación mal dirigida en la cual podría existir disminución de linfocitos T reguladores $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ a nivel muscular provocando acumulo de tejido fibroadiposo, de acuerdo a lo reportado por Schiaffino y col., en el 2016.

En cuanto a la expresión de *AREG* en leucocitos circulantes no presentaron diferencias significativas en ambos grupos menores y mayores de 6 años, lo anterior podría ser explicado debido a que la mayoría de las células hematopoyéticas no expresan o expresan niveles muy bajos del transcrito de *AREG* (Burzyn, *et al.* 2013). También se sabe que *AREG* se expresa de forma diferencial entre los tejidos y entre las diversas células incluyendo fibroblastos, células dendríticas, neutrófilos, mastocitos y linfocitos (Berasain *et al.*, 2014).

En conjunto, los datos obtenidos sobre los niveles de expresión de *FOXP3* y *AREG* en leucocitos circulantes de pacientes con DMD aportan nuevo conocimiento sobre el posible papel de los linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ y *AREG* en la regeneración muscular. Esto podría permitir generar nuevas terapias potenciales usando linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ que contribuyan a reparar adecuadamente la fibra muscular dañada en edades tempranas, en concomitancia con terapias génicas que continúan siendo probadas para aumentar su eficacia. No obstante, es relevante tener una mejor comprensión de la regulación en la expresión génica de *AREG* tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional sobre los tejidos y circunstancias celulares; así como considerar su papel en cada enfermedad, su disponibilidad y distribución como proteína y la relación que guarda con otras vías de señalización.

CORRELACIÓN ENTRE LA FUNCIÓN MUSCULAR CON LA ESCALA DE VIGNOS Y LA EXPRESIÓN DE FOXP3 Y AREG EN PACIENTES CON DMD.

La correlación positiva encontrada entre la escala de Vignos y el nivel de expresión de *FOXP3*, no es consistente con los datos publicados por De Pasquale y col. en el 2012 quienes no encontraron correlación entre la función muscular y el nivel de expresión de mRNA de *FOXP3* en músculos de pacientes con DMD ($r = -0.18$, valor de p no significativa). Lo anterior, puede deberse a que se utilizaron diferentes escalas para medir la función muscular.

IMPACTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON AGPIO3 SOBRE LA EXPRESIÓN DE *FOXP3* Y *AREG*

En relación al efecto de la suplementación con AGPIO3 en los niveles de expresión de *FOXP3*, se observó una disminución en el nivel de expresión durante el primer mes en comparación con el grupo placebo. Con base a la evidencia reportada, podemos suponer que los AGPIO3 participan en la regulación de la expresión de *FOXP3* al aumentar la expresión de TGF- β , mediante el aumento en el bloqueo de SMAD7; la cual es una cinasa de serina y treonina que interactúa con el receptor de TGF- β bloqueando su actividad y la posterior transducción de señales. Esta vía forma parte de la regulación transcripcional de *FOXP3* que en condiciones normales TGF- β se activa mediante una serie de fosforilaciones llevadas a cabo por la familia SMAD y en especial SMAD7 tiene función proteica inhibitoria. Debido a lo anterior, proponemos que los AGPIO3 tendrían un efecto potenciador negativo sobre SMAD7, el cual en condiciones normales se encuentra bloqueado para la adecuada transcripción de TGF- β (Yessoufou *et al.*, 2009). Lo anterior, se propone como un una vía alterna a NF- κ B, el cual ha sido descrita por Rodríguez-Cruz y col., en el 2017 como mecanismo regulador de la transcripción de otras citocinas proinflamatorias.

