



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

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
**UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD**  
**HOSPITAL GENERAL “DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA”**  
**CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA**

**ASOCIACIÓN DEL MIR-31 Y DE LOS MIOMIRNAS CON**  
**LA FUNCIÓN MUSCULAR EN LA DISTROFIA**  
**MUSCULAR DE DUCHENNE**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

**P R E S E N T A**

CHRISTIAN RICARDO SÁNCHEZ MENDOZA

**TUTURA PRINCIPAL**

DRA. MARICELA RODRÍGUEZ CRUZ  
INVESTIGADOR TITULAR C, UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA  
EN NUTRICIÓN, UMAE HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CENTRO  
MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

**COTUTORES**

M.C. EUGENIA DOLORES RUIZ CRUZ  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA, UMAE HOSPITAL GENERAL  
“DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA” CMN LA RAZA

M.C. TOMÁS ALMEIDA BECERRIL  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN NUTRICIÓN, UMAE HOSPITAL  
DE PEDIATRÍA, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

**NÚMERO DE REGISTRO INSTITUCIONAL**

**R-2018-785-089**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **TUTORA:**

**Dr. en C. Maricela Rodríguez Cruz**

Investigador Titular C

Adscripción: UMAE, Hospital de Pediatría, Unidad de Investigación Médica en Nutrición,  
Centro Médico Nacional, Siglo XXI, IMSS.

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

## **COTUTORES:**

**M. en C. Eugenia Dolores Ruíz Cruz**

Medico de base del servicio de Genética Medica.

Adscripción: UMAE Hospital General "Dr. Gaudencio González Garza", Centro Médico  
Nacional, La Raza, IMSS.

Correo electrónico: draeugenia.ruiz@gmail.com

**M. en C. Tomás Almeida Becerril**

Curso de Posgrado, Doctorado en Ciencias.

Adscripción: UMAE, Hospital de Pediatría, Unidad de Investigación Médica en Nutrición,  
Centro Médico Nacional, Siglo XXI, IMSS.

Correo electrónico: tom\_almeida@outlook.com

## **MÉDICO RESIDENTE TESISISTA:**

**Dr. Christian Ricardo Sánchez Mendoza**

Residente del tercer año de la especialidad de Genética Medica

Adscripción: UMAE Hospital General "Dr. Gaudencio González Garza", Centro Médico  
Nacional, La Raza, IMSS.

Correo electrónico: cris.sanchezmendoza@gmail.com

## HOJA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS

---

**Dra. María Teresa Ramos Cervantes**

Directora de Educación e Investigación en Salud  
U.M.A.E. Hospital General "Dr. Gaudencio González Garza"  
Centro Médico Nacional La Raza  
Instituto Mexicano del Seguro Social

---

**Dra. Maricela Rodríguez Cruz**

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

---

**Dra. Eugenia Dolores Ruíz Cruz**

Profesora titular de la Especialidad en Genética Médica  
U.M.A.E. Hospital General "Dr. Gaudencio González Garza"  
Centro Médico Nacional La Raza  
Instituto Mexicano del Seguro Social

---

**Dr. Christian Ricardo Sánchez Mendoza**

Médico Residente de Genética Médica  
U.M.A.E. Hospital General "Dr. Gaudencio González Garza"  
Centro Médico Nacional La Raza  
Instituto Mexicano del Seguro Social



**Dirección de Prestaciones Médicas**  
 Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud  
 Coordinación de Investigación en Salud



## Dictamen de Aprobación

Martes, 14 de agosto de 2018

Ref. 09-B5-61-2800/2018001

2000

Dra. Maricela Rodríguez Cruz  
 Unidad de Investigación Médica en Nutrición Siglo XXI (U INVEST MED EN NUTRICION S XXI)  
 Nivel Central

Presente:

Informo a usted que el protocolo titulado: **MIRNAS CIRCULANTES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y SU ASOCIACIÓN CON EL DAÑO MUSCULAR EN LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE**, fue sometido a la consideración de este Comité Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas vigentes, con base en las opiniones de los vocales del Comité de Ética en Investigación y del Comité de Investigación del Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS, se ha emitido el dictamen de **APROBADO**, con número de registro: R-2018-785-089.

De acuerdo a la normatividad vigente, deberá informar a esta Comité en los meses de enero y julio de cada año, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo. Este dictamen sólo tiene vigencia de un año. Por lo que en caso de ser necesario requerirá solicitar una reaprobación al Comité de Ética en Investigación del Comité Nacional de Investigación Científica, al término de la vigencia del mismo.

Atentamente,

  
 Dr. Fabio Salamanca Gómez  
 Presidente  
 Comité Nacional de Investigación Científica

Anexo comentarios:  
 Se anexa documento  
 SNN/ iah. F-CNIC-2018-121

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

4° piso Edificio "B" de la Unidad de Congresos Av. Constitución 338 Col. Doctores México 06720 56276900 ext 21310 [comisa@cis.gob.mx](mailto:comisa@cis.gob.mx)

## **AGRADECIMIENTOS**

La presente tesis de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición, en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. El protocolo de Investigación se registró ante el Comité Nacional de Investigación Científica (CNIC) con el número de registro R-2018-785-089.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

No es correcto de mi parte atribuirme completamente el mérito de este logro, cada una de las personas que forman parte de mi vida han contribuido indudablemente en mi formación personal y profesional. Llegar hasta este punto parecía algo muy lejano e imposible, hubo muchos obstáculos que me impedían ver con claridad el final de esta etapa; sin embargo, la presencia de cada uno de ellos me dio la fuerza necesaria para llegar hasta el final.

Dra. Maricela Rodríguez Cruz, es un verdadero honor haber formado parte de su maravilloso equipo de trabajo, le estoy eternamente agradecido por todo el apoyo, su guía y su comprensión, pero sobre todo le doy las gracias por toda la confianza que depositó en mí. Al equipo de trabajo del laboratorio de Nutrición Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, gracias por todo su tiempo, sus consejos y comentarios los cuales fueron sumamente importantes para el desarrollo de esta tesis; especialmente, al M.C. Tomás Almeida Becerril por ser un excelente profesor y amigo, sin tu apoyo y tus lecciones, este trabajo no hubiera podido completarse.

Esta aventura comenzó cuando fui seleccionado para cursar la especialidad de Genética Médica en una de las mejores sedes de este país, por lo tanto, agradezco infinitamente al departamento de Genética de la U.M.A.E. Hospital General “Dr. Gaudencio González Garza” del CMN “La Raza”, IMSS, en especial a la Dra. Eugenia Dolores Ruíz Cruz quien fungió como mi mentora durante este tiempo, gracias por todas sus enseñanzas, por su apoyo, dedicación y su paciencia, pero sobre todo, gracias porque a pesar de todos los pormenores que se presentaron en estos 3 años, nunca dejó de confiar en mí y me acompañó hasta el final. De igual manera, agradezco a la Dra. Laura Santana Díaz y a mi compañera de residencia la Dra. Yuvia Michelle Barrera Acosta por su apoyo, su comprensión, sus enseñanzas y por la amistad brindada, aprecio y valoro cada momento vivido con ustedes.

Finalmente, gracias a los motores de mi vida, a mi madre y hermanos, sin su amor, guía y apoyo incondicional no hubiera podido llegar a este punto y sobre todo no sería la persona que soy ahora. Abuelita, papá, donde sea que estén, jamás olviden que los amo, todo su amor y la fe que tenían en mí se ve depositado en cada una de las páginas de este trabajo, así como en todos mis futuros éxitos.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	3
HISTORIA.....	4
EPIDEMIOLOGÍA.....	4
ASPECTOS GENÉTICOS.....	4
MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	6
FUNCIÓN MOTORA Y MUSCULAR.....	7
FISIOPATOLOGÍA .....	9
Inflamación.....	10
Estrés Oxidativo.....	14
MARCADORES DE DAÑO MUSCULAR.....	16
CK.....	16
Aminotransferasas: AST y ALT.....	17
MICRORNAS (MIRNAS) Y SU RELACIÓN CON LA DMD.....	18
Biogénesis .....	18
Función de los miRNAs en el músculo esquelético .....	21
Papel de los miRNAs en la miogénesis.....	21
ANTECEDENTES.....	25
Estudios realizados en modelos animales .....	25
Estudios realizados en pacientes humanos .....	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	31
JUSTIFICACIÓN .....	31
HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVO GENERAL .....	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
Diseño del estudio:.....	32

Lugar del estudio .....	33
Población de estudio .....	33
Criterios de selección.....	33
Estimación del tamaño de la muestra .....	33
Definición de variables.....	34
Variables confusoras.....	35
<i>Grupos de estudio</i> .....	35
Procedimientos .....	35
Técnicas de laboratorio.....	36
<i>Expresión del miR-31 y de los miomiRNAs</i> .....	36
Síntesis de cDNA.....	37
Amplificación por PCR .....	39
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>39</b>
<b>ASPECTOS ÉTICOS.....</b>	<b>40</b>
Tipo de riesgo para los pacientes:.....	40
Carta de consentimiento .....	40
Registro ante la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS:.....	40
Beneficios de participación: .....	40
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
Edad, antropometría y marcadores de daño muscular .....	41
Espectro de mutaciones identificadas en la población de pacientes con DMD estudiada. .....	42
Comparación de los niveles de expresión del miR-31 y los miomiRNAs circulantes en pacientes ambulatorios y no ambulatorios .....	43
miR-31 y miomiRNAs en pacientes menores y mayores de 7 años. ....	45
Correlación entre los niveles del miR-31 y los miomiRNAs circulantes y los marcadores de daño muscular (CK, AST y ALT). ....	47
CK.....	47
AST.....	49

ALT .....	51
Correlación entre la expresión del miR-31 con la expresión de los miomiRNAs .....	53
Correlación entre los niveles de expresión del miR-31 y de los miomiRNAs circulantes con los valores de <i>score</i> de las escalas de función muscular.....	54
miomiRNAs .....	55
DISCUSIÓN .....	58
CONCLUSIONES .....	62
PERSPECTIVAS .....	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
ANEXOS .....	66
ANEXO 1 .....	66
ANEXO 2.....	69
ANEXO 3.....	71
SISTEMA DE CLASIFICACIÓN EN LA ESCALA DE VIGNOS.....	71
SISTEMA DE CLASIFICACIÓN EN LA ESCALA DE BROOKES .....	72
SISTEMA CLASIFICACIÓN DE LA FUNCIÓN MOTORA GRUESA (GMFCS, GROSS MOTOR FUNCTION CLASSIFICATION SYSTEM).....	73
MEDICAL RESEARCH COUNCIL .....	74
ANEXO 4.....	75
ANEXO 5.....	76
ANEXO 6.....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. DISTROFINA Y EL COMPLEJO DAP .....	10
FIGURA 2. MECANISMO DE INFLAMACIÓN DURANTE LA DMD .....	12
FIGURA 3. ALTERACIONES MOLECULARES DE LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE QUE CONLLEVAN AL ESTRÉS OXIDATIVO .....	16
FIGURA 4. BIOGÉNESIS DE LOS MIRNAS .....	20
FIGURA 5. MIRNAS INVOLUCRADOS EN LA REGENERACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	22
FIGURA 6. MECANISMOS DE LIBERACIÓN DE LOS MIRNAS .....	24
FIGURA 7. ESPECTRO MUTACIONAL DE PACIENTES AMBULATORIOS Y NO AMBULATORIOS CON DMD .....	42
FIGURA 8. EXPRESIÓN DEL MIR-31-5P EN PACIENTES AMBULATORIOS Y NO AMBULATORIOS .....	43
FIGURA 9. EXPRESIÓN DE LOS MIOMIRNAS CIRCULANTES EN PACIENTES AMBULATORIOS Y NO AMBULATORIOS .....	44
FIGURA 10. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL MIR-31-5P EN PACIENTES $\leq 7$ Y $>7$ AÑOS .....	45
FIGURA 11. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS MIOMIRNAS CIRCULANTES EN PACIENTES $\leq 7$ Y $>7$ AÑOS .....	46
FIGURA 12. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL MIR-31 CON LA CK .....	47
FIGURA 13. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE LOS MIOMIRNAS CIRCULANTES CON LA CK .....	48
FIGURA 14. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL MIR-31 CON LA AST .....	49
FIGURA 15. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE LOS MIOMIRNAS CIRCULANTES CON LOS NIVELES DE AST .....	50
FIGURA 16. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL MIR-31 CON LA ALT .....	51

<b>FIGURA 17. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE LOS MIOMIRNAS CIRCULANTE CON LOS NIVELES DE LAS ALT .....</b>	<b>52</b>
<b>FIGURA 18. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL MIR-31-5P CON EL PUNTAJE DE ESCALA DE VIGNOS .....</b>	<b>54</b>
<b>FIGURA 19. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL MIR-1-3P CON EL PUNTAJE DE LA ESCALA DE VIGNOS Y GMFCS .....</b>	<b>55</b>
<b>FIGURA 20. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL MIR-133A-3P CON EL PUNTAJE DE LA ESCALA DE VIGNOS, EL PORCENTAJE DE MRC Y EL GMFCS .....</b>	<b>56</b>
<b>FIGURA 21. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DEL MIR- 206 CON EL PUNTAJE DE LA ESCALA DE VIGNOS Y EL PORCENTAJE DEL MRC .....</b>	<b>57</b>

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>TABLA 1. SIGNOS Y SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD CLASIFICADAS POR GRUPO DE EDAD EN PACIENTES CON DMD .....</b>	<b>6</b>
<b>TABLA 2. FUNCIÓN DE LOS MIRNAS ESPECÍFICOS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO .....</b>	<b>23</b>
<b>TABLA 3. LISTA DE SECUENCIAS DE MIRNAS MADUROS .....</b>	<b>38</b>
<b>TABLA 4. EDAD, ANTROPOMETRÍA, MARCADORES DE DAÑO MUSCULAR Y ESCALAS DE FUERZA Y FUNCIÓN MUSCULAR EN PACIENTES AMBULATORIOS Y NO AMBULATORIOS CON DMD .....</b>	<b>41</b>
<b>TABLA 5 CORRELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE EXPRESIÓN DEL MIR-31 CON LA EXPRESIÓN DE LOS MIOMIRNAS .....</b>	<b>53</b>

## GLOSARIO

**AAV:** Virus adenoasociado.

**ALT:** Alanina aminotransferasa.

**AST:** Aspartato aminotransferasa.

**ATP:** Adenosín trifosfato.

**cDNA:** DNA complementario.

**CK:** Creatina cinasa.

**CK-BB:** Creatina cinasa cerebral.

**CK-MB:** Creatina cinasa miocárdica.

**CK-Mt:** Creatina cinasa mitocondrial.

**CPA:** Células presentadoras de antígenos.

**CTE:** Cadena de transporte de electrones.

**CXMDJ:** Modelo canino japonés de la distrofia muscular canina ligada al cromosoma X.

**DAMP:** Moléculas asociadas al daño molecular.

**DGCR8:** Región crítica del síndrome de DiGeorge 8.

**DMD:** Distrofia muscular de Duchenne.

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico.

**G6PD:** Glucosa-6 fosfato deshidrogenasa.

**GMFCS:** Clasificación de la Función Motora Gruesa.

**IL:** Interleucina.

**MEF2:** Factor 2 reforzador de miocitos.

**MHC:** Complejo mayor de histocompatibilidad.

**miomiRNAs:** MiRNAs específicos de músculo.

**miRNAs:** MicroRNAs.

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

**mPCR:** PCR múltiplex.

**MRC:** Medical Research Council.

**MRF:** Factores reguladores miogénicos.

**mRNA:** RNA mensajero.

**MYF5:** Factor miogénico 5.

**MYF6:** Herculina o factor miogénico 6.

**MYOD1:** Diferenciación miogénica 1.

**MYOG:** Miogenina o factor miogénico 4.

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

**NF- $\kappa$ B:** Factor Nuclear kappa de células B.

**NOX2:** NADPH oxidasa 2.

**NSAA:** Evaluación Ambulatoria de North Star.

**PAF:** Células progenitoras fibro/adipogénicas.

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

**pre-miRNAs:** MiRNAs precursores.

**pri-miRNAs:** MiRNAs primarios.

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

**RL:** Radicales libres.

**RNA:** Ácido Ribonucleico.

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno.

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

**shRNA:** RNA de horquilla corta.

**snRNA:** RNA pequeño nuclear.

**SRF:** Factor de respuesta sérica.

**TR:** Transcripción reversa.

**TRBP:** Proteína de unión al RNA de respuesta de transactivación.

**TRL:** Receptores tipo Toll.

**UTR:** Región no traducida.

## RESUMEN

**Antecedentes:** La distrofia muscular de Duchenne (DMD) (MIM 310200), es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente en la infancia, está causada por mutaciones en el gen *DMD* que resultan en ausencia o deficiencia de la proteína distrofina cuya característica clínica principal es el deterioro progresivo de la función muscular. Actualmente, los métodos diagnósticos de la enfermedad están bien establecidos, sin embargo, los parámetros para monitorear la función muscular y la respuesta al tratamiento son limitados, motivo por el cual hay una extensa búsqueda de biomarcadores moleculares para ayudar a mejorar estas limitaciones, entre estos los miRNAs se han considerado. Los miRNAs específicos de músculo denominados miomiRNAs engloban al miR-1, miR-133 y miR-206; por otro lado, se tiene identificado que el miR-31 en conjunto con los miomiRNAs participan en la vía de señalización de la miogénesis, por lo que, son indicadores factibles con un alto potencial de seguimiento y pronóstico de la DMD. Los estudios realizados a la fecha en donde se evalúan a estos miRNAs plantean la posibilidad de utilizarlos como biomarcadores potenciales para el seguimiento de la enfermedad, sin embargo, la principal limitante es haber sido estudiados en pacientes que aún conservan la función muscular, lo cual limita el conocimiento de su expresión durante la evolución de la enfermedad.

**Objetivo:** Demostrar si existe asociación entre la expresión del miR-31 y de los miomiRNAs circulantes con la función muscular en los pacientes con distrofia muscular de Duchenne.

**Material y métodos:** Este estudio multicéntrico tiene un diseño de cohorte anidada, analítico, observacional, transversal y prolectivo. Se seleccionaron 38 pacientes con DMD de entre 3 a 17 años los cuales no debían estar bajo terapia farmacológica con glucocorticoides ni consumir antioxidantes, debían contar con el diagnóstico clínico y molecular de DMD. Los pacientes se dividieron en 2 grupos de acuerdo con su capacidad funcional en ambulatorios y no ambulatorios. Se llevó a cabo la recolección de datos incluyendo la edad, las medidas antropométricas y se aplicaron las escalas de fuerza y función muscular del Medical Research Council, el Sistema de Clasificación de la Función Motora Gruesa (GMFCS), Vignos y Brooke. Se tomó una muestra de sangre periférica para obtener el suero y se llevó a cabo la medición de los niveles de marcadores de daño muscular, creatina cinasa (CK), aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT) así como el RNA total sérico; a partir de este último se sintetizó el cDNA, se cuantificaron los niveles de expresión de los miRNAs mediante qRT-PCR y se compararon con el control de expresión U6 snRNA.

**Análisis estadístico:** Las pruebas se realizaron bajo intervalos de confianza del 95% y se consideró un valor alfa  $<0.05$ . Inicialmente se exploró la distribución Gaussiana de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk ( $N < 50$ ). Para llevar a cabo el análisis de comparación de los miomiRNAs en los 2 grupos (ambulatorio y no ambulatorio) se utilizó la prueba de *t* de Student, cuando los datos tuvieron una distribución normal, por el contrario, si los datos no mostraron una distribución normal se utilizó la prueba *U* de Mann-Whitney. Para los análisis de correlación entre los miomiRNAs y la función muscular se realizó la correlación de Pearson cuando los datos mostraron una distribución normal. Por el contrario, si los datos no presentaron una distribución normal se realizó una correlación de Spearman.

**Aspectos éticos:** Este protocolo se fundamenta en las consideraciones éticas establecidas en el Código de Nüremberg y la declaración de Heisinki de la Asociación Médica Mundial, se apega a lo

establecido por la Ley General de Salud y el IFAI en materia de investigación para la salud y protección de datos personales, no existe ningún conflicto de intereses entre los autores.

**Resultados:** La edad, el peso corporal, la talla y los puntajes de las escalas de Brooke, GMFCS y Vignos fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes no ambulatorios en comparación con el grupo no ambulatorio. Los valores de CK y las transaminasas (AST y ALT) fueron significativamente mayores en los pacientes ambulatorios en comparación con los no ambulatorios ( $p = <0.05$ ). Los niveles de expresión del miR-31, miR-133 y miR-206 fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes ambulatorios en comparación con el grupo de pacientes no ambulatorios ( $p = <0.05$ ), mientras que miR-1 sólo mostró una tendencia a ser mayor en el grupo ambulatorio ( $p = 0.056$ ). Los pacientes  $\leq 7$  años mostraron una elevación significativa de la expresión del miR-1 en comparación con los  $> 7$  años ( $p <0.05$ ), por el contrario, la expresión del miR-133 y miR-206 (ambos con  $p = 0.052$ ) sólo mostró una tendencia a ser significativa en aquellos pacientes  $\leq 7$  años, el miR-31 no mostró diferencia significativa ( $p = >0.05$ ) entre los grupos de edad. La correlación entre los niveles de expresión de los miRNAs mostró que el miR-31 correlacionó con el miR-206 ( $r = 0.768$ ,  $p = <0.001$ ) y con el miR-133 ( $r = 0.668$ ,  $p = <0.001$ ), los miomiRNAs correlacionaron entre sí, como se observó entre el miR-133 y el miR-206 ( $r = 0.939$ ,  $p = <0.001$ ). Las correlaciones entre los niveles de expresión de los marcadores de daño muscular CK ( $r = 0.420$ ,  $p = 0.020$ ), AST ( $r = 0.609$ ,  $p = 0.001$ ), ALT ( $r = 0.538$ ,  $p = 0.003$ ) con el miR-31 fueron significativas. De igual manera, observamos una correlación significativa entre los niveles de CK, AST y ALT con el miR-1 ( $r = 0.415$ ,  $p = 0.022$ ;  $r = 0.656$ ,  $p = <0.001$ ;  $r = 0.397$ ,  $p = 0.027$ , respectivamente), el miR-133 ( $r = 0.582$ ,  $p = 0.001$ ;  $r = 0.656$ ,  $p = <0.001$ ;  $r = 0.664$ ,  $p = <0.001$ , respectivamente) y el miR-206 ( $r = 0.659$ ,  $p = <0.001$ ;  $r = 0.741$ ,  $p = <0.001$ ;  $r = 0.676$ ,  $p = <0.001$ , respectivamente). Además, se observaron correlaciones significativas entre los niveles de expresión de los miRNAs con las escalas de fuerza y función muscular. El miR-31 únicamente mostró una correlación con la escala de Vignos ( $r = -0.393$ ,  $p = 0.029$ ). El miR-133 correlacionó con la escala de Vignos ( $r = -0.533$ ,  $p = 0.004$ ) y con el porcentaje del MRC ( $r = 0.431$ ,  $p = 0.023$ ). El miR-206 correlacionó con la escala de Vignos ( $r = -0.469$ ,  $p = 0.010$ ) y con el porcentaje de MRC ( $r = 0.438$ ,  $p = 0.021$ ).

**Conclusiones:** Los niveles del miR-31 y de los miomiRNAs circulantes se encuentran elevados en aquellos pacientes con distrofia muscular de Duchenne que tienen una mejor función muscular, pero disminuyen progresivamente a medida que ellos presentan un deterioro en la función muscular.

## INTRODUCCIÓN

Las distrofias musculares son un grupo heterogéneo de enfermedades causadas por mutaciones en diferentes componentes del sarcolema, matriz extracelular o enzimas que afectan principalmente al músculo estriado. Corresponden a trastornos miopáticos hereditarios que se caracterizan por debilidad y emaciación musculares progresivas.<sup>1</sup> Comprenden una amplia gama de distrofias incluyendo la de Duchenne, Becker, congénita, miotónica, Emery-Dreifuss, facioescapulohumeral, oculofaringeal y del anillo óseo. Cada trastorno varía en gravedad, edad de inicio, patrón de herencia, los grupos musculares afectados y la afectación a otros órganos.<sup>2</sup>

Las distrofias musculares son trastornos poco frecuentes, la forma más usual es la Distrofia Muscular de Duchenne. Cierta número de genes en el músculo esquelético se han visto relacionadas con los distintos tipos de distrofias musculares; aquellos que codifican proteínas sarcolémicas (sarcoglicanos), citoesqueléticas (distrofina), citosólicas, de matriz extracelular y de membrana nuclear. Las anomalías en estas proteínas pueden conducir a una mayor susceptibilidad a la necrosis de fibras musculares, dato diagnóstico que se encuentra con frecuencia en la biopsia muscular.<sup>3</sup>

Las distrofias musculares son consideradas trastornos miogénicos primarios más devastadores, debido a diferentes razones:

1. Causada por defectos genéticos no prevenibles.
2. Se manifiestan a muy temprana edad.
3. Conducen a un daño muscular progresivo inevitable con pérdida de la función muscular, lo que conlleva a que los pacientes nunca aprenden a caminar, pierden habilidades ambulatorias o tienen un rango de movimientos muy limitado.
4. Se presentan dificultades respiratorias, complicaciones con la alimentación y, a menudo, mueren en las primeras décadas de su vida.
5. La enfermedad a menudo causa defectos graves en otros sistemas.<sup>3</sup>

La mayoría de los pacientes son diagnosticados hacia los cinco años, cuando su capacidad física y la fuerza muscular se deteriora progresivamente requiriendo el uso de ayudas técnicas para la marcha y para el posicionamiento. Con el paso del tiempo surgen complicaciones respiratorias, cardíacas, gastrointestinales y ortopédicas, las cuales sin intervención genera una disminución considerable en la calidad de vida del paciente y de sus cuidadores. Aunque hasta el momento no hay un tratamiento curativo, existen diversas intervenciones que pueden modificar la historia natural de la enfermedad permitiendo ampliar el tiempo de vida de todos los pacientes afectados.<sup>3</sup>

## HISTORIA

El primer relato histórico de distrofia muscular apareció en 1830, cuando Sir Charles Bell escribió un ensayo sobre una enfermedad que causaba debilidad progresiva en niños varones. Seis años más tarde, otro científico informó sobre dos hermanos que desarrollaron debilidad generalizada, daño muscular y reemplazo del tejido muscular dañado con grasa y tejido conjuntivo.<sup>4</sup>

En el año de 1850, las descripciones de niños que se volvían progresivamente más débiles, que perdían la capacidad de caminar y que morían a temprana edad se hicieron más prominentes en las revistas médicas.<sup>4</sup>

En la década siguiente, el neurólogo francés Guillaume Duchenne presentó un relato completo de 13 niños con la forma más común y grave de la enfermedad (que ahora lleva el nombre de Distrofia muscular de Duchenne). La descripción de los diferentes tipos de distrofias no se desarrolla hasta finales del siglo XIX. Pronto se hizo evidente que la enfermedad tenía más de una forma y que estas enfermedades afectaban a las personas de ambos sexos y de todas las edades.<sup>4</sup>

En 1980 aún no se conocía completamente la causa de las distrofias musculares, en un principio se pensó que eran consecuencia de alteraciones en el sistema nervioso central (SNC). Tras efectuar varios estudios de biopsias musculares se averiguó que se trataba de una enfermedad degenerativa muscular. En 1986, un grupo de investigadores identificaron el gen relacionado con la DMD, y un año más tarde se conoció la proteína asociada a este gen, denominada más adelante distrofina.<sup>4</sup>

## EPIDEMIOLOGÍA

La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) se considera el padecimiento neuromuscular hereditario más frecuente del ser humano. Afecta a 1/3800-6300 varones recién nacidos vivos con una prevalencia de 30 por cada 100,000 recién nacidos vivos.<sup>5,6</sup>

## ASPECTOS GENÉTICOS

El gen de la distrofina llamado *DMD*, es uno de los más largos y complejos del genoma humano, contiene 79 exones y abarca 2.2Mb.<sup>5</sup> Se expresa en músculo esquelético, cardíaco y liso y en menor medida en cerebro.<sup>6,7</sup> La localización del gen se encuentra en el cromosoma Xp21.2.<sup>6</sup> Codifica una proteína grande llamada distrofina y está formada por 3685 aminoácidos y contiene hasta ocho promotores alternos. Tres de los cuales están ubicados en la región 5' del gen de la distrofina que dan un mRNA producto de la transcripción de tamaño de 14 kb.<sup>7</sup>

La distrofina posee 4 dominios:<sup>5</sup>

- El dominio N-terminal: contiene sitios de unión a actina-F.
- Dominios de tipo “bastón”: Contienen cuatro regiones bisagras que posibilitan la flexibilidad de la molécula necesaria para la estabilización del sarcolema durante los procesos de contracción y relajación muscular.
- Dominio con repetidos tipo espectrina (rico en cisteínas): Estabiliza la unión con el  $\beta$ -distroglucano.
- Dominio C-terminal: Interactúa con la distrobrevina,  $\alpha$  y  $\beta$ -sintrofinas y la enzima óxido nítrico sintasa.

El gen *DMD* posee una tasa de mutación relativamente alta, cuya consecuencia es la alteración de la función de la distrofina. Las mutaciones que se presentan con mayor frecuencia incluyen:<sup>6, 8</sup>

- Eliminaciones 68%
- Duplicaciones 11%
- Mutaciones puntuales 20%.

Las eliminaciones pueden presentarse en cualquier parte del gen, sin embargo, existen regiones en donde se presentan con mayor frecuencia, estas zonas se denominan puntos calientes (*Hot Spot*) entre los exones 45-55 (80%) y 1 a 9 (20%).<sup>6</sup> Los mecanismos por los cuales se produce alteración en la síntesis de la proteína se explican a continuación:

- ❖ Eliminaciones: ocasiona un corrimiento en el marco de lectura, por lo tanto, la traducción de la proteína se detiene prematuramente.
- ❖ Duplicaciones: ocasionan un cambio en el marco de lectura dando como resultado una proteína trunca.
- ❖ Mutaciones puntuales: existen diferentes tipos causantes de la DMD:<sup>8</sup>
  - Mutaciones sin sentido (*Nonsense*): existe un cambio en un par de bases que origina la aparición de un codón de paro prematuro.
  - Mutaciones pequeñas dentro del exón (inserciones o eliminaciones): existe una interrupción en el marco de lectura abierto.
  - Mutaciones en los sitios de empalme: generalmente conducen a la eliminación del exón afectado durante la síntesis del mRNA ocasionando una interrupción el marco de lectura abierto.

## MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Debido a que se trata de una enfermedad con herencia recesiva ligada al cromosoma X, los afectados serán del sexo masculino, sin embargo, está descrito que un 10% de las mujeres portadoras pueden presentar alguna sintomatología.<sup>5</sup> En la tabla 1 se muestran los signos y síntomas que se pueden presentar en la DMD de acuerdo con el grupo de edad:

**Tabla 1.** Signos y síntomas de la enfermedad clasificadas por grupo de edad en pacientes con DMD.<sup>9</sup>

Edad	Manifestaciones Clínicas
3-5 años	Caídas frecuentes y dificultad para jugar con otros niños. Alteraciones al correr y al saltar. Alteraciones en el lenguaje.
5 años	Debilidad muscular evidente. Al levantarse del suelo, utilizan las manos para apoyarse (maniobra de Gowers). Dificultad para subir escaleras. Es común la pseudohipertrofia de los músculos gastrocnemios a causa de una infiltración grasa en el músculo.
6 años	Caminata en puntas (marcha de pato) debida a las contracturas de los tendones de Aquiles y de las bandas iliotibiales. Postura lordótica. Pérdida de fuerza muscular progresiva. Se afecta de manera predominante la musculatura proximal de los miembros inferiores y los músculos flexores del cuello. La afección de las piernas es más intensa que la de los brazos
8-10 años	Se necesitan de órtesis para poder realizar la caminata. Las contracturas articulares, la limitación de la flexión de la cadera y la limitación de la extensión de rodilla, codo y muñeca empeoran cuando el paciente permanece sentado durante un periodo prolongado.
12 años	La mayoría de los enfermos permanecen confinados en una silla de ruedas. Las contracturas se estabilizan y a menudo aparece una escoliosis progresiva que puede causar dolor. La deformidad torácica con escoliosis altera todavía más la función pulmonar, ya comprometida por la debilidad muscular.
16 años	Existen complicaciones en diferentes niveles: <b>Respiratorias:</b> Se presentan en aquellos que no reciben manejo con corticoesteroides: Capacidad vital forzada disminuye 60 – 70% de la normal. Disminuye la capacidad para toser. Aumenta la frecuencia de neumonías. La disminución de la efectividad de ventilación durante el sueño conlleva a falla respiratoria. <b>Cardíacas:</b> Las arritmias más frecuentes son las auriculares. Taquicardia en reposo (secundaria a disfunción autonómica).

ECO revela alteración primaria en función ventricular izquierda (necrosis en región posterobasal de ventrículo izquierdo).

***Gastrointestinal:***

Compromiso de la musculatura voluntaria y lisa.

Debilidad en músculos de masticación – deglución que lleva a atragantamiento y tos frecuente

Retardo en el vaciamiento y dilatación gástricos aguda que aumenta el riesgo de insuficiencia respiratoria por broncoaspiración.

Disfunción intestinal crónica con constipación, distensión, hipomotilidad e impactación.<sup>8</sup>

## **FUNCIÓN MOTORA Y MUSCULAR**

La función motora en los pacientes con DMD puede ser clasificada de acuerdo con su capacidad funcional. Se pueden aplicar las siguientes escalas que tienen diferentes puntajes:

### **Sistema de Clasificación de la Función Motora Gruesa (GMFCS)<sup>10</sup>**

Nivel 1: Camina sin limitación.

Nivel 2: Camina con limitación.

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

Nivel 4: Movilidad personal con dificultad.

Nivel 5: Transportado en silla de ruedas manual.

### **Medical Research Council (MRC)<sup>11</sup>**

Grado 5: Normal.

Grado 5-: Debilidad perceptible.

Grado 4+: Debilidad leve pero definitiva.

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

Grado 4-: Pone mínima resistencia.

Grado 3+: Resistencia transitoria, pero colapsa abruptamente.

Grado 3: Movimiento activo contra la gravedad.

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

Grado 2: Puede mover si la gravedad es eliminada.

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

Grado 0: Ausencia total de movimiento.

Esta escala evalúa tres grupos musculares en miembro superior y tres en miembro inferior bilateralmente. El porcentaje de la fuerza muscular puede calcularse mediante la siguiente fórmula:

% MRC = suma total del puntaje x 100 / número de músculos valorados x 5.

### **Sistema de clasificación en la escala de Brookes<sup>10</sup>**

- 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 de manos.

### **Sistema de clasificación en la escala de Vignos.<sup>10</sup>**

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

## FISIOPATOLOGÍA

Una vez demostrada la alteración en el gen que codifica la distrofina en aquellos pacientes con distrofia muscular de Duchenne, se realizaron estudios bioquímicos con el fin de conocer su función. Estas investigaciones mostraron que la distrofina interactúa con otra serie de proteínas del sarcolema denominadas "Proteínas Asociadas a Distrofina" (DAP) y que en conjunto constituyen de manera periférica e integral la membrana de las células del músculo estriado y liso. Dicho complejo protege a la célula muscular del daño inducido por el proceso de contracción y transducción de señales.<sup>3, 7</sup>

El complejo DAP se compone de la distrofina, ubicada en el sarcolema y además de dos complejos proteicos  $\alpha$ - $\beta$  distroglucano y  $\alpha$ - $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  sarcoglucanos; estos últimos corresponden a proteínas transmembranales. La distrofina es una proteína citoesquelética muy grande que al unirse a la actina y a los complejos distroglucanos y sarcoglucanos se ancla a la matriz extracelular mediante la laminina y cuya función es reforzar y estabilizar la membrana celular de la fibra muscular durante la contracción.<sup>12</sup>

Las DAP se dividen en tres subcomplejos de acuerdo con sus características bioquímicas<sup>12</sup> tal y como se observa en la **Figura 1**.

- a) Componente citoplasmático: Consiste en un grupo de proteínas periféricas a la membrana intracelular formado por la distrofina, las sintrofinas y la distrobrevina.
- b) El segundo subcomplejo, el distroglucano, está compuesto de dos subunidades, la  $\alpha$  y  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  se une a la laminina en la matriz extracelular, mientras que la  $\beta$  se une a la distrofina en la cara intracelular de la membrana citoplasmática.
- c) El tercer complejo está formado por un grupo de proteínas transmembranales llamadas sarcoglucanos (SG)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  y dos proteínas descubiertas recientemente: el sarcoglicano e,<sup>13,14</sup> y el sarcospan. El conjunto de estas proteínas, forman el subcomplejo sarcoglicano-sarcospan (SG-SSPN).