Así mismo, Yessoufou y col. en el 2009 observaron que los linfocitos T reguladores expresan desacetilasas (HDAC7) y acetilasas de histonas y que la suplementación con DHA sobrerreguló los niveles de desacetilasas de histonas de forma directa disminuyendo histonas acetiladas y en consecuencia reprimiendo la transcripción y expresión de *FOXP3*. También encontraron una disminución en la expresión de moléculas de migración y adhesión de los linfocitos T reguladores, los autores proponen que esto podría disminuir la capacidad supresora de estos linfocitos. Por lo que, sugerimos que este podría ser el mecanismo que explica la disminución que observamos en los niveles de expresión de *FOXP3* en linfocitos circulantes de pacientes con DMD en el grupo suplementado con AGPIO3.

A pesar de la expresión constitutiva de *FOXP3* en los linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺ puede estar presente de forma heterogénea e inestable entre las demás subpoblaciones (Tao *et al.*, 2016). Sin embargo, es necesario conocer el nivel de expresión en el músculo distrófico para conocer un papel más claro de la participación de los linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ de músculo con las células satélite y la regeneración muscular.

En el caso del efecto de la suplementación con los AGPIO3 sobre la expresión de *AREG* en pacientes con DMD, no existe suficiente información que permita comparar nuestros resultados.

11. CONCLUSIONES

La expresión del transcrito *FOXP3* en leucocitos circulantes disminuye en los pacientes con DMD que tienen deambulaci3n asistida.

La expresi3n de *FOXP3* en los leucocitos circulantes incrementa cuando aumenta el da1o muscular en los pacientes con DMD.

La expresi3n de *FOXP3* en los leucocitos circulantes se asocia directamente a la expresi3n de *AREG*.

La suplementaci3n con AGPIO3 disminuye la expresi3n de *FOXP3* en los leucocitos circulante de pacientes con DMD.

En los pacientes suplementados con AGPIO3 disminuye la expresi3n de *FOXP3* a medida que aumenta el da1o muscular en los pacientes con DMD.

Finalmente, los pacientes en edades tempranas presentan un proceso de regeneraci3n de las fibras musculares preservado y activo por lo que podrían ser candidatos a recibir AGPIO3 los cuales permiten disminuir la expresi3n de *FOXP3* ya que éste se correlaciona de forma positiva con la funci3n muscular y en consecuencia podría activar la regeneraci3n muscular.

12. ASPECTOS ÉTICOS

El protocolo se apegó a los lineamientos establecidos en la Declaración mundial de Helsinki y en la Ley General de Salud en materia de investigación en seres humanos.

El riesgo de la investigación de acuerdo a lo establecido en el reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación fue mayor al mínimo debido a que se administró AGPIO3 como suplemento alimenticio. Los posibles efectos colaterales se describen en la carta de consentimiento informado y están relacionados a episodios de diarrea, eructos con sabor a pescado y/o náuseas. La extracción de 5 ml de sangre periférica al mes durante 6 meses podría ser un posible riesgo principalmente por la presencia de hematomas en la zona de venopunción.