La distrofina, por lo tanto, imparte estabilidad estructural a las membranas plasmáticas de las miofibrillas, permitiendo un soporte durante los ciclos de contracción/relajación y la generación de fuerza requerida del tejido muscular. Su ausencia conduce a un daño de la membrana inducido por la contracción muscular con la consiguiente liberación de contenidos citoplásmicos, tales como creatina cinasa (CK) y radicales libres, y la estimulación de la inmunidad innata, el reemplazo del músculo por tejido conectivo fibroso, la debilidad muscular y, finalmente, necrosis.<sup>13</sup>

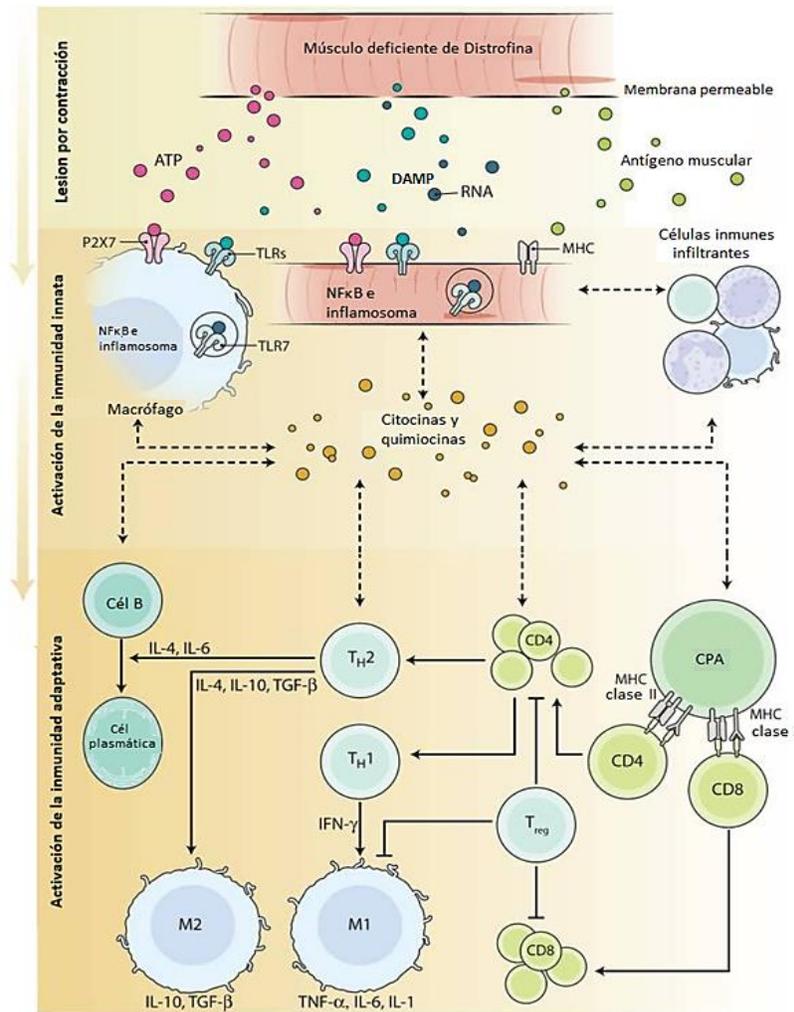


ácidos nucleicos) que se unen a los Receptores tipo Toll (TLR). Importantemente, las propiedades normales del músculo sano (el privilegio inmunitario, la reparación rápida de la membrana muscular y la distrofina intacta), permiten que la inflamación se limite. Además, dado que no hay una expresión constitutiva del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I en las células musculares sanas, la progresión de la respuesta inmune innata a adaptativa no se lleva a cabo y por lo tanto las lesiones producidas por la actividad física se resuelven sin causar lesiones en el músculo.<sup>13</sup>

Es bien sabido que el tejido muscular posee una alta capacidad regenerativa. Sin embargo, cuando existe un daño agudo o un traumatismo, se produce necrosis en las miofibrillas desencadenando una serie de eventos coordinados durante aproximadamente 2 semanas. Primero, los neutrófilos se infiltran en el área necrótica en cuestión de horas, seguidos de los macrófagos M1 (inflamatorios) en días. Posteriormente, los macrófagos M2 (moduladores) reemplazan gradualmente a los macrófagos M1 para llevar a cabo la reparación del tejido muscular lesionado permitiendo el retorno de la función en el músculo sano.<sup>13</sup>

Por otro lado, en la DMD, la deficiencia de la distrofina conduce a una inestabilidad crónica de la membrana cuyo resultado será la necrosis de la miofibrilla. Como consecuencia se lleva a cabo la activación de la respuesta inmune innata de manera autosostenida. Dicha respuesta inicia con la expresión de moléculas DAMP provenientes del músculo esquelético dañado, estas se unen al TLR 7 y al receptor ionotrópico P2X7 presente en células musculares esqueléticas y macrófagos, ocasionando la activación de la respuesta inmune innata y una respuesta inflamatoria crónica.<sup>13</sup> Concomitantemente las citocinas proinflamatorias liberadas por el tejido muscular dañado y por las células del sistema inmune inducen la expresión constitutiva de MHC de clase I y II en las células musculares, el reclutamiento de células T y B y la generación de una respuesta inmune adaptativa en el medio muscular.<sup>13</sup>

Las citocinas y las quimiocinas liberadas en el medio atraen y activan células inmunes infiltrantes adicionales, como los neutrófilos y las células presentadoras de antígenos (CPA), los macrófagos M1 y las células dendríticas. Las CPA, a su vez, activan los linfocitos T cooperadores (CD4+ y CD8+), lo que lleva a la propagación de la respuesta inmunitaria adaptativa mediada por linfocitos T (TH1, TH2) que son amortiguadas por T regs (**Figura 2**).<sup>13</sup>



**Fig. 2.** Mecanismo de inflamación durante la DMD. Tomada y modificada de Rosenberg y cols., 2015. ATP: Adenosín Trifosfato. DAP: Proteínas Asociadas a Distrofina. RNA: Ácido Ribonucleico. RLT: Receptor Tipo Toll. MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad. NFkB: Factor Nuclear Kappa B. IL: Interleucinas. IFN- $\gamma$ : Interferon Gama. TH1 y TH2: Linfocitos T Helper 1 y 2. Treg: Linfocitos T reguladores. TNF- $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral alfa. CPA: Célula Presentadora de Antígenos. CD4 y CD8: Linfocitos T CD4 y CD8. M1 y M2: Macrófagos tipo 1 y 2. FGF- $\beta$ : Factor de Crecimiento Transformante Beta.

El equilibrio entre la respuesta inmunitaria adaptativa TH1 y TH2 crea un mecanismo de retroalimentación reguladora que conduce a la activación de los macrófagos M1 o M2, cuyo resultado será el incremento de la inflamación o la regeneración muscular. Estudios recientes, han demostrado que los macrófagos desempeñan funciones importantes en la reparación muscular producida durante la etapa aguda de la patología. Las poblaciones de macrófagos M1 proinflamatorios llevan a cabo un proceso de transición a macrófagos M2 antiinflamatorio. Estos se activan alternativamente por la IL-4, IL-10 e IL-13, con la consecuente producción de citocinas antiinflamatorias.<sup>12, 15</sup> Particularmente, la IL-10 desempeña un papel importante al desactivar a los

macrófagos M1 y regular la activación alternativa de los M2, además de la reducción del daño muscular causado por los macrófagos M1.<sup>16</sup>

Un segundo proceso patológico, que se superpone al estado proinflamatorio crónico, es el de la degeneración segmentaria y la regeneración de las miofibrillas. En este proceso, las fibras musculares son infiltradas por neutrófilos y fagocitadas por macrófagos. Mientras tanto, las células miogénicas satélite residentes se activan y diferencian en mioblastos como mecanismo de reparación permitiendo de este modo la regeneración de la miofibrilla dentro de la lámina basal preexistente. Aunque tales episodios de degeneración y regeneración tienen éxito para mantener la estructura y función de los músculos, esto no se lleva a cabo en el músculo de pacientes con DMD.<sup>17</sup>

Los ciclos repetidos de necrosis de miofibras y regeneración ineficaz contribuyen al establecimiento de una respuesta inflamatoria crónica, que a su vez amplifica el daño tisular, lo que lleva a la degeneración muscular y al reemplazo del músculo por tejido graso.<sup>18</sup> Este último proceso se lleva a cabo por un grupo de células intersticiales musculares, denominadas células progenitoras fibro/adipogénicas (PAF). Las células PAF pueden contribuir a la regeneración muscular y a la degeneración fibro-adipogénica en las primeras etapas de la enfermedad. Sin embargo, a medida que la enfermedad progresa, la actividad de estas células se altera y la consecuencia final será reprimir la regeneración mediada por células satélite, al tiempo que promueven la fibrosis y la infiltración de grasa.<sup>19</sup>

Se ha demostrado que existe una señalización que activa el proceso inflamatorio y que es mediada principalmente por la activación del Factor Nuclear kappa de células B (NF- $\kappa$ B). El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción que se expresa de forma ubicua y participa en la supervivencia, crecimiento, diferenciación celular y apoptosis. El NF- $\kappa$ B se encuentra en el citoplasma unido a proteínas inhibitoras (I $\kappa$ B). Otra de las enzimas que participa en la activación del NF- $\kappa$ B es la proteína inhibidora de NF- $\kappa$ B es la I $\kappa$ B cinasa (IKK). Dicha enzima está compuesta por dos subunidades catalíticas, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , y una subunidad reguladora, IKK $\gamma$ /NEMO. Durante la activación de NF- $\kappa$ B, IKK se fosforila y, a su vez, fosforila a I $\kappa$ B. Esta fosforilación causa ubiquitinación y posterior degradación de I $\kappa$ B por la vía del proteosoma 26S. La degradación de I $\kappa$ B expone un sitio de localización nuclear, lo que permite que NF- $\kappa$ B se traslade al núcleo, se una a sitios de consenso en genes diana y active la expresión de citocinas y quimiocinas implicadas en la inflamación en la DMD (**Figura 3**).<sup>20</sup>

## Estrés Oxidativo

Fisiológicamente, los radicales libres (RL) y las especies reactivas de oxígeno (ROS) se producen en tejidos sanos. Si bien es cierto que estas moléculas suelen ser dañinas, sus efectos se mitigan a través de la acción de antioxidantes y de orgánulos específicos en células sanas, principalmente las mitocondrias.<sup>17</sup> La formación de ROS se lleva a cabo en las mitocondrias y son resultado de la producción de ATP mediante el proceso de la fosforilación oxidativa.<sup>18</sup>

Las fuentes principales de ROS en las células eucariotas son el complejo NADPH oxidasa 2 (NOX2) unido a la membrana y a la cadena de transporte de electrones (CTE) en las mitocondrias. La NADPH oxidasa utiliza NADPH como un donante de electrones para producir el anión superóxido ( $O_2^-$ ). La producción de ROS en la CTE mitocondrial se produce principalmente en los complejos I (ubiquinona óxido-reductasa) y III (citocromo C óxido-reductasa), aunque los otros componentes también tienen una contribución considerable a la cantidad total de ROS producidos en las mitocondrias.<sup>17</sup>

La fosforilación oxidativa es un proceso en el que se ven implicadas múltiples enzimas unidas a la membrana mitocondrial interna y que están estrechamente reguladas por el  $Ca^{2+}$ . La ausencia de la distrofina en la DMD causa micro-desgarros en el sarcolema debido a la fragilidad de la membrana plasmática de la célula muscular permitiendo una entrada anormal de  $Ca^{2+}$  y una sobrecarga mitocondrial de este catión, así como el aumento de las ROS.<sup>17,18</sup> La sobrecarga sostenida de la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico afecta la capacidad de la mitocondria para reducir los radicales libres, de igual manera conduce a la activación de proteasas, particularmente calpaínas, lo que resulta en la destrucción de los componentes de la membrana mitocondrial por alteración en la permeabilidad que, a su vez, aumenta la entrada de calcio. El exceso de calcio puede conducir a la muerte celular.<sup>17, 18, 21.</sup>

En condiciones normales, la homeostasis *redox* garantiza que las células respondan adecuadamente a los estímulos endógenos y exógenos para poder garantizar la estructura y función apropiadas de las proteínas. Sin embargo, cuando esta capacidad se ve alterada, el estrés oxidativo puede conducir a una disfunción celular anormal, apoptosis y así contribuir al desarrollo de la distrofia muscular. Es importante mencionar que existen mecanismos que permiten el mantenimiento de la homeostasis en la célula cuando el estrés oxidativo está desregulado. Uno de estos implica la activación del factor regulador maestro de la defensa antioxidante endógena, el factor 2 relacionado con NF-E2 (Nrf2). Nrf2 es un factor de transcripción que modula la expresión de la enzima de fase 2, contrarrestando los efectos perjudiciales de las ROS.<sup>20</sup>

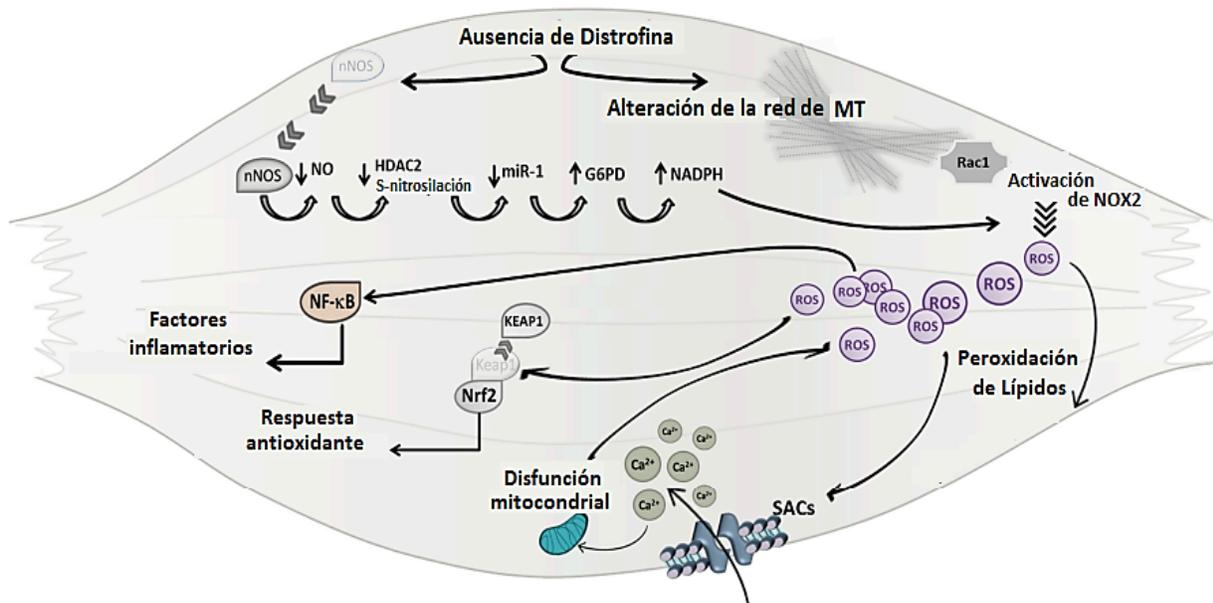
Este factor se encuentra en el citoplasma unido con su modulador proteína 1 asociada a *Kelch like-ECH* (KEAP1).<sup>14</sup> En condiciones de estrés oxidativo, Nrf2 se traslada al núcleo donde induce la expresión de genes implicados en la síntesis de glutatión, como la glutamato cisteína ligasa (GCLC), en la desintoxicación de xenobióticos (es decir, NADPH, quinona deshidrogenasa (NQO1) y hemo oxigenasa (HO-1), y en la neutralización de ROS como la superóxido dismutasa (SOD1, SOD2) y catalasa (CAT-1).<sup>14</sup> En particular en la DMD, observamos una regulación positiva significativa de varios genes y enzimas dependientes de Nrf2 para contrarrestar la fuerte inducción de la expresión de NOX2, la principal fuente de producción de ROS en los músculos distróficos.<sup>14</sup>

Se han realizado investigaciones para determinar el papel vasodilatador del óxido nítrico (NO) en el músculo y su relación con la fisiopatología en la DMD. El NO se produce en las células musculares por la isoforma neuronal de la NO sintasa (n-NOS). En condiciones normales dicha enzima está unida a la distrobrevina y a la sintrofina del complejo DAP y éstas a su vez están en contacto con la distrofina.<sup>22</sup>

En los músculos de los pacientes con DMD, la deficiencia de distrofina ocasiona que la n-NOS pierda su anclaje subsarcolémico y se acumule en el citoplasma, por lo tanto, disminuye su contenido y se altera la función vasodilatadora cuya consecuencia final será la necrosis de la miofibrilla.<sup>22</sup> La desregulación de la n-NOS es una de las fuentes intracelulares principales de producción de estrés oxidativo en los pacientes con DMD. El estrés oxidativo a su vez conduce a una mayor liberación de ROS mediada por IL-6, que inicia un ciclo vicioso de ROS en los miocitos DMD, lo que lleva a la muerte celular y al reemplazo de miocitos por tejido cicatricial.<sup>22</sup>

Otro componente importante en la producción de ROS en el músculo con DMD es el contenido de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato). Normalmente, la enzima glucosa-6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) es capaz de mantener niveles elevados de NADPH, una molécula portadora de electrones crítica para la actividad del sistema de glutatión. Sin embargo, en los músculos distróficos, la mayor parte del NADPH producido es utilizado por el complejo NOX para convertir el oxígeno molecular en el radical reactivo  $\cdot\text{O}_2^-$ .<sup>14</sup>

Por lo tanto, un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad homeostática *redox* del sistema biológico para eliminar estos productos y sus intermediarios e incluso para reparar el daño resultante, se considera perjudicial (**Figura 3**).<sup>24</sup>



**Fig. 3.** Alteraciones moleculares de la Distrofia Muscular de Duchenne que conllevan al estrés oxidativo. Tomada y modificada de Forcina, L y cols., 2017. ROS: Especies Reactivas de Oxígeno. NFkB: Factor Nuclear Kappa B. MT: Microtúbulos. NOX2: NADPH oxidasa 2. Nrf2: Factor 2 relacionado con NF-E2. KEAP1: Proteína 1 asociada a Kelch like-ECH. nNOS: Óxido Nítrico Sintasa. NO: Óxido Nítrico. HDAC2: Histona Desacetilasa 2. miR: micro RNA. G&PD: Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa. NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

## MARCADORES DE DAÑO MUSCULAR

En la actualidad existen distintos marcadores de daño muscular útiles que pueden ayudar al diagnóstico de una patología de origen muscular, tal es el caso de la CK y las transaminasas (AST y ALT) que son utilizados para la monitorización y, en algunos casos, la identificación de una enfermedad muscular existente.<sup>25</sup>

### CK

La creatina cinasa (CK) es un miembro de la familia de las guanidina cinasas de las fosfógeno cinasas cuya función principal es ayudar en la hidrólisis del ATP. Esta enzima generalmente se encuentra en tejidos que demandan un alto nivel de energía como el cerebro y los músculos. La mayoría de los animales vertebrados poseen una isoenzima de CK que es específica de tejido y compartimento.<sup>25</sup>

A saber, existen 3 isoformas diferentes: la CK-BB que se localiza en cerebro, la CK-MM presente en músculo esquelético y CK-MB localizada en músculo cardíaco. Existe otra forma de CK que se

localiza entre las crestas y el espacio intermembrana de las mitocondrias (CK-Mt), las cuales son ubicuas y sarcoméricas. La forma ubicua se expresa en el cerebro, el músculo liso y los espermatozoides, mientras que la forma sarcomérica se expresa en el músculo estriado que se encuentra en el músculo cardíaco y esquelético.<sup>25</sup>

La proporción de las isoformas de CK que se encuentran en el citosol varía según el tejido. El músculo esquelético contiene típicamente 98% de MM y 2% de MB y el músculo cardíaco contiene 70 a 80% de MM y 20 a 30% de MB, mientras que el cerebro tiene predominantemente sólo el tipo BB de la isoenzima.<sup>25</sup>

Debido a la degeneración muscular, las personas con DMD presentan niveles de CK extremadamente elevados en sangre. La detección de una CK sérica elevada es actualmente uno de los signos más comunes que desencadenan la sospecha del diagnóstico de daño muscular o un trastorno neuromuscular.<sup>26</sup> Sin embargo, a pesar de que la cuantificación de los nivel séricos de CK se usa ampliamente como un biomarcador para la detección de estas patologías, está se ve influenciada por distintos factores como la edad, la actividad física y los tratamientos farmacológicos, entre otros, por lo que no es útil para monitorear la progresión de la enfermedad.<sup>27</sup>

### **Aminotransferasas: AST y ALT**

La aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT) son enzimas que están involucradas en la gluconeogénesis hepática y son buenos biomarcadores para la lesión de las células hepáticas.<sup>28</sup>

La AST existe como dos isoformas en los seres humanos: una localizada en el citosol de las células (aproximadamente el 20% de la AST medida) y otra localizada en las mitocondrias (80%). La AST se localiza principalmente en el hígado, corazón, músculo esquelético, riñón, cerebro, páncreas, pulmones, leucocitos y eritrocitos, en orden decreciente de concentración. Es menos sensible y específico para el hígado. Por el contrario, la ALT es una enzima citosólica aislada principalmente en el hígado ya que presenta una alta concentración en el tejido hepático. En general, se acepta que la ALT es un marcador más específico de lesión hepática. La ALT también se encuentra en el músculo esquelético, pero en concentraciones mucho más bajas.<sup>28, 29</sup>

Las transaminasas séricas elevadas se han documentado bien en pacientes con DMD, ya que su elevación puede estar asociada a la rotura de la membrana muscular. Por lo tanto, la concentración

elevada de las aminotransferasas no solamente está condicionada por una enfermedad hepática, sino que también pudiera estar relacionada con un daño muscular existente.<sup>30</sup>

Como hemos visto, una de las consecuencias finales de la DMD es la degeneración muscular con la consecuente pérdida de la deambulación que es progresiva e inevitable. Recientemente, estudios en diferentes modelos animales han propuesto una nueva clase de biomarcadores, los miRNAs, los cuales participan en una amplia gama de procesos biológicos como el desarrollo, la diferenciación, la proliferación y la muerte celular. Los miRNAs están conservados evolutivamente, son estables y su expresión puede correlacionarse directamente con su función sobre todo a nivel muscular.

## **MICRORNAS (MIRNAS) Y SU RELACIÓN CON LA DMD**

Los microRNAs son una clase de RNAs pequeños no codificantes de cadena sencilla compuestos de 17 a 24 nucleótidos aproximadamente, cuya principal función es participar en la regulación postraduccional de la expresión génica de múltiples procesos biológicos y de la proliferación en células eucariotas.<sup>31</sup> Se estima que el 30% de todos los genes humanos son regulados por mecanismos dependientes de microRNAs.<sup>32</sup>

La gran mayoría de los microRNAs interactúan con la región no traducida (UTR) 3' de los mRNAs blanco para suprimir la expresión de dicho gen. Sin embargo, se sabe que también pueden interactuar con otras regiones diferentes como la UTR 5', secuencias codificantes y algunos promotores. De esta manera vemos que las funciones que desarrollan son importantes para los seres vivos, cuya expresión anómala está relacionada con muchas enfermedades. La mayoría de los microRNAs son transcritos a partir de secuencias específicas de DNA, en miRNAs primarios (pri-miRNAs), posteriormente se procesan en miRNAs precursores (pre-miRNAs) y finalmente miRNAs maduros.<sup>32</sup>

### **Biogénesis**

La mayoría de los microRNA identificados hasta el momento son de tipo intragénicos y dependientes del promotor del gen donde residen (procesados a partir de intrones y pocos exones de genes codificantes de proteínas) y en menor porcentaje existen microRNAs intergénicos que se transcriben independientemente de sus propios promotores.<sup>31</sup>

La biogénesis de los microRNAs se lleva a cabo por 2 vías:

- Vía canónica

- Vía no canónica.

#### *Vía canónica*

Corresponde a la vía principal de síntesis de los microRNAs y comienza con la transcripción del pri-miRNA, los cuales tienen una longitud de aproximadamente 4 kilobases así como estructuras en forma de horquilla compuesta de un tallo y un bucle. Su síntesis se lleva a cabo en el núcleo a partir de la RNA polimerasa II y factores generales de la transcripción (principalmente). A los pri-miRNA recién sintetizados se les adiciona en su extremo 5' una Cap (7-metil-guanosina), y en su extremo 3' una cola de poliadeninas.<sup>31, 33</sup>

Los pri-miRNAs se procesan en pre-miRNAs por el complejo microprocesador, compuesto que consiste en una proteína de unión a RNA DGCR8 (región crítica del síndrome de DiGeorge 8) y por una ribonucleasa III, Drosha. Este complejo se encarga de eliminar los extremos 5' y 3' de la hebra de una sola cadena de los pri-miRNA.<sup>31-33</sup> DGCR8 reconoce una secuencia GGAC metilada en el N6 y otros motivos dentro del pri-miRNA, mientras que Drosha escinde el dúplex en la base de la estructura de horquilla característica del pri-miRNA. Esto da como resultado la formación de un pre-miRNA que consta de 70 nucleótidos.<sup>32,33</sup>

El pre-miRNA se exporta al citoplasma mediante un complejo Exportin 5/RanGTP y se procesa mediante la endonucleasa RNasa III Dicer para producir el dúplex de miRNA maduro. El RNA dúplex recién sintetizado contiene una cadena madura (guía) de microRNA y su cadena complementaria. La cadena complementaria interactúa con un complejo multiproteico conocido como el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), el cual está constituido por las proteínas Dicer, Proteína de unión al RNA de respuesta de transactivación (TRBP) y Argonauta (Ago).<sup>32,33</sup>

La cadena guía es la responsable de dirigir el silenciamiento. Sin embargo, dependiendo de la complementariedad perfecta o incompleta de la cadena del microRNA a su blanco, el complejo miRISC puede conducir al rompimiento y degradación del mRNA o a la inhibición de la transcripción. La complementariedad perfecta de bases entre la secuencia semilla del microRNA (del segundo al octavo nucleótido del extremo 5') y la secuencia complementaria del extremo 3'UTR es lo que permite que los microRNAs modulen la expresión génica.<sup>32</sup>

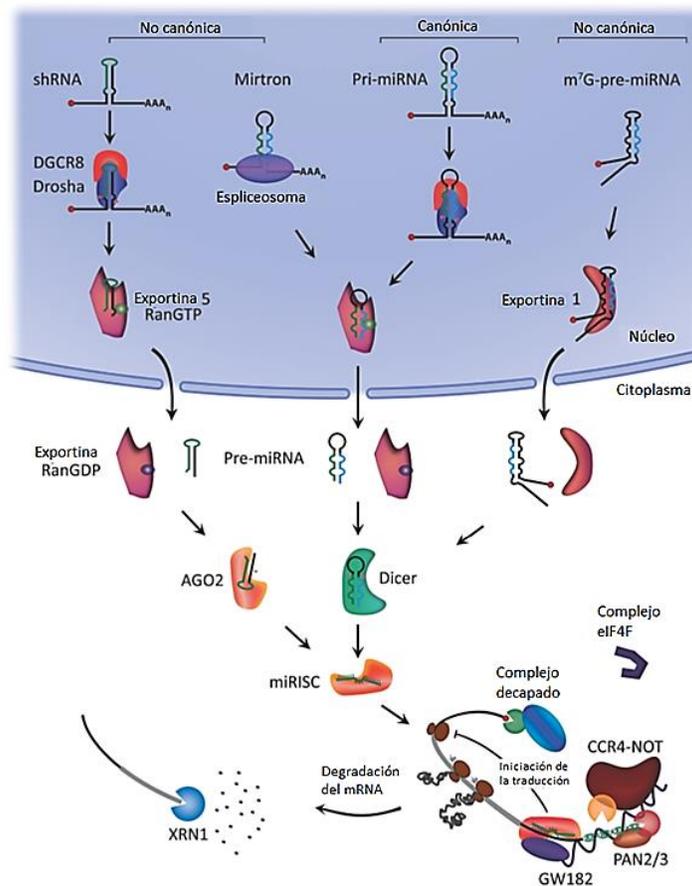
#### *Vía no canónica*

Se puede dividir en 2 vías:<sup>33</sup>

- Independientes de DGCR8/Drosha: Los pre-miRNAs nacientes se exportan directamente al citoplasma a través de la exportina 1 sin la necesidad de escisión por Drosha.

- Independientes de Dicer: estos miRNAs son procesados por Drosha a partir de transcritos de RNA de horquilla corta (shRNA). Estos pre-miRNAs requieren que Ago2 complete su maduración dentro del citoplasma porque no tienen la longitud suficiente para ser sustratos de Dicer (**Figura 4**).

Actualmente se ha descrito que la mayoría de los mamíferos incluyendo al *Homo sapiens* recurren a la vía canónica para llevar a cabo la generación de microRNA. Las vías no canónicas son una prueba de la flexibilidad y habilidad de las células para generar microRNA utilizando otras alternativas.<sup>32, 35</sup>



**Fig. 4.** Biogénesis de los miRNAs. Tomada y modificada de O'Brien, J. y cols., 2018. DGCR8: Región Crítica Drosha y Síndrome de DiGeorge 8. Pre-miRNA: precursor-miRNA. AGO2: argonauta. miRISC: Complejo de Silenciamiento inducido por miRNA. shRNA: horquilla corta de RNA.

## **Función de los miRNAs en el músculo esquelético**

Los miRNAs realizan una modificación postraduccional mediante 2 mecanismos: <sup>31</sup>

- Represión traduccional: Los miRNA se unen con su respectivo mRNA y evitan su traducción. Esto ocasiona una inhibición de la traducción, y disociación prematura del complejo mRNA-ribosoma.
- Degradación de los mRNAs: los miRNAs regulan la degradación de los mRNA diana al inducir la eliminación del Cap 5' y la cola de poliA 3', lo que resulta casi en un completo silenciamiento de mRNA.

## **Papel de los miRNAs en la miogénesis**

El desarrollo del músculo esquelético se ha estudiado intensamente, debido a que cualquier alteración durante su formación puede conducir al desarrollo de enfermedades. La miogénesis del músculo esquelético es un proceso orquestado que consta de varias etapas principales:<sup>36</sup>

- Proliferación y diferenciación de células progenitoras miogénicas localizados en el dermomiótoma y/o miótoma de los mioblastos.
- Diferenciación y fusión de mioblastos en miotubos
- Diferenciación de miotubos en miofibras.

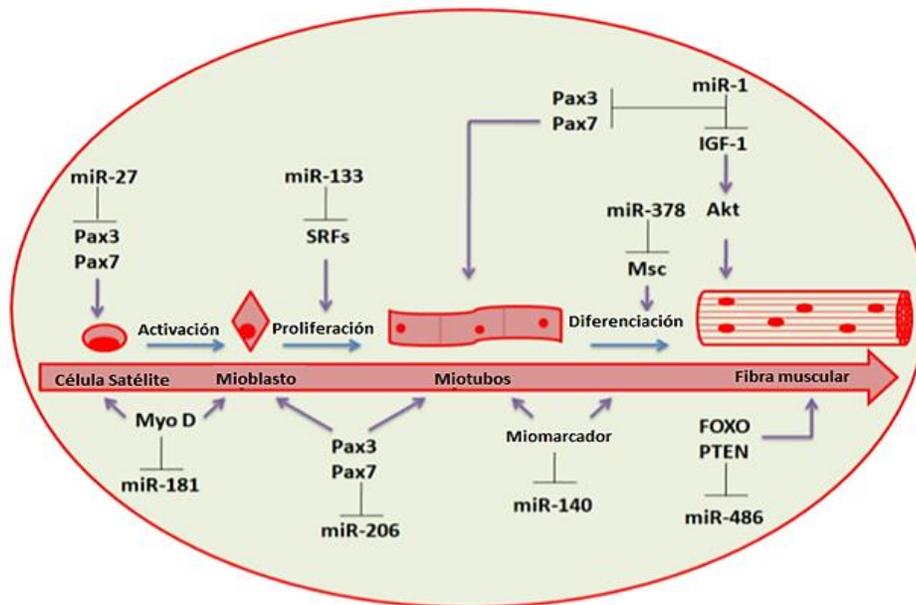
La miogénesis (**Figura 5**) es un proceso complejo en el que participan genes involucrados con el crecimiento celular muscular, la morfología y contractilidad. Dichos procesos están regulados por múltiples factores de transcripción como los factores reguladores miogénicos (MRFs), de la familia bHLH (*basic helix-loop-helix*), factores de transcripción MYOD1 (diferenciación miogénica 1), MYF5 (factor miogénico 5), MYOG (miogenina o factor miogénico 4), MYF6 (herculina o factor miogénico 6) y SRF (factor de respuesta sérica). De igual forma intervienen factores de transcripción como PAX 3, PAX 7 y factores de la familia MEF2 (factor 2 reforzador de miocitos).<sup>36</sup> Los determinantes de la miogénesis son MYF5 y MYOD mientras que MYOG y MYF4 se expresan en gran medida durante la diferenciación terminal e impulsan la fusión de los mioblastos formando los miotubos.<sup>37</sup>

Actualmente se sabe que una gran cantidad de miRNAs se expresan de manera específica en el musculo esquelético, los cuales están implicados en los procesos de regulación, desarrollo, función y adaptación muscular. Los miRNAs que se expresan exclusiva o preferentemente en el músculo estriado (cardíaco o esquelético) se llaman miomiRs. Los más importantes a la fecha son: miR-1, miR-133a, miR-133b y miR-206 (se expresan únicamente en musculo esquelético), miR-208a (únicamente en musculo cardíaco), miR-208b, miR-486 y miR-499.<sup>36, 38</sup> La abundancia de los

miRNAs en el músculo varía entre los grupos musculares y no se correlaciona necesariamente con los niveles séricos.<sup>39</sup>

Algunos miomiRs están organizados en cromosomas en grupos bicistrónicos y, por lo tanto, se transcriben juntos, esto incluye a las familias miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208, miR-208b, miR-486 y miR-499 ubicadas en las regiones cromosómicas 20q13.33, 18q11.2 y 6p12.2, respectivamente.<sup>37</sup> La expresión de los miomiRs está controlada por los factores MRF, MYOD1, MYF5, MYF6 y MYOG, MEF2, SRF, MKL1 (leucemia megacarioblástica 1) y otros factores de transcripción asociados con los músculos.<sup>36</sup>

Durante el ejercicio o en los trastornos musculares se ha identificado una expresión elevada de miRNAs musculares en plasma y en suero. Anteriormente se propusieron algunos mecanismos que explican la liberación de los miRNAs a circulación, aunque dichos mecanismos aún se encuentran en estudio. Se sabe por experimentos realizados en ratones *mdx* (modelo murino de la DMD) que existen cuatro procesos responsables de niveles elevados de miomiRs en suero debido al daño en el músculo distrófico, los cuales incluyen; 1) Liberación del contenido celular después de la mionecrosis, 2) Fuga pasiva debido al deterioro del sarcolema, 3) Secreción anormal como consecuencia directa de la deficiencia de distrofina y 4) Liberación selectiva a través de mecanismos aún no determinados que acompañan a la diferenciación y a la regeneración muscular.<sup>40</sup>



**Fig. 5.** MiRNAs involucrados en la regeneración del músculo esquelético. Tomada y modificada de Ultimo S. y cols., 2018.

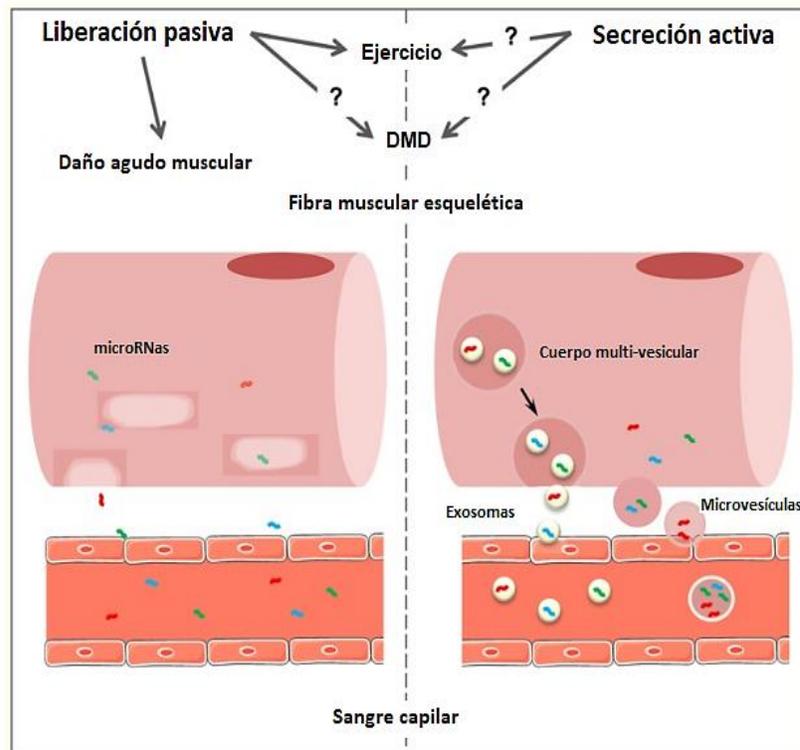
La función específica de cada miomiRs se describe en la siguiente tabla:

**Tabla 2.** Función de los miRNAs específicos de músculo esquelético. Tomada y modificada de Horak, M. y cols., 2016.

miomiRNAs	Función en el músculo esquelético	Genes diana
<b>miR-1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Progreso de la diferenciación de mioblastos.</li> <li>• Regeneración de la fibra muscular.</li> <li>• Regulación de la angiogénesis.</li> <li>• Pro-apoptosis.</li> <li>• Control del estrés oxidativo.</li> </ul>	<i>BDNF, CCND1, CCND2, FZD7, G6PD, GJA1, HACD3, HDAC4, HSPA1, IGF1, IGF1R, MAP4K3, MEOX2, MET, MMD, NFAT5, NOTCH3, PAX3, PAX7, POLA1, RARB, SARS, SMARCB1, SMARCD2, UTRN, VEGFA, YY1.</i>
<b>miR-133a</b> <b>miR-133b</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Promoción de la proliferación de mioblastos.</li> <li>• Diferenciación y fusión de mioblastos.</li> <li>• Regulación de corte y empalme alternativo.</li> <li>• Remodelación de la cromatina.</li> <li>• Regulación del destino celular.</li> <li>• Pro-apoptosis.</li> <li>• Control del metabolismo mitocondrial.</li> </ul>	<i>CALM1, DNM2, FAIM, FGFR1, FOXL2, IGF1R, MAML1, PFN2, PP2AC, PRDM16, PTBP2, RUNX2, SMARCD1, SP1, SRF, TRPS1, UCP2.</i>
<b>miR-206</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Promoción de la diferenciación de mioblastos.</li> <li>• Regeneración de mioblastos.</li> <li>• Regeneración de sinapsis neuromusculares.</li> <li>• Remodelación de la cromatina.</li> <li>• Anti-angiogénico.</li> <li>• Pro-apoptótico.</li> <li>• Control del estrés oxidativo.</li> <li>• Anti-migración.</li> </ul>	<i>BDNF, CCND1, CCND2, CLCN3, FSTL1, FZD7, G6PD, GJA1, HACD3, HDAC4, HMGB3, IGF1, IGFBP5, MAP4K3, MEOX2, MET, MMD, NFAT5, NGFR, NOTCH3, PAX3, PAX7, POLA1, RARB, SH3BGLR3, SMARCB1, SMARCD2, SNAI2, TIMP3, UTRN, VEGFA.</i>
<b>miR-208b</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desplazamiento de la fibra muscular.</li> <li>• Promoción del crecimiento muscular.</li> </ul>	<i>CBX1, MED13, MSTN, PURB, SOX6, SP3.</i>
<b>miR-486</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Promoción de la diferenciación y fusión de mioblastos.</li> <li>• Regulación de empalme alternativo.</li> <li>• Anti-apoptótico.</li> <li>• Pro-migración.</li> </ul>	<i>DOCK3, FOXO1, PAX7, PDGFRB, PTEN, SRSF1, SRSF3.</i>
<b>miR-499</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desplazamiento de la fibra muscular.</li> <li>• Promoción del crecimiento muscular.</li> </ul>	<i>CBX1, MAPK6, MED13, MSTN, PURB, SOX6, SP3.</i>

Actualmente, recientes investigaciones han determinado que tras la estimulación (ejercicio) o lesión, los miRNAs pueden ser liberados de la célula de forma activa (secreción) o pasiva (pérdida de membrana). Esto sugiere que los miRNAs extracelulares pueden tener efectos biológicos directos en otras células. Las vesículas extracelulares, como exosomas, microvesículas, lipoproteínas de alta densidad y cuerpos apoptóticos, son secretadas por la mayoría de las células y contienen diversas moléculas, incluidos los miRNAs como se observa en la **Figura 6**.<sup>31</sup>

Dichas vesículas se liberan en el espacio extracelular o a la circulación y pueden ser captadas por las células vecinas. Sus contenidos se liberan en el citosol de las células receptoras, donde los miRNAs pueden ejercer sus efectos. Por lo tanto, los miRNAs pueden participar en la comunicación de célula a célula de forma autocrina, paracrina o endocrina.<sup>34</sup> La alteración en la expresión de los miRNAs en los músculos con ausencia de la distrofina en la DMD contribuye a la fuga de miRNA hacia el torrente sanguíneo. Se ha considerado que la liberación de los miRNAs del músculo esquelético pueda ocurrir tanto por fuga como por secreción, ya que muchos de ellos están asociados con proteínas y lipoproteínas.<sup>39</sup>



**Fig. 6.** Mecanismos de liberación de los miRNAs. Tomada y modificada de Siracusa, J. y cols., 2018.

Se ha planteado la posibilidad de medir los niveles de expresión de los miRNAs séricos circulantes como miR-1, miR-133a y miR-206 que podrían ser específicos en las enfermedades musculares, sobre todo en distrofias musculares. Estos miRNAs se han propuesto como los nuevos y valiosos biomarcadores para establecer el diagnóstico, progreso y el monitoreo de la intervención terapéutica de la DMD.<sup>42</sup> Esta propuesta se basa en los hallazgos observados tanto en modelos animales de la DMD como en pacientes con esta distrofia, los cuales se describen a continuación.