13. REFERENCIAS.

1. Berasain C, Avila MA. *Amphiregulin*. Semin Cell Dev Biol. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.01.005>.
2. Burzyn D, et al. *A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair*. Cell. 2013;155(6):1282-1295.
3. Bushby K, et al. *Diagnóstico y manejo de la distrofia muscular Duchenne, parte 1: diagnosis y manejo farmacológico y psicosocial*. The Lancet Neurology. 2010;9(1):77-93.
1. Castiglioni A, Corna G, Rigamonti E, Basso V, Vezzoli M, Monno A, Almada A, Mondino A, Wagers A, Manfredi A, Rovere-Querini P. *FOXP3+ T cells recruited to sites of sterile skeletal muscle injury regulate the fate of satellite cells and guide effective tissue regeneration*. PLOS ONE. 2015;10(6):1–18.
2. Chang N, Chevalier F, Rudnicki M. *Satellite cells in muscular dystrophy, lost in polarity*. Trends in Molecular Medicine. 2016;22(6):479-496.
3. Coral RM, et al. *Distrofias musculares en México: un enfoque clínico, bioquímico y molecular*. Revista de Especialidades médico-quirúrgicas. 2012;15(3):152-160.
4. Cruz-Guzmán O, Rodríguez-Cruz M, Escobar R. *Systemic inflammation in Duchenne Muscular Dystrophy: Association with muscle function and nutritional status*. BioMed Research International. 2015:7.
5. Darras B, et al. *Dystrophinopathies*. Gene Reviews. 2014. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1119/>.
6. De Pasquale L, et al. *Increased muscle expression of interleukin-17 in Duchenne muscular dystrophy*. Neurology. 2012;78:1309-1314.
7. Flanigan K. *Duchenne and Becker Muscular Dystrophies*. Neurol Clin. 2014;32:671-688.
8. Fogagnolo MA, et al. *Effects of fish oil containing eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on dystrophic mdx mice*. Clinical Nutrition. 2012:1-7.
9. Fontenot J. Gavin M, Rudensky A. *Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells*. Nature Immunology. 2003;4:330-336.
10. Han SC, et al. *Fermented fish oil suppresses T helper 1/2 cell response in a mouse model as atopic dermatitis via generation of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells*. BMC Immunology. 2012;13:44.

11. Huehn J, Polansky J, Hamann A. *Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage?*. Nature Reviews. Immunology. 2009;9:83-89.
12. Hussein MR, et al. *The effects of glucocorticoid therapy on the inflammatory and dendritic cells in muscular dystrophies*. Int. J. Exp. Pat. 2006;87:451-461.
13. Issazadeh-Navikas S, Teimer R, Bockermann R. *Influence of dietary components on regulatory T cells*. MOL MED. 2012;18:95-110.
14. Iwami D, Nonomura K, Shirasugi N, Niimi M. *Immunomodulatory effects of eicosapentaenoic acid through induction of regulatory T cells*. International Immunopharmacology. 2011;11:384-389.
15. Madaro L, Bouché M. *From innate to adaptive immune response in muscular dystrophies and skeletal muscle regeneration: The role of lymphocytes*. BioMed Research International. 2014:2-12.
16. Montanholi L, et al. *Long-term therapy with omega-3 ameliorates myonecrosis and benefits skeletal muscle regeneration in mdx mice*. The Anatomical Record. Wiley Periodicals. 2015:1-8.
17. Navikas S, Teimer R, Bockermann R. *Influence of dietary components on regulatory T cells*. Molecular Medicine. 2012;18:95-110.
18. Rodríguez-Cruz M, et al. *Potential therapeutic impact of omega-3 long chain-polyunsaturated fatty acids on inflammation markers in Duchenne muscular dystrophy: A double-blind, controlled randomized trial*. Clinical Nutrition. 2017:1-12.
19. Rodríguez-Cruz M, *Molecular mechanisms for the synthesis and genetic regulation of long-chain polyunsaturated fatty acids*. Latest Findings of Omega-3 Long Chain-Polyunsaturated Fatty Acids. 2010:1-10.
20. Rodríguez-Cruz M, et al. *Evidence of insulin resistance and other metabolic alterations in boys with Duchenne or Becker muscular dystrophy*. Hindawi Publishing Corporation. International Journal of Endocrinology. 2015:8.
21. Rodríguez-Cruz, Solís D. *Nutrigenomics of omega-3 fatty acids: Regulators of the master transcription factors*. Nutrition. 2017;41:90-96.
22. Ronald Miller. *Enfermedades neuromusculares y otras enfermedades genéticas*, Miller Anestesia, octava edición, España 2016, capítulo 42, 1266-1286.
23. Rosenberg A, et al. *Immune-mediated pathology in Duchenne muscular dystrophy*. Science Translational Medicine. 2015;7.
24. Sakaguchi S, Miyara M, Constantino C, Hafler D. *FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system*, Nature Immunol. 2010;10:490-500.