## ANTECEDENTES

### Estudios realizados en modelos animales

El primer estudio fue realizado por Mizuno H. y cols., en el 2011 plantearon la hipótesis de que los niveles de expresión de miRNAs específicos de músculo y que se liberan a circulación, pueden ser útiles para monitorear la progresión de las enfermedades musculares. Para confirmar esta hipótesis, cuantificaron los niveles de expresión de miRNAs séricos en ratones macho *mdx* de 8 semanas de vida comparado con ratones silvestres, también estudiaron el modelo canino japonés de la distrofia muscular canina ligada al cromosoma (CXMDJ) y lo compararon contra un grupo de portadores y un control sano, los 3 grupos con edades de 2 a 10 meses. Los autores encontraron que los niveles de expresión de miR-1, -133a y -206 aumentaron en el suero en ambos modelos de la distrofia muscular, *mdx* y CXMDJ, de 10 hasta 100 veces en comparación con sus controles sanos.<sup>43</sup>

Este es uno de los primeros trabajos realizados en donde se plantea la posibilidad de utilizar a los miRNAs como biomarcadores para el monitoreo de la DMD. A pesar de que los fundamentos y procedimientos realizados son los adecuado, aún hay muchas interrogantes, principalmente por el hecho de que los autores no muestran el resultado cuantitativo de la expresión de los miR-1, miR-133a y miR-206 en los modelos animales, además, la hipótesis del estudio no se confirma.

En ese mismo año Cacchiarelli y col. 2011 propusieron que la terapia de omisión de exón permite la síntesis de distrofina en las fibras musculares y la recuperación de la correcta morfología e integridad del tejido muscular y como consecuencia disminuyen los miRNAs circulantes en la DMD. Para comprobar esta hipótesis realizaron experimentos con ratones jóvenes-adultos *mdx* de 6 semanas de edad a los que se les inyectó en la vena cauda un vector viral recombinante adenoasociado que portaba un constructo antisentido quimérico U1 (AAV # 23), se incluyeron como controles ratones *mdx* sin el AAV y ratones de tipo silvestre. Un mes después de la inyección del constructo, los ratones de los 3 grupos se sacrificaron para obtener biopsias musculares de gastrocnemio, diafragma, corazón y muestras de suero. Los resultados mostraron que con la

administración de AAV # 23 hubo una mejora morfológica de las fibras musculares. Además, la recuperación de la distrofina fue paralela con la disminución de los miRNAs musculares miR-1, miR-133 y miR-206 en suero hasta niveles similares a los del grupo silvestre. Esto parece indicar que la recuperación de la integridad muscular como consecuencia de la terapia de omisión de exón se acompaña de una disminución significativa en la liberación de miRNA al torrente sanguíneo.<sup>44</sup> Este estudio es relevante ya que la intervención llevada a cabo permitió que se planteara la posibilidad desarrollar nuevas terapéuticas encaminadas a la mejoría morfofuncional de las fibras musculares, lo que podría impactar en la calidad de vida de los pacientes con DMD.

Basados en el estudio anterior, los mismos autores<sup>37</sup> evaluaron otro miRNA asociado a la expresión del gen DMD, tal es el caso del miR-31, cuya función es reprimir la traducción de distrofina al unirse a la región 3' no traducida del gen *DMD*. En ese trabajo se demostró que el miR-31 está altamente expresado en la DMD y, por lo tanto, es un blanco terapéutico potencial para mejorar las estrategias actuales destinadas a recuperar la síntesis de distrofina y promover la diferenciación de las fibras musculares. El experimento se llevó a cabo en ratones *mdx* jóvenes (10 días de vida) a los que se les trató con el constructo Sponge 31 (terapia de omisión exón) y ratones de tipo silvestre de la misma edad, posteriormente, se sacrificaron y se tomó una biopsia de gastrocnemios en ambos grupos. Los resultados mostraron que en los músculos del ratón *mdx* existe una expresión elevada del miR-31, cuyos niveles fueron más altos (hasta 50 veces) en comparación con los controles de tipo silvestre ( $p < 0.05$ ). Finalmente, los autores sugieren que el miR-31 es parte de los circuitos que controlan la diferenciación muscular tardía, reprimiendo la síntesis de distrofina y probablemente otros marcadores de diferenciación terminal. Además, demostraron que el miR-31 está altamente expresado en los mioblastos (de los músculos distróficos del ratón *mdx*) debido a la regeneración intensiva mediada por la activación de células musculares satélites. Por lo tanto, cuando la síntesis de distrofina se rescata mediante la omisión de exón, la inhibición de la actividad del miR-31 aumenta la producción de la distrofina.<sup>45</sup>

Este estudio aporta conocimiento nuevo ya que muestra otra alternativa terapéutica para activar la síntesis de distrofina en la DMD. A pesar del gran impacto que puede tener la función del miR-31 sobre el estudio de la fisiopatología y el tratamiento, aún faltan estudios que permitan considerar a este miRNA dentro del grupo de los miomiRs.

### **Estudios realizados en pacientes humanos**

El primer estudio que analiza los miRNAs como potenciales biomarcadores en pacientes con DMD lo llevó a cabo Cacchiarelli y *col. en el 2011*. Los autores demostraron que los miRNAs expresados específicamente en las células musculares, son liberados en la sangre de pacientes con DMD como consecuencia de la degeneración muscular, y su cantidad era paralela a la gravedad de la

enfermedad. La expresión de los miRNAs se cuantificó a partir de muestras de suero de niños con DMD ( $n = 26$ ), Distrofia Muscular de Becker ( $n = 5$ ) y de niños sanos ( $n = 7$ ), con edades comprendidas entre 1 y 16 años. Para determinar si los miR-1, miR-133 y miR-206 pueden ser marcadores de progresión para la DMD, se realizó un análisis de correlación caso por caso entre los niveles de los miRNA y la Evaluación Ambulatoria de North Star (NSAA) que representa el estándar de oro para medir la capacidad motora funcional. Esta capacidad fue evaluada en 10 niños ambulatorios con DMD con rango de edad entre 3 y 6 años en el momento del diagnóstico molecular. Los autores encontraron una correlación inversa entre los niveles de los miRNA y la puntuación de NSAA (miR-1:  $r = -0.81$ ,  $p = 0.017$ ; miR-206:  $r = -0.80$ ,  $p = 0.019$ ; miR-133:  $r = -0.79$ ,  $p = 0.020$ ), lo que indica que una disminución progresiva del puntaje de NSAA está asociada con un aumento gradual de los niveles serológicos de estos miRNAs. Al llevar a cabo la correlación entre la edad y la expresión de los miRNAs se muestra una relación directa (miR-1:  $r = 0.68$ ,  $p = 0.039$ ; miR-206:  $r = 0.72$ ,  $p = 0.030$ ; miR-133:  $r = 0.75$ ,  $p = 0.025$ ) lo que sugiere que independientemente de la edad, el aumento en los niveles de los miRNAs se correlaciona con la gravedad del daño muscular. Por el contrario, la evaluación de los pacientes de mayor edad no ambulatorios ( $n = 2$ ) fue más complicada debido a las condiciones clínicas heterogéneas y a la pérdida progresiva de la masa muscular. En estos pacientes se observó una disminución de los niveles de miRNA en suero comparados con los pacientes más jóvenes con DMD, aunque los niveles eran más altos que las muestras de controles sanos.<sup>44</sup>

Los resultados de este estudio podrían ser de utilidad en la aplicación de los miRNAs como posible método no invasivo para el diagnóstico y monitoreo de la DMD. Sin embargo, presenta limitantes, la primera y más importante es que no refieren si los pacientes incluidos en el estudio se encontraban bajo algún tratamiento antiinflamatorio u antioxidante lo cual pudiera haber llegado a alterar los resultados obtenidos. En segundo lugar, únicamente utilizan una escala para la evaluación de la función motora, en este caso la NSAA, la cual se utiliza para medir la capacidad motora funcional de niños ambulatorios con DMD, además, se emplea como un indicador de la progresión de la enfermedad y los efectos del tratamiento. Así que, es importante que se debe tener una batería de pruebas clínicas que permitan evaluar el progreso de la enfermedad con mayor precisión usando escalas adicionales como Vignos, Medical Research Council (MRC) y Brooke.

Además, Cacchiarelli y cols en el mismo año, reportaron otro estudio en el cual plantearon la posibilidad de que la inhibición del miR-31 (el cual es capaz de reprimir la traducción de la distrofina) podría ser un blanco terapéutico para promover la síntesis de distrofina y la maduración de la fibra muscular. En este estudio cultivaron mioblastos *in vitro* provenientes de un paciente humano con DMD con eliminación de los exones 48–50 los cuales se infectaron con el constructo U1 # 51 capaz de inducir la omisión del exón 51 y restablecer la síntesis de distrofina. Asimismo, determinaron si

la síntesis de distrofina podría mejorarse aún, más reduciendo los niveles del miR-31 por medio del constructo Sponge-31. Los resultados de qRT-PCR (PCR cuantitativa) identificaron la disminución de la expresión del miR-31, así como un aumento en la síntesis de distrofina. Por lo tanto, la síntesis de distrofina a través de la omisión de exón y la inhibición de la actividad de miR-31 aumentó la producción de distrofina.<sup>45</sup>

Este trabajo plantea la propuesta del uso de terapias génicas que beneficiarán en cierto grado al paciente con DMD. A pesar de que el miR-31 no es uno de los miRNAs usualmente evaluados, es importante explorar otras alternativas que estén enfocadas en recuperar la síntesis de distrofina mediante nuevas terapias génicas. Aunque el estudio aporta conocimiento nuevo, sin embargo, los autores no mencionan las condiciones clínicas del paciente al cual se le tomó la biopsia de músculo, como la edad, talla, peso, tratamiento farmacológico (glucocorticoides) o consumo de suplementos alimenticios (por ejemplo, antioxidantes) o si aún mantiene la deambulación o no, además del grado de afectación muscular.

Posteriormente, Hu J. y cols. 2014 plantearon la hipótesis de que los miRNAs específicos del músculo esquelético, principalmente el miR-1, -133 y -206, pueden ser útiles para el monitoreo de la DMD. Mencionan que en la actualidad el biomarcador disponible para evaluar el daño muscular ocasionado por la falta de distrofina es la CK, sin embargo, su uso se ve limitado por la baja especificidad en la patología ya que su elevación puede estar condicionada por diferentes situaciones. Así que, los autores plantearon cuantificar el contenido de miRNAs circulantes específicos de músculo en el suero de niños con DMD y analizar si existe alguna relación entre la expresión de estos miRNAs con las características clínicas de los pacientes. Para esto, se llevó a cabo un ensayo clínico aleatorizado y controlado en el que se incluyeron a 39 niños con DMD (con edades comprendidas entre 4 y 11 años que pudieran caminar sin ayuda, que no tuvieran problemas de aprendizaje o del comportamiento y que no estuvieran bajo tratamiento con glucocorticoides) y a 36 niños sanos de la misma edad. La fuerza muscular de las extremidades inferiores se midió utilizando el sistema de calificación del MRC. Se tomaron muestras de sangre para cuantificar el nivel de expresión de los miRNAs utilizando RT-PCR (PCR transcriptasa reversa), así como los niveles de CK.

Los resultados mostraron que los niveles de expresión del miR-1, el miR-133 y el miR-206 fueron más altos en el suero de niños con DMD (miR-1:  $2.67 \pm 1.14$ ; miR-133:  $2.16 \pm 0.80$ ; miR-206:  $3.20 \pm 1.20$ ) que los de los controles (miR-1:  $1.13 \pm 0.29$ ; miR-133:  $1.15 \pm 0.34$ ; miR-206:  $1.15 \pm 0.30$ ) ( $p < 0.01$ ). Por otro lado, la relación de la expresión de cada miRNA con las características clínicas de los niños con DMD mostró que la expresión del miR-1, el miR-133 y el miR-206 no tenía relación con la edad ( $p > 0.05$ ), pero sí hubo una correlación inversa significativa con la fuerza muscular (flexión de la cadera y extensión de la rodilla; miR-1:  $r = -0.34$  y  $0.40$ ,  $p = 0.04$  y  $0.02$ ; miR-133,  $r =$

-0.21 y 0.23,  $p = 0.22$  y  $0.19$ ; miR-206:  $r = 0.43$  y  $r = 0.43$ ,  $p = 0.01$  y  $p = 0.01$  respectivamente), con la función muscular (tiempo en caminar 10 m y tiempo para subir 4 pasos, miR-1:  $r = 0.29$  y  $0.33$ ,  $p = 0.08$  y  $0.05$ ; miR-133:  $r = 0.35$  y  $0.29$ ,  $p = 0.04$  y  $0.16$ ; miR-206:  $r = 0.44$  y  $0.39$ ,  $p = 0.01$  y  $0.02$  respectivamente) y con la calidad de vida (auto informe del niño e informe del cuidador primario, miR-1:  $r = -0.34$  y  $0.35$ ,  $p = 0.04$  y  $p = 0.04$ ; miR-133:  $r = 0.50$  y  $0.56$ ,  $p = <0.01$  y  $p = <0.01$ ; miR-206:  $r = 0.51$  y  $0.48$ ,  $p = <0.01$  y  $p = <0.01$  respectivamente). Los autores concluyen que la cuantificación de los miRNAs circulantes específicos de músculo son mejores marcadores potenciales que la CK, ya que muestran fluctuaciones mejor relacionadas con la condición patológica de la enfermedad, están ligeramente influenciadas por la edad y el estrés celular, su expresión es estable y duradera durante mucho tiempo en suero.<sup>46</sup>

Aunque este estudio propone algunos miRNAs candidatos para monitorear y evaluar la función muscular de la DMD, es necesario diseñar estudios en los que se incluya más de una escala para evaluar diferentes grupos musculares, tales escalas podrían ser la de Vignos y/o Brookes. Además, es necesario establecer con claridad los indicadores de la calidad de vida que se asocian a la expresión de los miRNAs. A pesar de que se menciona que los pacientes seleccionados no recibieron tratamiento con glucocorticoides, los autores no consideraron si alguno de ellos consumía suplementos alimenticios ricos en antioxidantes ya que éstos podrían modificar la respuesta antioxidante en los pacientes con DMD y, por lo tanto, impactar en los resultados. Finalmente, el incluir solamente a pacientes ambulatorios de cierto rango de edad limita el estudio, ya que no permite conocer si la función muscular deteriorada en los no ambulatorios se asocia a la expresión de los miRNAs.

También Li, X. y cols., en el 2014 apoyaron la hipótesis de que los miRNAs (miR-1, miR-133 y miR-206) podrían ser indicadores de la fisiopatología de la enfermedad y tener el potencial como biomarcadores pronósticos. Su hipótesis se basa en que los miRNAs desempeñan un papel importante en la proliferación, diferenciación y regeneración muscular de los mioblastos, que son eventos clave en la patogénesis de la DMD. Debido a esto, los autores trataron de identificar a los miRNAs como posibles biomarcadores circulantes en el diagnóstico y pronóstico de la DMD. Para probar la hipótesis, examinaron los niveles séricos de los miRNAs clásicos, así como del miR-499 (que se expresa principalmente en el músculo esquelético lento y en el músculo cardíaco) y miR-208 (miR-208a se expresa principalmente en el músculo cardíaco y miR-208b en el músculo esquelético lento) en pacientes con DMD ( $n = 52$ ), y en pacientes con DMB (distrofia muscular de Becker) ( $n = 15$ ) que no se encontraban bajo tratamiento con glucocorticoides y mantenían una deambulación adecuada y en niños sanos o grupo control ( $n = 23$ ) de 1 y 14 años de edad. Los resultados de este estudio demostraron que el miR-1, miR-133, miR-206, miR-208b y miR-499 circulantes presentaban una elevación significativa en pacientes con DMD en comparación con el

grupo de niños sanos ( $p < 0.0001$ ). Aunque en los pacientes con DMB, sólo el nivel de miR-499 ( $p < 0.05$ ) fue significativamente mayor que el observado en el suero del grupo control. Se compararon los niveles de miR-1 miR-133, miR-208a y miR208b entre los grupos de DMD y DMB y se encontró una tendencia significativa a ser más altos en DMD que en DMB. Al analizar la correlación entre los niveles séricos de los miRNAs con la edad, se encontró que el nivel de los miR-206, miR-499 y miR-208b se correlaciona significativamente ( $p < 0.05$ ) con la edad (2-6 años) en pacientes con DMD (miR-206:  $r = 0.4545$ ; miR-499:  $r = 0.5219$  y miR-208b:  $r = 0.4664$ ). Asimismo, en el grupo de edad de 2 a 6 años, se encontró que el porcentaje de fibras musculares de contracción rápida tipo IIa y tipo IIb (las cuales poseen un gran diámetro, contienen miofibrillas densas, reservas de glucógeno, mitocondrias relativamente escasas y una fuerza de contracción muy rápida) se correlaciona con la edad ( $r = 0.6598$ ,  $p = 0.0074$ ), es decir a medida que aumenta la edad, también aumenta este tipo de fibras. Además, el porcentaje de fibras musculares tipo IIc (poseen una alta actividad oxidativa y moderada capacidad glucolítica) aumentó gradualmente ( $r = 0.5928$ ,  $p = 0.0199$ ) con la edad en este mismo grupo. Mientras que en pacientes mayores de 6 años el porcentaje de fibra muscular tipo IIc disminuyó ( $r = -0.5996$ ,  $p = 0.0303$ ) con la edad. Los resultados de este estudio sugieren que la regeneración muscular, es más activa en pacientes entre las edades de 2 a 6 años debido a la degeneración continua, mientras que en pacientes mayores  $> 6$  años, los ciclos de degeneración y regeneración agotan la reserva de células satélite, ocasionando una pérdida de masa muscular. Al correlacionar el tipo de fibra muscular con los niveles séricos de los miRNAs, se encontró que los niveles séricos de miR-206, miR-499 y miR-208b se correlacionaron ( $p < 0.05$ ) positivamente con el porcentaje de fibras musculares tipo IIc en pacientes con DMD entre 2 y 6 años (miR-206:  $r = 0.7201$ ; miR-499:  $r = 0.6122$  y miR-208b:  $r = 0.6088$ ) lo que sugiere que estos miRNAs podrían ser de utilidad como biomarcadores del tejido muscular “in situ” en este grupo de edad que implica etapas tempranas de la distrofia. Además, se observó una correlación ( $p < 0.05$ ) positiva entre el nivel sérico de miR-499 y miR-208b con el porcentaje de fibras musculares de contracción lenta (tipo I) (miR-499:  $r = 0.7047$  y miR-208b:  $r = 0.6856$ ) y negativamente con la fibra muscular de contracción rápida (tipo IIa y IIb) en pacientes con DMD mayores de 6 años (miR-499:  $r = -0.6931$  y miR-208b:  $r = -0.6153$ ).<sup>47</sup>

La relevancia de este estudio es su diseño ya que no sólo mide los miRNAs séricos, sino que también se examina la composición de las fibras musculares. A pesar de que la biopsia es un método invasivo y utilizado únicamente como última opción para los pacientes con DMD, ésta puede proporcionar información relevante sobre la progresión de la enfermedad.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La DMD representa una entidad fatal para aquellos que la padecen, ya que, al ser una enfermedad con un deterioro progresivo de la función muscular, el pronóstico, las complicaciones y la calidad de vida se ven influenciados por el tiempo en que se establezca un tratamiento.

A pesar del extenso conocimiento que se tiene acerca de la fisiopatología en esta entidad, los métodos de control y el monitoreo de la enfermedad son muy limitados. Los miRNAs podrían representar hoy en día un apoyo para cumplir con las especificaciones antes mencionadas en la DMD. Los antecedentes revisados sustentan la posibilidad de poder utilizar al miR-31 y a los miomiRNAs (miR-1, miR-133 y miR-206) como un complemento de una batería de pruebas para el monitoreo, progreso y respuesta a la terapéutica utilizada en la DMD.

No obstante, la evidencia mostrada por los antecedentes mencionados, nos muestran que los estudios llevados a cabo únicamente se realizaron en pacientes que aún conservan la función muscular, excluyendo a aquellos con un deterioro importante de la capacidad muscular. Además, la evaluación muscular está limitada al uso de una sola escala, incluyen pacientes con tratamiento a base de glucocorticoides y no refieren la ingesta de suplementos alimenticios ricos en antioxidantes. Debido a esto, el tener un control estricto de las variables anteriores nos permitirá tener un mayor entendimiento del papel del miR-31 y los miomiRNAs en la fisiopatología de la enfermedad y de igual manera ayudarán al establecimiento de alguna relación con la función muscular.

Así que, el planteamiento del problema nos lleva a la siguiente pregunta de investigación:

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Existe asociación entre la expresión del miR-31 y de los miomiRNAs circulantes con la función muscular en la distrofia muscular de Duchenne?

## **JUSTIFICACIÓN**

La distrofia muscular de Duchenne representa una de las entidades neuromusculares degenerativas con mayor prevalencia en la edad pediátrica, es progresiva y con un mal pronóstico que compromete la vida de los pacientes. Si bien es cierto que los conocimientos que se han obtenido a lo largo de los años acerca de la fisiopatología en esta entidad son bastante amplios, el diagnóstico y el tratamiento siguen siendo uno de los mayores retos a vencer en esta entidad.

Los diagnósticos con los que se cuenta hoy en día son limitados e inespecíficos, lo que conlleva a un retraso en la identificación temprana de la patología y, por lo tanto, el manejo adecuado de las complicaciones. Los estudios basados en los miomiRNAs tienen un auge en la actualidad, ya que

su expresión sérica podría funcionar para el monitoreo y progreso de la enfermedad y además pueden ser un blanco terapéutico efectivo.

Además, estudios recientes basados en el miR-31 han demostrado que su expresión está relacionada con la diferenciación muscular tardía, así como en la represión de la síntesis de distrofina y probablemente otros marcadores de diferenciación terminal muscular.

Por lo tanto, la identificación de un panel de miomiRNAs específicos para el monitoreo y progreso de la DMD, en conjunto con las estrategias con las que se cuenta actualmente, podrían permitirnos generar un campo de estudio enfocado a investigar el control de dichos miRNAs desde etapas tempranas de la enfermedad. Esto con la finalidad de disminuir o enlentecer las complicaciones propias de la enfermedad para mejorar la calidad de vida de los pacientes con DMD.

## **HIPÓTESIS**

La expresión del miR-31 y de los miomiRNAs circulantes se asocia de manera directa con una mejor función muscular en los pacientes con distrofia muscular de Duchenne.

## **OBJETIVO GENERAL**

Demostrar si existe asociación entre la expresión del miR-31 y de los miomiRNAs circulantes con la función muscular en los pacientes con distrofia muscular de Duchenne.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar los niveles de expresión del miR-31 y de los miomiRNAs circulantes (miR-1, miR-133 y miR-206) entre los pacientes con diferente función muscular.
- Correlacionar los niveles del miR-31 y de los miomiRNAs circulantes con los marcadores de daño muscular (CK, AST y ALT).
- Analizar si existe correlación entre la expresión del miR-31 con la expresión de los miomiRNAs circulantes.
- Correlacionar los niveles del miR-31 y de los miomiRNAs expresados en circulación con la función muscular.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Diseño del estudio:**

Cohorte anidada, analítico, observacional, transversal y prolectivo.

## Lugar del estudio

El estudio se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Nutrición (UIMN) del Hospital de Pediatría Dr. Silvestre Frenk Freund del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMNSXXI), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

## Población de estudio

Niños con edades comprendidas entre 3 a 17 años con diagnóstico de DMD establecido provenientes del Hospital de Pediatría Dr. Silvestre Frenk Freund del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, del Hospital General Dr. Gaudencio Garza, Centro Médico Nacional, La Raza, IMSS.

## Criterios de selección

Criterios de inclusión

- Consentimiento y asentimiento. **(Anexo 1 y anexo 2)**
- Diagnóstico clínico y genético molecular de la DMD.
- No estar bajo tratamiento con glucocorticoides u otros fármacos antiinflamatorios.
- No consumir suplementos alimenticios (específicamente antioxidantes).

Criterios de exclusión

- Alguna condición patológica que comprometa la vida del paciente.
- Decisión propia de no participar en el estudio.

## Estimación del tamaño de la muestra

Para el cálculo del tamaño de la muestra nos basamos en el estudio realizado por Hu J. y cols. 2014 en donde se evaluó la expresión de los miomiRNAs séricos miR-1, miR-133 y miR-206 en 39 niños con DMD (edad de 4-11 años). Para calcular el tamaño de la muestra se consideró la asociación del miR-206 con el tiempo empleado por el paciente para realizar una caminata de 10 m. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$N = \left( \frac{Z_{1-\frac{\alpha}{2}} + Z_{1-\beta}}{\frac{1}{2} \ln \left( \frac{1+r}{1-r} \right)} \right)^2 + 3 = \left( \frac{1.96 + 0.84}{\frac{1}{2} \ln \left( \frac{1+(-0.44)}{1-(-0.44)} \right)} \right)^2 + 3 = 38.19 \quad N = 38$$

En donde:

**N** = tamaño de la muestra

**Z $\alpha$**  = 0.05 = 1.96

**Z $\beta$**  = 0.20 = 0.84

**r** = -0.44

## Definición de variables

**Independiente:** Función muscular.

*Definición conceptual:* Para términos de esta investigación la función muscular está dada por la integridad de todos los componentes del tejido muscular (esquelético o cardíaco) cuyas funciones básicas son crear fuerza y movimiento, sostén del tejido óseo para mantener la postura y controlar el movimiento voluntario. Además, contribuye al metabolismo y al almacenamiento de energía.<sup>48</sup>

*Definición operacional:* Se evaluó a través de los resultados obtenidos utilizando las siguientes escalas:

- Escala de Vignos: establece una clasificación funcional, evalúa las extremidades inferiores y establece valores que van desde el 1 al 10 en donde la cifra más alta representa la afección más severa, **(Anexo 3)**.
- Escala de Brookes: escala de evaluación de las extremidades superiores con valores que van desde 1 al 5, el nivel más alto representa una afección más severa, **(Anexo 3)**.

*Escala de medición:* Variable cuantitativa discreta; escala de Vignos de 1 a 10 puntos y escala de Brookes de 1 a 5 puntos.

**Independiente:** Fuerza muscular.

*Definición conceptual:* Es definida como la fuerza máxima que un músculo o un grupo muscular puede generar a una velocidad específica.<sup>49</sup>

*Definición operacional:* Se evaluó a través de los resultados obtenidos utilizando las siguientes escalas:

- Sistema de clasificación de la función motora gruesa (GMFCS), evalúa el movimiento que se inicia de manera voluntaria. Este sistema establece niveles que van desde el 1 hasta el 5 en donde el nivel más alto representa la ausencia de deambulación, **(Anexo 3)**.
- Medical Research Council (MRC), califica la potencia muscular en una escala de 0 a 5 en relación con el máximo esperado para ese músculo, **(Anexo 3)**.

*Escala de medición:* Variable cuantitativa discreta; GMFCS de 1 a 5 puntos y MRC de 0 a 5 puntos.

**Dependiente:** Expresión del miR-31 y de los miomiRNAs circulantes:

*Definición conceptual:* Los miomiRNAs son una clase de pequeños RNAs no codificantes compuestos de 17 a 24 nucleótidos. El miR-1, miR-133, y el miR-206 son los miRNAs específicos de músculo y se consideran marcadores de la miogénesis durante la regeneración muscular. Durante los trastornos musculares (como las distrofias musculares) estos presentan una expresión elevada en plasma y en suero.<sup>31, 40, 50</sup>

*Definición operación:* Se midió a través de PCR en tiempo real.

*Escala de medición:* Unidades relativas de expresión.

## **Variables confusoras**

- Hábitos alimenticios, específicamente aquellos alimentos ricos en antioxidantes.

## **Grupos de estudio**

- Ambulatorio y no ambulatorio: aquellos pacientes que no presentaran limitación para caminar o que tuvieran alguna dificultad para subir y bajar escaleras, pero con la capacidad de poder realizar la deambulaci3n fueron asignados en el grupo ambulatorio. Por el contrario, aquellos pacientes que confinados a una silla de ruedas se asignaron en el grupo no ambulatorio.
- Edad: De acuerdo con el estudio que realiz3 Mazzone et al. en 2011 ellos identificaron que existe una heterogeneidad en la tasa de progresi3n de la DMD que se ve influenciada en parte por la edad, por tal motivo, nuestros pacientes fueron clasificados en 2 grupos: aquellos con una edad  $\leq 7$  a1os y otro con  $> 7$  a1os.

## **Procedimientos**

El paciente fue citado en el Laboratorio de Nutrici3n Molecular de la UIMN del Hospital de Pediatr3a Dr. Silvestre Frenk Freund del CMNS XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social en ayuno de 8 horas. La participaci3n de los pacientes en este estudio fue confirmada mediante una carta de consentimiento y asentimiento (3sta 3ltima realizada a los pacientes con edad mayor o igual a ocho a1os). La carta de consentimiento fue firmada por los padres o tutores de los pacientes despu3s de haber recibido una explicaci3n con detalle de los fundamentos del estudio, procedimientos, beneficios proporcionados por su participaci3n, el derecho a la confidencialidad y el derecho a retirarse del estudio en cualquier momento.

Posteriormente, se llev3 a cabo la extracci3n de una muestra de sangre perif3rica por punci3n intravenosa en el paciente. La cantidad obtenida fue de 3 mL, los cuales se colectaron en un tubo BD Vacutainer® SST color amarillo con gel separador. Este se dej3 reposar por 5 minutos a temperatura ambiente con la finalidad de obtener un co3gulo sangu3neo. Una vez formado el co3gulo, el tubo se coloc3 dentro de una centrifuga (modelo 5403, EPPENDORF®, Alemania) a 3,500 rpm a 4° C, para la obtenci3n del suero de la muestra tomada. El suero se almacen3 en al3cuotas de 200 microlitros en microtubos a -70 °C. Como parte de los beneficios para los pacientes, se midieron las concentraciones de glucosa, triglic3ridos y colesterol total en sangre.

Las mediciones antropom3tricas, es decir, el peso (kg) corporal y la talla (m) fueron realizadas por nutriólogos de acuerdo con las capacidades de deambulaci3n de cada paciente.

Para los pacientes que pudieron mantenerse erguidos, la talla se midi3 con un estadi3metro montado en la pared (Modelo 208, Seca®). Para sujetos no ambulatorios, la longitud se midi3 en

una mesa horizontal con el niño en posición supina utilizando el método de suma de partes del cuerpo con una cinta métrica Seca® 201. El peso del sujeto ambulatorio se determinó mediante una balanza digital (Modelo BWB-700; TANITA, Tokio, Japón), mientras que los niños en silla de ruedas se pesaron en una balanza en silla de ruedas (modelo 954, Seca®, EUA) con ropa ligera y sin zapatos. Con estos datos se calculó el índice de masa corporal (percentil de IMC) basado en los percentiles de la OMS de peso para la edad, **(Anexo 4)**.

Una vez obtenidos estos datos se procedió a aplicar los siguientes cuestionarios:

Evaluación de fuerza y función muscular: Como se mencionó anteriormente en el apartado de “función motora y muscular”, la fuerza y función muscular fueron medidas mediante el sistema de clasificación en la escala de Vignos **(Anexo 3)**, Brookes **(Anexo 3)**, GMFCS **(Anexo 3)** y MRC **(Anexo 3)**. Dichas escalas fueron aplicadas por médicos genetistas. A partir de los resultados obtenidos, el paciente se clasificó en unos de los 2 grupos siguientes: ambulatorio y no ambulatorio (silla de ruedas) o de acuerdo con el grupo de edad ( $\leq 7$  años y otro con  $> 7$  años).

- Obtención de datos generales y antecedentes heredofamiliares: Nombre completo, fecha de nacimiento, edad, dirección, número telefónico, escolaridad, origen tanto del paciente como de los padres, antecedentes heredofamiliares, la edad de inicio de los síntomas, así como la edad al diagnóstico, antecedentes patológicos y un árbol genealógico **(Anexo 5)**.

## **Técnicas de laboratorio**

### ***Expresión del miR-31 y de los miomiRNAs***

Para llevar a cabo la medición de los niveles de expresión del miR-31 y de los miomiRNAs primero se extrajo el RNA total a partir del suero obtenido. Posteriormente, se realizó la síntesis del cDNA que fue necesaria para llevar a cabo la cuantificación de la expresión de dichos miRNAs por reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR). Dicho procedimiento se explica con mayor detalle a continuación:

#### *Extracción de RNA total*

La extracción del RNA total se llevó a cabo a partir del suero sanguíneo usando el estuche comercial miRNeasy Serum/Plasma de QIAGEN®, Alemania, de la siguiente manera:

- 1) Las muestras se descongelaron paulatinamente.
- 2) A la muestra de 200  $\mu$ L se le agregaron 5 volúmenes de reactivo de lisis QIAzol y posteriormente se agitó mediante vórtex o pipeteo.
- 3) La muestra se incubó a temperatura ambiente (15–25 °C) durante 5 minutos.

- 4) A la muestra se le agregaron 3.5  $\mu\text{L}$  del reactivo miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control  $\text{\textcircled{R}}$  a  $1.6 \times 10^8$  copias/ $\mu\text{L}$ . A la muestra inicial, se le agregó un volumen igual, posteriormente se agitó vigorosamente por 15 segundos.
- 5) La muestra resultante se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 minutos y después se centrifugó durante 15 minutos a  $12,000 \times g$  a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .
- 6) La fase acuosa superior obtenida se transfirió a un tubo nuevo de recolección cuidando de no arrastrar alguna interfase. Posteriormente, se agregaron 1.5 volúmenes de etanol al 100% y se mezclaron por pipeteo.
- 7) A partir de la muestra, se tomaron hasta 700  $\mu\text{L}$  y se colocaron en una columna de centrifugación RNeasy MinElute $\text{\textcircled{R}}$  sobre un tubo de recolección de 2 mL. Posteriormente, este volumen se eluyó a través de la columna por centrifugación a 9450 rpm durante 15 segundos a temperatura ambiente desechando el eluido. Este paso se repitió usando el resto de la columna.
- 8) A la columna de centrifugación RNeasy MinElute $\text{\textcircled{R}}$  se le agregaron 700  $\mu\text{L}$  de Buffer RWT y nuevamente se centrifugó durante 15 segundos a 9450 rpm desechando el eluido.
- 9) En la misma columna de centrifugación RNeasy MinElute $\text{\textcircled{R}}$  se pipetearon 500  $\mu\text{L}$  de buffer RPE y nuevamente se centrifugó durante 15 segundos a 9450 rpm desechando el eluido.
- 10) A la misma columna de centrifugación RNeasy MinElute $\text{\textcircled{R}}$  se le agregaron 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 80%, posteriormente se centrifugó durante 2 minutos a 9450 rpm desechando el eluido y el tubo de recolección.
- 11) En la misma columna de centrifugación RNeasy MinElute $\text{\textcircled{R}}$  se colocó en un tubo nuevo de recolección de 2 mL y se centrifugó a la máxima velocidad durante 5 minutos para secar la membrana desechando el eluido y el tubo de recolección.
- 12) En la misma columna de centrifugación RNeasy MinElute $\text{\textcircled{R}}$  se colocó en un nuevo tubo de recolección de 1.5 mL y se le agregaron 14  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNasa directamente al centro de la membrana de la columna. La columna se centrifugó durante 1 minuto a la máxima velocidad para eluir el RNA.
- 13) El RNA extraído se cuantificó con el Espectrofotómetro (Nanodrop) de Microplaca de EPOCH2TC $\text{\textcircled{R}}$  de BioTek, EUA.

### **Síntesis de cDNA**

La síntesis de cDNA se realizó mediante el estuche TaqMan MicroRNA Reverse Transcription de Applied Biosystems $\text{\textcircled{R}}$  (Alemania) de la siguiente manera:

Para preparar la mezcla de reacción de transcripción reversa (TR) se realizó lo siguiente:

1. En un tubo de microcentrífuga se preparó una mezcla con 0.15  $\mu\text{L}$  de dNTPs, 1  $\mu\text{L}$  de transcriptasa reversa MultiScribe®, 1.5  $\mu\text{L}$  de buffer RT, 0,19  $\mu\text{L}$  de inhibidor de RNasa y 4.16  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas obteniendo un volumen total de la mezcla RT de 7  $\mu\text{L}$ .
2. La mezcla se homogeneizó de forma manual y después se centrifugó brevemente para depositar el contenido en el fondo del tubo. Después de esto, el tubo se colocó en hielo.