25. Schiaffino S, Pereira M, Ciciliot S, Rovere-Querini P. *Regulatory T cells and skeletal muscle regeneration*. The FEBS Journal. 2016:1-8.
26. Sciorati C, Rigamonti E, Manfredi AA, Rovere-Querini P. *Cell death, clearance and immunity in the skeletal muscle*. Cell Death and Differentiation. Nature.2016;23:927-937.
27. Stewart J, et al. *Omega-3 fatty acids and skeletal muscle health*. Mar Drugs. 2015;13:6977-7004.
28. Tao J, Cheng M, Tang P, Liu Q, Pan F, Pei Li X. *Foxp3, Regulatory T cell and autoimmune diseases*. Springer Science Inflammation.2016:1-12.
29. Valenzuela R, et al. *Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas*. Rev Chil Nutr. 2011;38(3)356-367.
30. Villalta S, Rosenthal W, Martínez L, Kaur A, Sparwasser T, Tidball J, Margeta M, Spencer M, Bluestone J. *Regulatory T cells suppress muscle inflammation and injury in muscular dystrophy*. Sci Transl Med. 2014; 6(258):2-22.
31. Wooki K, Hyungjae L. *Advances in nutritional research on regulatory T cells*. Nutrients.2013;5:4305-4315.
32. Yessoufou A, et al. *Docosahexaenoic acid reduces suppressive and migratory functions of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells*. J. Lipid Res. 2009;50:2377-2388.

14. ANEXO 1



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

**CARTA DE CONSENTIMIENTO
INFORMADO
PARA PARTICIPACIÓN EN
PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN**

Nombre del
estudio:

**Impacto de los ácidos grasos poliinsaturados
omega 3 en la expresión de *FOXP3* y *anfiregulina*
como marcadores de linfocitos T involucrados en
la regeneración muscular en Distrofia Muscular
de Duchenne**

Lugar y
fecha:

UMAE Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI IMSS, Ciudad de
México.

Número de
registro:

R-2017-3603-87

Justificación y
objetivo del
estudio:

¿Por qué se realiza esta investigación?

Lo estamos invitando a participar en un estudio de investigación que se lleva a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Nutrición porque su hijo padece distrofia de Duchenne. Los pacientes como su hijo tienen inflamación en sus músculos porque es parte del proceso de la enfermedad. Esta inflamación daña sus músculos y pierden fuerza y función. Por otra parte, se sabe que el consumo de aceite de pescado ayuda a disminuir la inflamación, pero no se sabe si funciona en pacientes con distrofia muscular de Duchenne. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es evaluar si el consumo de un suplemento que contiene aceite de pescado en forma de

cápsulas, ayuda a disminuir la inflamación en pacientes como su hijo que padecen distrofia de Duchenne.

Además de su hijo, otros niños que también padecen distrofia de Duchenne serán invitados a participar en esta investigación. La participación es voluntaria por lo que les pedimos lean cuidadosamente la información que le proporcionamos y haga las preguntas que desee antes de aceptar participar.

Procedimientos:

¿Qué procedimiento se realizará?

Si usted acepta que su hijo participe en el estudio, se le solicitará que acuda en siete ocasiones (una cita cada mes) para obtener información y muestras de sangre de su hijo, y para proporcionarle el suplemento y la consulta nutricia, tal y como se explica a continuación.

En la primera cita se le pedirá que responda un cuestionario sobre los datos generales de su hijo como su edad, los síntomas que ha presentado y medicamentos que está tomando. Además, se le harán preguntas acerca de la frecuencia del consumo de algunos alimentos para conocer los hábitos alimenticios de su hijo, todo esto tendrá una duración aproximada de 90 minutos.

En esta misma cita, a su hijo se le tomará una muestra de sangre equivalente a una cucharada y media o 6 ml de una vena del brazo después de 12 horas de ayuno, que se utilizará para medir los valores de la inflamación. Además, el médico Genetista le hará a su hijo algunas pruebas para evaluar la fuerza y la función en sus músculos.