Para preparar la reacción TR:

1. Del Primer RT 5 $\times$  se obtuvieron 3  $\mu\text{L}$  y se combinaron con 5  $\mu\text{L}$  de plantilla bicatenaria (mostradas en la **Tabla 3**) en un tubo de reacción (5  $\mu\text{L}$  deben contener 1–10 ng de plantilla bicatenaria). Se mezclaron adecuadamente y después se centrifugaron brevemente para depositar el contenido en el fondo del tubo.
2. La muestra se incubó a 85 °C durante 5 minutos y posteriormente a 60 °C durante 5 minutos para luego colocarla en hielo y volverla a incubar.
3. A la mezcla obtenida se le agregaron 7  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción TR a cada tubo de reacción y después se centrifugó brevemente para depositar el contenido en el fondo de los tubos. Los tubos se colocaron en hielo.
4. Finalmente, la mezcla se sometió al siguiente programa de calentamiento en un termociclador (LightCycler®, Roche, Alemania): La fase de TR se realizó con una temperatura de 16 °C por 30 min y después a 42 °C, posteriormente a una temperatura de 85 °C por 5 min y la fase de mantenimiento a 4 °C.
5. El producto de la reacción RT se almacenó a una temperatura de entre –25 y –15 °C durante máximo una semana.

**Tabla 3.** Lista de secuencias de miRNAs maduros.

Ensayo	ID en miRBase	Número de acceso en miRBase	Secuencia
<i>miRNAs de estudio</i>			
2222	hsa-miR-1-3p	MIMAT0000416	UggAAUgUAAAgAAg UAUgUAU
2438	hsa-miR-21-3p	MIMAT0004494	CAACACCAgUCgAU gggCUgU
2279	hsa-miR-31-5p	MIMAT0000089	AggCAAgAUgCUggC AUAgCU
2216	hsa-miR-128-3p	MIMAT0000424	UCACAgUgAACCGgU CUCUUU
2246	hsa-miR-133a-3p	MIMAT0000427	UUUggUCCCCUUCA ACCAgCUg
2676	hsa-miR-144-3p	MIMAT0000436	UACAgUAUAgAUgA UgUACU

510	hsa-miR-206	MIMAT0000462	UggAAUgUAAggAAg UgUgUgg
<i>miRNA de referencia</i>			
1973	RNA U6	U6 snRNA	107 nucleótidos

### Amplificación por PCR

A partir del cDNA obtenido se realizó el análisis de expresión por qRT-PCR con el estuche comercial TaqMan de Applied Biosystems® (Alemania) de la siguiente forma:

1. Las muestras de cDNA y la mezcla de RT se descongelaron, se agitaron suavemente y luego se centrifugaron brevemente para llevar el contenido al fondo del tubo.
2. En un tubo de microcentrífuga se colocaron los siguientes reactivos: 0.50 µL del TaqMan Small RNA Assay (20X)®, 5 µL de la mezcla de RT-PCR, 3.84 µL de agua libre de nucleasas obteniendo un volumen total de la mezcla de reacción de PCR de 9.34 µL.
3. La mezcla de PCR se agitó en vórtex para homogeneizarla, después se centrifugó brevemente para depositar el contenido en el fondo del tubo.
4. La amplificación se inició activando la DNA polimerasa a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos, cada uno de los cuales consistió en desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos y la extensión a 60 °C durante 60 segundos. Finalmente, se realizó una renaturalización que consistió en 95 °C durante 10 segundos, 65 °C durante 60 segundos y 95 °C durante 1 segundo.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron con el programa SPSS v24.0. (IBM Corp. Released 2016). Todas las pruebas se realizaron bajo intervalos de confianza del 95% y se consideró un valor alfa < 0.05.

Para todos los análisis estadísticos primeramente se exploró la distribución Gaussiana de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk ( $N < 30$ ).

Para llevar a cabo el análisis de comparación de los miomiRNAs en los 2 grupos (ambulatorio y no ambulatorio) se utilizó la prueba de análisis de  $t$  de Student cuando los datos mostraron una distribución normal. Por el contrario, cuando los datos no tuvieron una distribución normal se realizó la prueba U de Mann-Whitney. Para los análisis de correlación entre los miomiRNAs y la función muscular se realizó la correlación de Pearson cuando los datos tuvieron una distribución normal. En contraste, si los datos no tuvieron una distribución normal se realizó una correlación de Spearman.

## ASPECTOS ÉTICOS

### Tipo de riesgo para los pacientes:

De acuerdo con el Reglamento de la Ley General De Salud en materia de Investigación para la Salud, Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, esta investigación se consideró de riesgo **mínimo** debido a que se trata de un estudio prospectivo en el que se realizan procedimientos comunes en exámenes físicos o psicológicos de diagnósticos o tratamiento rutinarios, como pesar al sujeto, extracción de sangre por punción venosa en niños y adolescentes en buen estado de salud con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 450 ml en dos meses, ejercicio moderado (esfuerzo moderado que acelera perceptiblemente el corazón como andar a paso ligero, montar en bicicleta o bailar) en voluntarios sanos.

### Carta de consentimiento

Consentimiento por escrito:

- **A los Padres o tutores** se les otorgó un consentimiento de informado en el que se indicó debidamente los objetivos, métodos, posibles beneficios y riesgos previsibles del experimento, así como la posibilidad de abstenerse de participar o retirarse en cualquier momento. **(Anexo 1)**
- **A los pacientes de 8 a 17 años** se les entregó una carta de asentimiento en donde se explicó con lenguaje comprensible los objetivos, beneficios y riesgos potenciales del experimento. El paciente dio su asentimiento a participar o no en la investigación, además del consentimiento del representante legal, **(Anexo 2)**.

### Registro ante la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS:

R-2018-785-089.

### Beneficios de participación:

- Realización y explicación del diagnóstico molecular.
- Información sobre la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre.
- Asesoramiento nutricional llevado a cabo por un Nutriólogo.

## RESULTADOS

### Edad, antropometría y marcadores de daño muscular

En la **Tabla 4** se muestran la edad, los datos antropométricos, los marcadores de daño muscular y los puntajes de las escalas de función y fuerza muscular en los grupos de pacientes ambulatorios y no ambulatorios. Los resultados nos muestran que la edad, el peso corporal, la talla y los puntajes de las escalas de Brooke, GMFCS y Vignos fueron significativamente mayores y el puntaje de la escala de MRC significativamente menor, en el grupo de pacientes no ambulatorios en comparación con el grupo ambulatorio. Por el contrario, podemos observar que los valores de CK y las transaminasas (AST y ALT) fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes ambulatorios en comparación con los no ambulatorios ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 4.** Edad, antropometría, marcadores de daño muscular y escalas de fuerza y función muscular en pacientes ambulatorios y no ambulatorios con DMD.

VARIABLE	GRUPO AMBULATORIO	GRUPO NO AMBULATORIO	VALOR DE $p$
<b>Edad, años</b>			
	6.58 ± 2.57	13.18 ± 1.3	<0.001 <sup>a</sup>
<b>Antropometría</b>			
<b>Peso corporal</b> (Kg)	17.95 (11.70, 48.8)	39.2 (22.2, 53.4)	0.006 <sup>b</sup>
Talla (cm)	111.10 ± 16.33	149.48 ± 14.08	<0.001 <sup>a</sup>
<b>Percentil de IMC</b>	31.5 (1, 97)	6 (1, 77)	0.090 <sup>b</sup>
<b>Marcadores de daño muscular</b>			
<b>CK</b> (U/L)	14,661 ± 7371	5,842.67 ± 1,601	0.009 <sup>a</sup>
<b>AST</b> (U/L)	199.61 ± 66.77	97.67 ± 18.82	0.001 <sup>a</sup>
<b>ALT</b> (U/L)	268.22 ± 95.47	83.67 ± 32.13	<0.001 <sup>a</sup>
<b>Escalas de fuerza y función muscular</b>			
<b>Brooke</b> ( <i>score</i> )	2 (1, 3)	3 (2, 4)	<0.001 <sup>b</sup>
<b>MRC</b> (%)	91 (80, 100)	71 (43, 77)	<0.001 <sup>b</sup>
<b>GMFCS</b> ( <i>score</i> )	2 (1, 2)	5 (4, 5)	<0.001 <sup>b</sup>
<b>Vignos</b> ( <i>score</i> )	3 (2, 4)	9 (9, 9)	<0.001 <sup>a</sup>

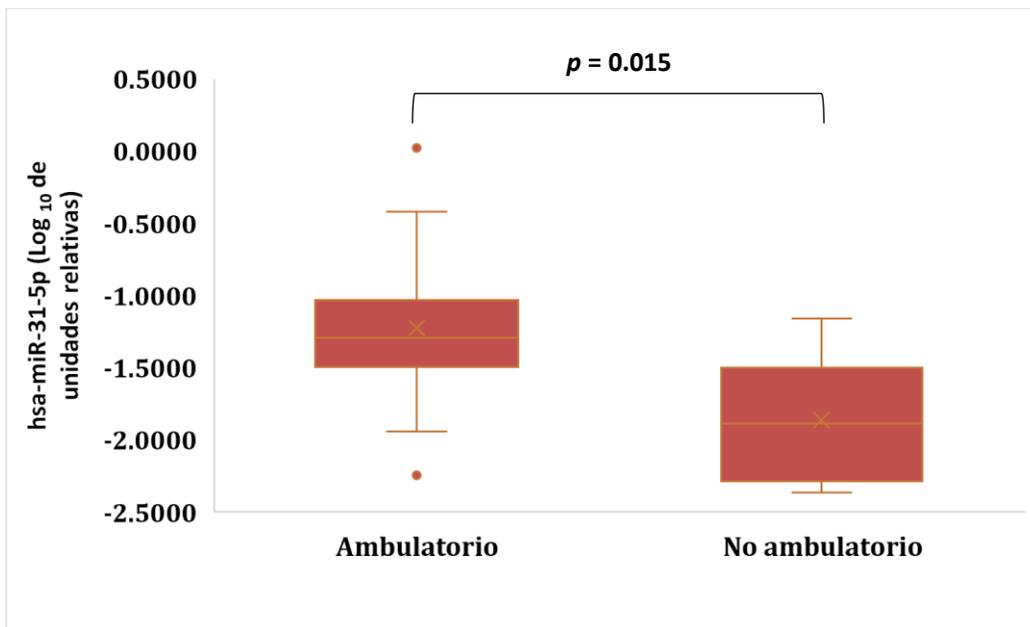
DMD; distrofia muscular de Duchenne, IMC; índice de masa corporal, CK; creatina fosfocinasa, AST; aspartato aminotransferasa, ALT; alanina aminotransferasa, MRC; Medical Research Council, GMFCS; sistema de clasificación de la función motora gruesa. <sup>a</sup>  $t$  de Student, (promedio ± DE). <sup>b</sup> U Mann-Whitney (mediana [min,max]).



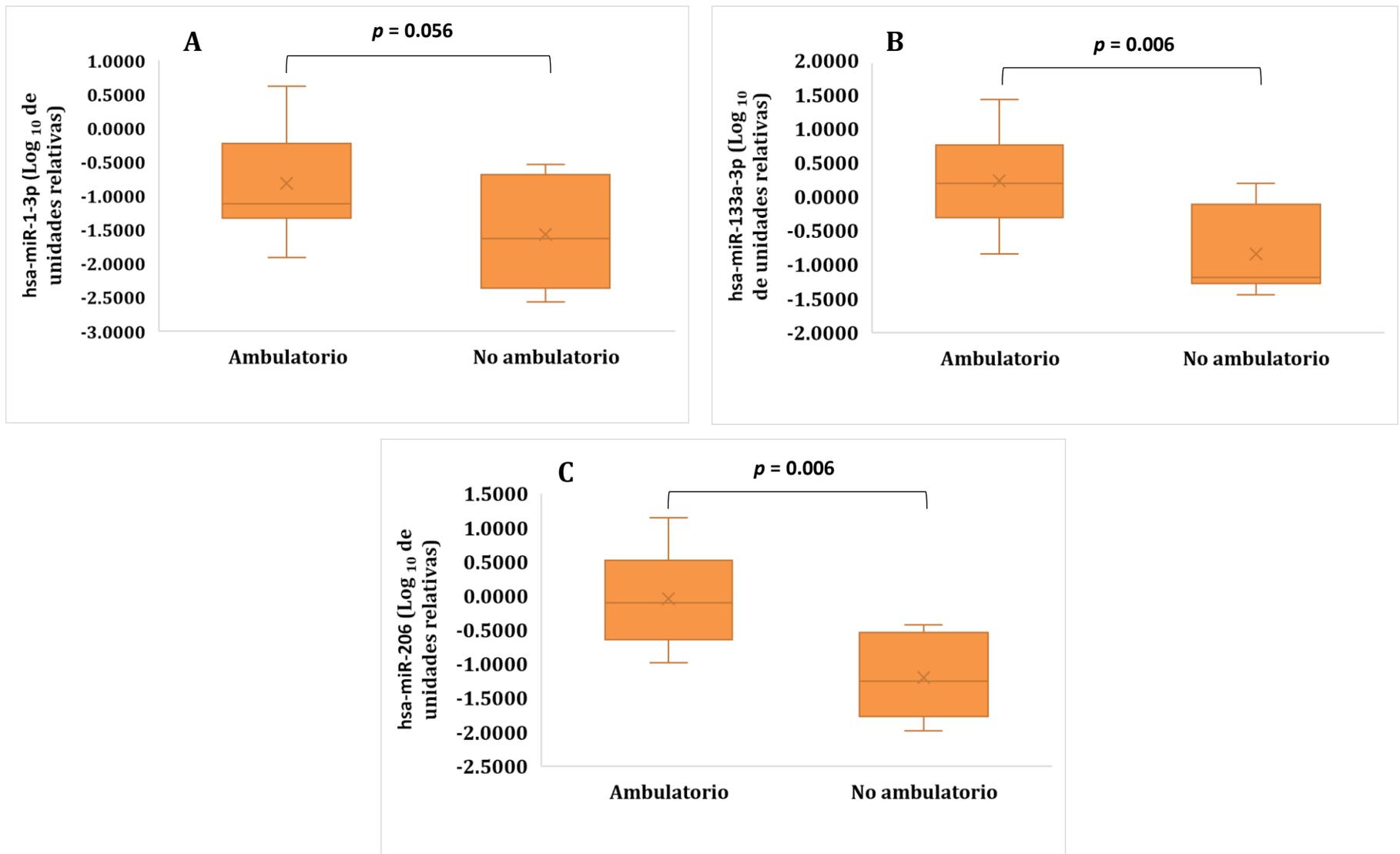
## Comparación de los niveles de expresión del miR-31 y los miomiRNAs circulantes en pacientes ambulatorios y no ambulatorios

Los resultados que mostramos a continuación nos permitieron cumplir con nuestro primer objetivo, el cual tuvo la finalidad de realizar una comparación de los niveles de expresión del miR-31 y de los miomiRNAs circulantes entre el grupo ambulatorio y no ambulatorio. Los resultados son los siguientes:

En la **Figura 8** se observa que los niveles de expresión del miR-31-5p fueron significativamente mayores en los pacientes ambulatorios en comparación con los no ambulatorios ( $p = <0.05$ ). Al comparar los niveles de expresión de los miomiRNAs, observamos que la expresión del miR-1-3p sólo mostró una tendencia a ser mayor en el grupo ambulatorio (**Figura 9A**) mientras que el miR-133a-3p y miR-206 fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes ambulatorios en comparación con el grupo de pacientes no ambulatorios (**Figura 9B y 9C**).



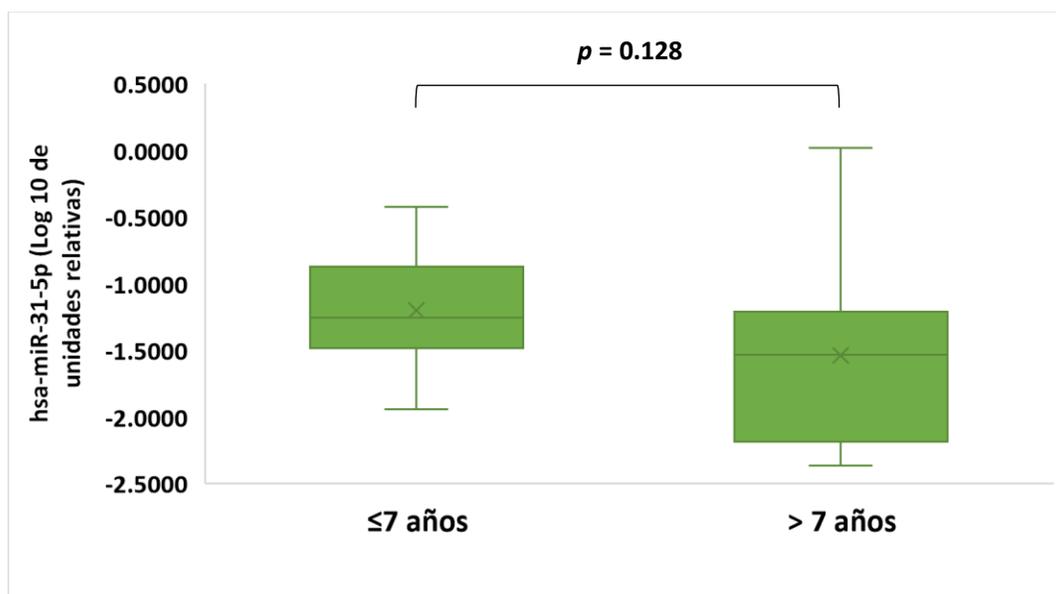
**Fig. 8.** Expresión del miR-31-5p en pacientes ambulatorios y no ambulatorios. El análisis de comparación se realizó mediante la Prueba *U* de Mann-Whitney. Las unidades relativas de expresión del miR-31-5p se presentan como Log<sub>10</sub> para una mejor presentación de los gráficos.



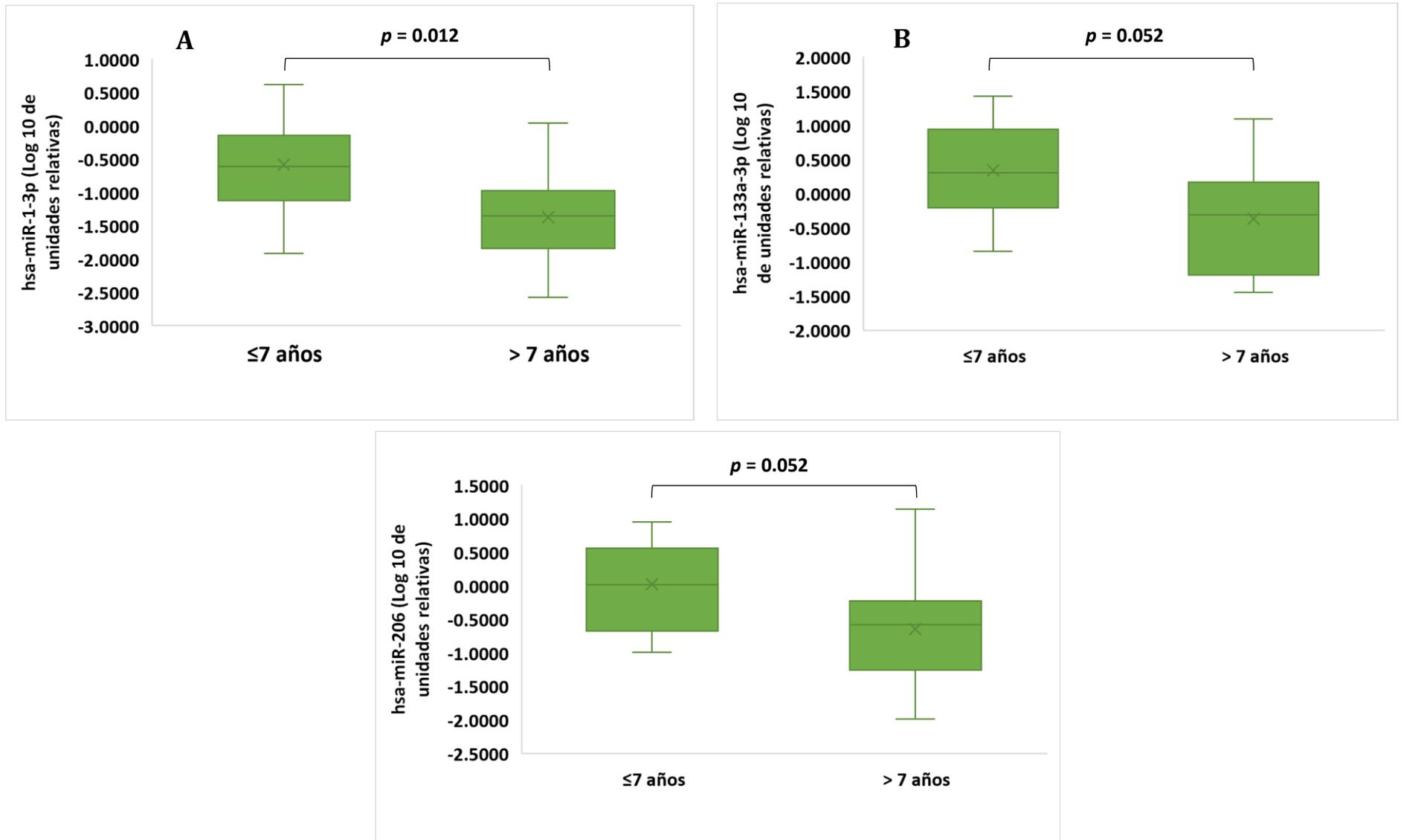
**Fig. 9.** Expresión de los miomiRNAs circulantes en pacientes ambulatorios y no ambulatorios. **(A)** miR-1-3p, **(B)** miR-133a-3p y **(C)** miR-206. El análisis de comparación se realizó mediante la Prueba *U* de Mann-Whitney. Las unidades relativas de expresión del miR-1 3p, miR-133a-3p y miR-206 se presentan como Log<sub>10</sub> para una mejor presentación de los gráficos.