En esta cita le indicaremos el tratamiento que le toque tomar por los 6 meses, ya sea el suplemento o placebo (aceite que no causa beneficio ni daño). La decisión de uno u otro será de forma aleatoria, es decir como si fuera un volado. Se le darán las recomendaciones de cómo tomarlo ya que deberá consumir 10 cápsulas (pequeñas especiales para niños y con sabor y olor

a fresa) diariamente durante los 6 meses que dura el estudio. En esta primera cita y en las siguientes le daremos la cantidad suficiente de cápsulas para un mes.

En cada una de las citas siguientes (1, 2, 3, 4, 5 y 6) se repetirá la toma de muestra de sangre, y se le entregará el frasco con las cápsulas para el siguiente mes. En las citas 3 y 6, se repetirá la consulta con el Genetista y las preguntas del cuestionario de recordatorio de alimentos de 24 horas para evaluar la ingesta y proporcionarle asesoría nutricional a su hijo.

En todas las citas ustedes deberán acudir a la Unidad de Investigación Médica en Nutrición (**UIMN**) que se encuentra en el cuarto piso del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. Esto se localiza en Avenida Cuauhtémoc número 330, Colonia Doctores. Delegación Cuauhtémoc. Ciudad de México.

Posibles riesgos y molestias:

La evaluación clínica que le hará el Genetista no es invasiva y por lo tanto no ocasiona dolor, incomodidad o riesgo alguno. Las molestias durante la toma de sangre son mínimas, en algunas ocasiones el procedimiento puede causarle a su hijo un poco de dolor y es posible que se le pueda formar un moretón, pero le aseguramos que la persona que tome la muestra es experta en este procedimiento, por lo cual disminuyen estos riesgos.

En relación al consumo del suplemento, sus posibles efectos colaterales podrían ser episodios de diarrea, eructo con sabor a pescado y/o náusea. Si su hijo presenta diarrea, usted podrá acudir a consulta con su médico en cualquier momento del estudio para que lo revise y saber si la diarrea es ocasionada por el consumo de las cápsulas o por otras causas.

Posibles beneficios que recibirá al

El beneficio para su hijo será disminuir la inflamación y mejorar la función muscular. Además, los resultados de la función muscular le proporcionarán información sobre el funcionamiento y grado de daño de los músculos de su hijo.

- participar en el estudio: Esta información le permitirá al terapeuta (persona que le indica el tipo de rehabilitación) recomiende el tipo de rehabilitación más adecuada para que no le cause daño a su hijo. Por otro lado, en caso que los resultados del estudio nos indiquen el beneficio del suplemento, entonces le daremos a su hijo el suplemento si recibió el placebo durante el mismo tiempo que duró el estudio.
- Información sobre resultados y alternativas de tratamiento: En el caso de que durante el estudio, se presenten problemas inesperados que afecten más la salud de su hijo le informaremos si el estudio puede continuar o se detiene. Es decir, durante el curso de este estudio, le informaremos de cualquier hallazgo (bueno o malo) que sea importante para la decisión de que su hijo continúe participando en este estudio. Por ejemplo, si hubiera cambios en los riesgos o beneficios por su participación en esta investigación o si hubiera nuevas alternativas de tratamiento se lo haremos saber, porque es posible que puedan cambiar su opinión sobre continuar con la participación en este estudio.
- Participación o retiro: La participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted decide que su hijo no participe, seguirá recibiendo la atención médica brindada por el IMSS con los procedimientos establecidos en esta Institución Médica. Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, su hijo puede abandonar el estudio en cualquier momento sin que esto modifique los beneficios que tiene en la institución que atiende la salud de su hijo y de su familia. Además, esta investigación no modificara el proceso de atención para su hijo, así que no cambiará el tratamiento que su médico le indique.
- Privacidad y confidencialidad: La información proporcionada que pudiera ser utilizada para identificar a su hijo (nombre, teléfono y dirección,) sus respuestas a los cuestionarios y los resultados de la investigación serán manejados de manera confidencial y privada. Sólo proporcionaremos su información si fuera

necesario para proteger sus derechos o su bienestar, o si lo requiere la ley. Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados, le aseguramos que no se dará información que pudiera revelar la identidad de su hijo. Para lograr esto, todos los resultados que se obtengan se manejarán con un número para mantener el anonimato de su hijo, y usaremos ese número en lugar de su nombre en las hojas que contengan la información de todos los pacientes.

En caso de colección de material biológico (si aplica):

No autoriza que se tome la muestra.

Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.

La presente carta de consentimiento informado es solicitada por las siguientes personas y en caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigador Dra. Maricela Rodríguez Cruz de 8:00 a 16:00 hrs de lunes a
Responsable: viernes, al teléfono 56276900 en la extensión 22483.
Laboratorio de Nutrición Molecular. Unidad de Investigación
Médica en Nutrición. 4to. Piso, Hospital de Pediatría. Centro
Médico Nacional Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro
Social. Correo electrónico: maricela.rodriguez.cruz@gmail.com

Médico residente

de Genética Dra. Thania Ordaz Robles. Correo electrónico:
Médica: tordaz10@gmail.com

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comité Local de Investigación del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330. Planta baja del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720.

Declaración de Consentimiento Informado:

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio. También, he leído (o me han leído) el contenido de este formato. Se me ha brindado la oportunidad de realizar preguntas y aclarar mis dudas acerca de mi participación y he entendido de forma clara a cada una de las respuestas que el personal encargado me ha otorgado. Al firmar este consentimiento, estoy de acuerdo en que mi hijo participe en la investigación que aquí se describe.

Nombre y firma de los padres,
tutores o representantes legales

Testigo 1

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre y firma de quien obtiene
el consentimiento

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma

15. ANEXO 2



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

CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO
PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE
INVESTIGACIÓN

Nombre del estudio: **Impacto de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 en la expresión de *FOXP3* y *anfiregulina* como marcadores de linfocitos T involucrados en la regeneración muscular en Distrofia Muscular de Duchenne**

Lugar y fecha: UMAE Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI IMSS, Ciudad de México.

Número de registro: R-2017-3603-87

Hola, soy la Dra. Thania Ordaz Robles y trabajo en la Unidad de Investigación Médica en Nutrición de este hospital. Actualmente estamos realizando un estudio para conocer acerca de la inflamación de tus músculos y para ello queremos pedir de tu apoyo.

Tu participación en el estudio consistirá en tomar capsulas que pueden contener aceite de pescado o aceite de girasol (que se utiliza para cocinar) durante 6 meses y te tomarán una pequeña muestra de sangre equivalente a una cucharada y media por cada mes; a lo mejor te cause un poco de dolor pero que no te muevas y seas valiente ayuda a que no te lastimemos. Todo esto es con el objetivo de evaluar si el aceite de pescado en forma de

cápsulas, ayuda a regenerar el músculo de la enfermedad que padeces.

Tu participación es voluntaria, lo que significa que es decisión tuya si participas o no en el estudio. También yo evaluaré tus músculos en cada cita para ver qué tan fuertes están sin causarte dolor o incomodidad.

Es importante que sepas que si en un algún momento ya no quieres continuar en el estudio, no habrá problema y podrás no seguir participando.

Toda la información que nos proporciones y las muestras que tomaremos nos ayudarán a saber más sobre el efecto de estas cápsulas en la regeneración de tu músculo; además que nos permitirá saber cómo están funcionando tus músculos.

Esta información será confidencial, esto quiere decir que no diremos a nadie tus respuestas o resultados, sólo lo sabrán las personas que forman parte del equipo de este estudio. A tus padres también se les dará esta información para que la conozcan.

Si aceptas participar, te pido que por favor pongas un (X) en el cuadrito de abajo que dice "Sí quiero participar" y escribe tu nombre.

Si no quieres participar, no pongas una (X), ni escribas tu nombre.

Sí quiero participar.

Nombre: _____

Nombre y firma de la persona que obtiene el asentimiento:

16. ANEXO 3

a. VALORACIÓN NUTRICIA

Fecha _____ Nombre del paciente _____ Edad _____
¿Ha ganado o perdido peso en los últimos 6 meses? _____ ¿Cuánto? _____

Antecedentes:

¿Sigue alguna dieta especial? _____ ¿Qué tipo de dieta? _____

¿Ha utilizado dietas para bajar de peso anteriormente? _____ ¿De cuantas calorías? _____

¿Tiene dificultades para deglutir o masticar? _____

¿Recientemente ha tenido nauseas, vomito, cambios en el apetito, diarrea o estreñimiento?

¿A qué alimentos es alérgico? _____

¿Qué alimentos no tolera o le disgustan? _____

¿Toma suplementos alimenticios? _____ ¿Cuáles? _____

¿Toma algún medicamento? _____ ¿Cuál? _____

Le gusta ingerir alimentos raros como gis, pintura, etc. _____

Toma habitualmente refrescos y jugos _____ ¿Cuáles? _____

Estilo de vida:

¿Hace ejercicio? _____ ¿Con qué frecuencia? _____

Problema actual:

Plan de manejo nutricional:

Pronóstico:

b. RECORDATORIO DE 24 HORAS (PRIMER DIA ENTRE SEMANA)

DESAYUNO: _____ **HORA:** _____

INGREDIENTES:

CANTIDAD

_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

MARCA DE INGREDIENTES

COLACIÓN: _____ **HORA** _____

INGREDIENTES:

CANTIDAD

_____	_____
_____	_____

MARCA DE INGREDIENTES

RECORDATORIO DE 24 HORAS (PRIMER DIA ENTRE SEMANA)

COLACIÒN: _____ **HORA:** _____

INGREDIENTES:	CANTIDAD
_____	_____
_____	_____

MARCA DE INGREDIENTES

CENA: _____ **HORA:** _____

INGREDIENTES:	CANTIDAD
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

MARCA DE INGREDIENTES

17. ANEXO 4

a. Sistema de clasificación de la función motora gruesa (GMFCS, Gross Motor Function Classification System)

Nivel 1: camina sin limitación

Nivel 2: camina con limitación

Nivel 3: camina usando un aparato de movilidad de mano o pies (férulas)

Nivel 4: movilidad personal con dificultad

Nivel 5: transportado en silla de ruedas manual.

b. Medical Research Council

Grado 5: Normal

Grado 5 -: Debilidad perceptible

Grado 4+: Debilidad leve pero definitiva

Grado 4: Mueve articulación contra la gravedad y poca resistencia

Grado 4-: Pone mínima resistencia

Grado 3+: Resistencia transitoria pero colapsa abruptamente

Grado 3: Movimiento activa contra la gravedad

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

Grado 2: Puede mover si la gravedad es eliminada

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

Grado 0: Ausencia total de movimiento

c. Sistema de clasificación en la escala de Brooke

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

2. Puede levantar los brazos encima de la cabeza sólo si flexiona los codos (disminuyendo la circunferencia total del movimiento) o mediante el uso de músculos accesorios.

3. No puede elevar los brazos por encima de la cabeza pero puede levantar un vaso de 8 onzas (240 ml) hasta la boca.

4. No puede levantar un vaso de 8 onzas (240 ml) hasta la boca, pero puede llevar las manos a la boca

5. No puede llevar la mano a la boca, pero puede sostener una pluma o monedas de la mesa.

6. Sin función en las manos

d. Sistema de clasificación en la escala de Vignos

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