## miR-31 y miomiRNAs en pacientes menores y mayores de 7 años.

Nuestros hallazgos mostraron que el miR-31-5p no mostró una expresión significativa (**Figura 10**). Con respecto a los niveles de expresión de los miomiRNAs circulantes, únicamente el miR-1-3p mostró una expresión significativa mayor en el grupo de pacientes  $\leq 7$  años ( $p < 0.05$ ; **Figura 11A**) en comparación con los  $> 7$  años, mientras que la expresión del miR-133a-3p y miR-206 (**Figura 11B y 11C**) sólo mostraron una tendencia a ser mayor en aquellos pacientes  $\leq 7$  años.



**Fig. 10.** Comparación de los niveles de expresión del miR-31-5p en pacientes  $\leq 7$  y  $> 7$  años. El valor de  $p$  se obtuvo mediante la prueba  $U$  de Mann-Whitney. Las unidades relativas de expresión del miR-31-5p se presentan como  $\text{Log}_{10}$  para una mejor presentación de los gráficos.



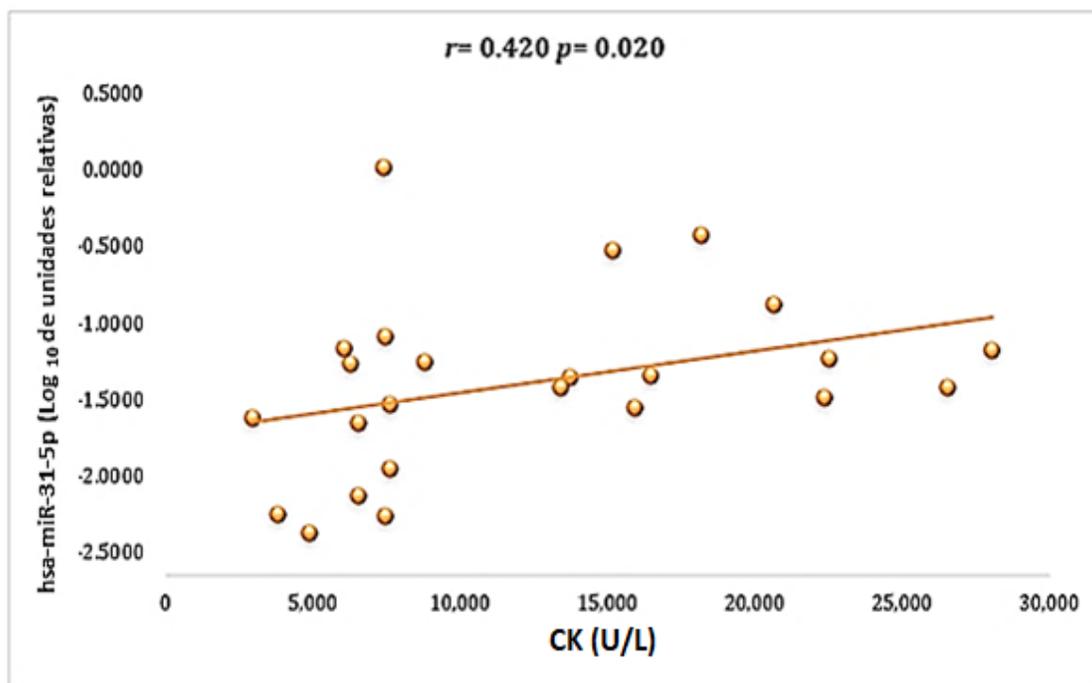
**Fig. 11.** Comparación de los niveles de expresión de los miomiRNAs circulantes en pacientes  $\leq 7$  y  $> 7$  años. **(A)** miR-1-3p, **(B)** miR-133a-3p y **(C)** miR-206. El valor de  $p$  se obtuvo mediante la prueba  $U$  de Mann-Whitney. Las unidades relativas de expresión del miR-1 3p, miR-133a-3p y miR-206 se presentan como  $\text{Log}_{10}$  para una mejor presentación de los gráficos.

## Correlación entre los niveles del miR-31 y los miomiRNAs circulantes y los marcadores de daño muscular (CK, AST y ALT).

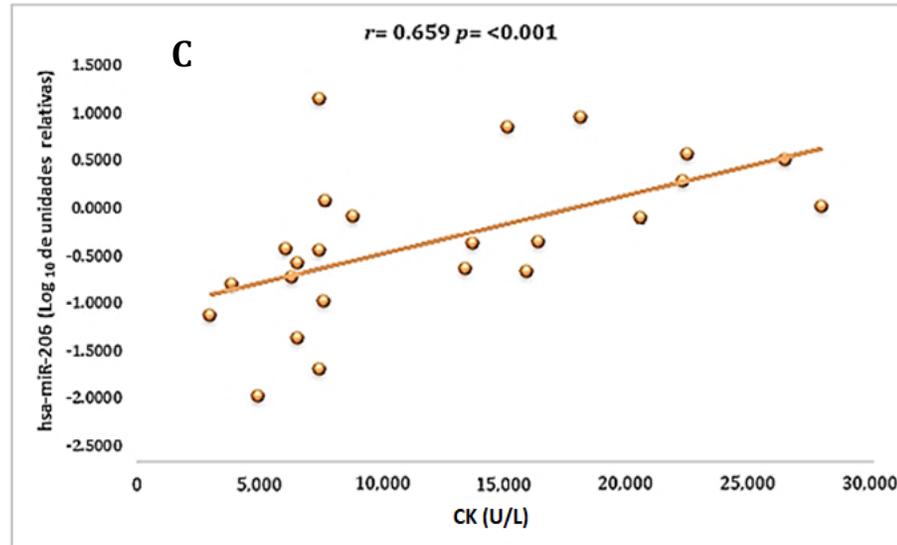
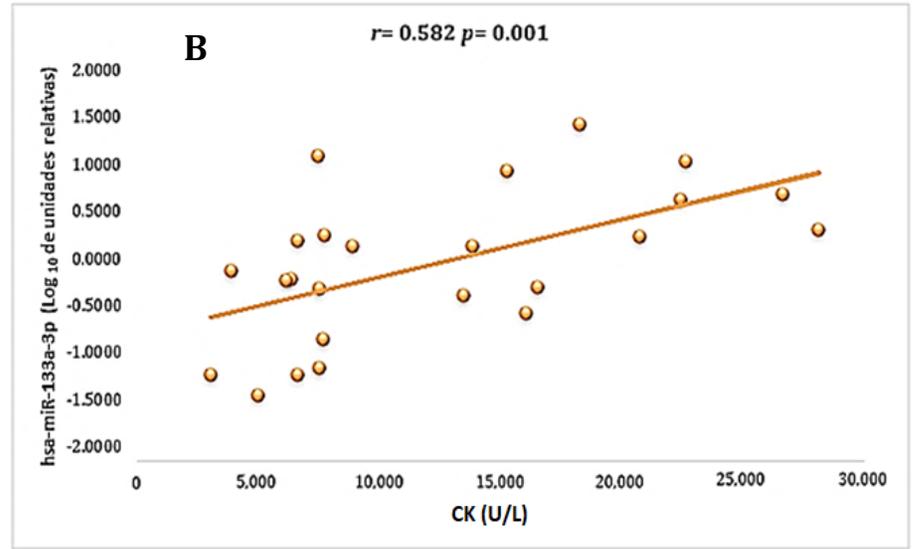
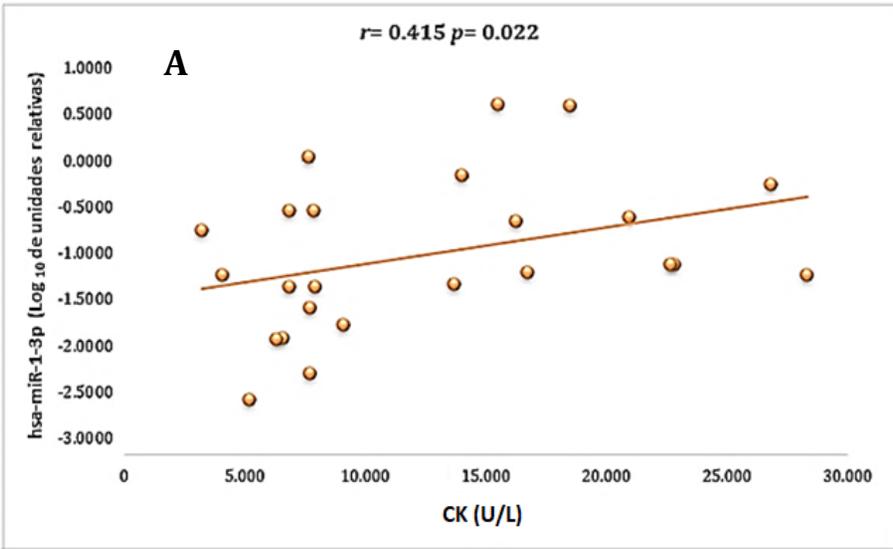
El análisis de correlación entre los niveles de expresión del miR-31 y de los miomiRNAs circulantes y los marcadores de daño muscular (CK, AST y ALT) nos permitió cumplir con nuestro segundo objetivo. Los resultados que obtuvimos fueron los siguientes:

### CK

Referente a la correlación entre la concentración de CK con la expresión de los miRNAs, en la **Figura 12** podemos observar una correlación significativa entre los niveles de expresión del miR-31-5p con la concentración de la CK ( $r = 0.420$ ,  $p = 0.020$ ). Además, la correlación entre los niveles de expresión de los miomiRNAs con la concentración de la CK tuvo un comportamiento similar, mostrando una correlación significativa entre el miR-1-3p ( $r = 0.415$ ,  $p = 0.022$ ; **Figura 13A**), miR-133a-3p ( $r = 0.582$ ,  $p = 0.001$ ; **Figura 13B**) y miR-206 ( $r = 0.659$ ,  $p = <0.001$ ; **Figura 13C**) con la concentración de la CK.



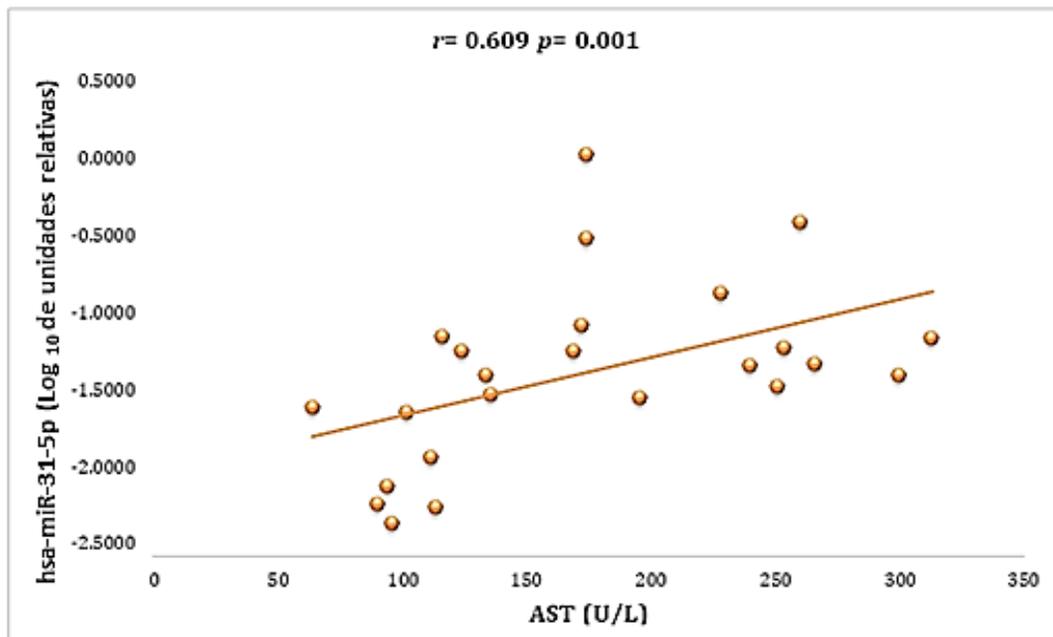
**Fig. 12.** Correlación entre la expresión del miR-31 con la CK. El análisis de correlación se realizó utilizando la prueba de Spearman.



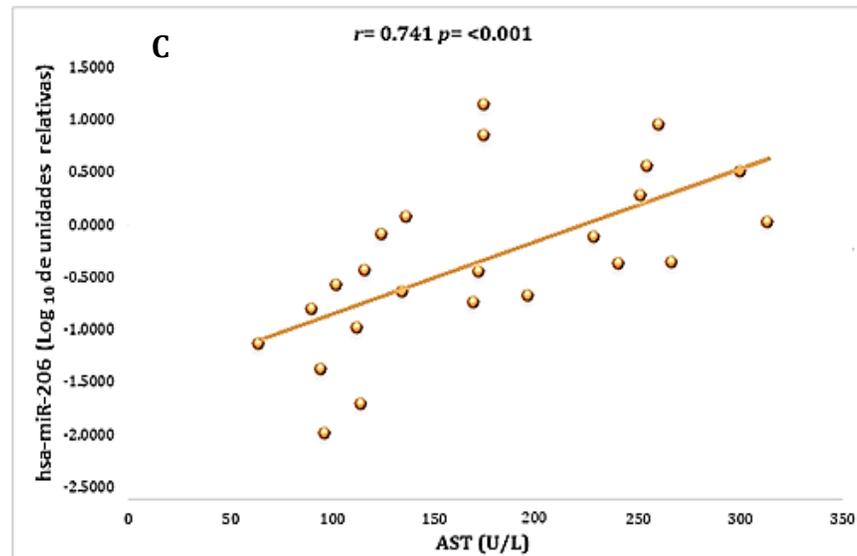
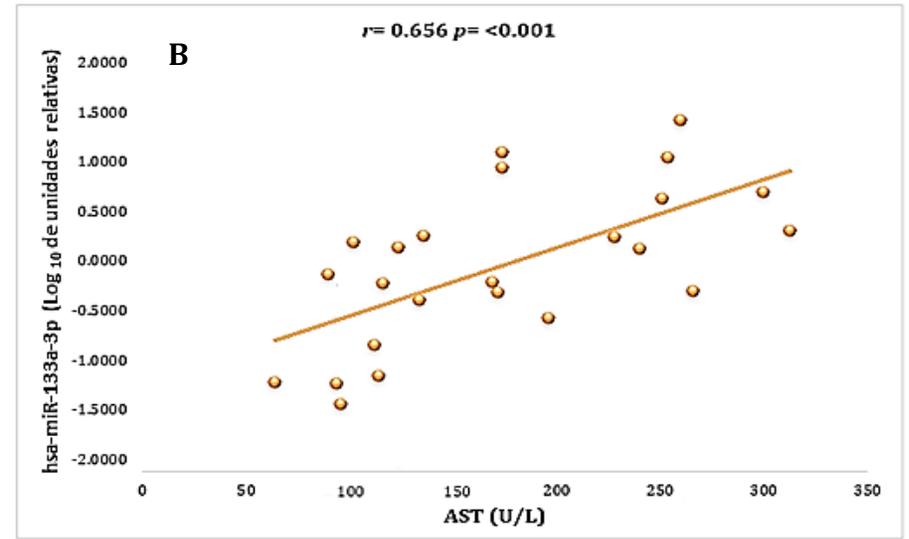
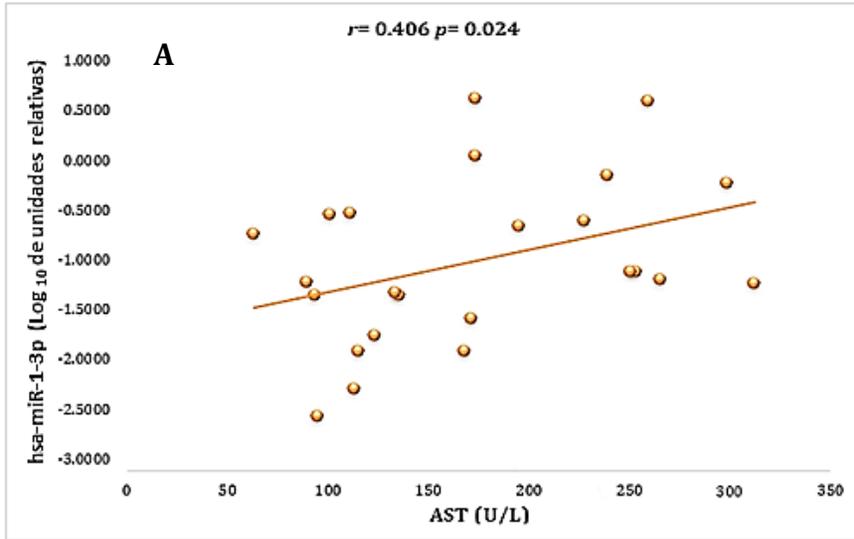
**Fig. 13.** Correlación entre la expresión de los miRNAs circulantes con la CK. **(A)** miR-1-3p, **(B)** miR-133a-3p y **(C)** miR-206. El análisis de correlación se realizó utilizando la prueba de Spearman.

## AST

Con respecto a la correlación entre la AST y los miRNAs, nuestros resultados muestran una correlación significativa entre el nivel de expresión del miR-31-5p ( $r = 0.609$ ,  $p = 0.001$ ; **Figura 14**), el miR-1 ( $r = 0.406$ ,  $p = 0.024$ ; **Figura. 15A**), el miR-133a-3p ( $r = 0.656$ ,  $p = <0.001$ ; **Figura 15B**) y el miR-206 ( $r = 0.741$ ,  $p = <0.001$ ; **Figura 15C**) con la concentración de la AST.



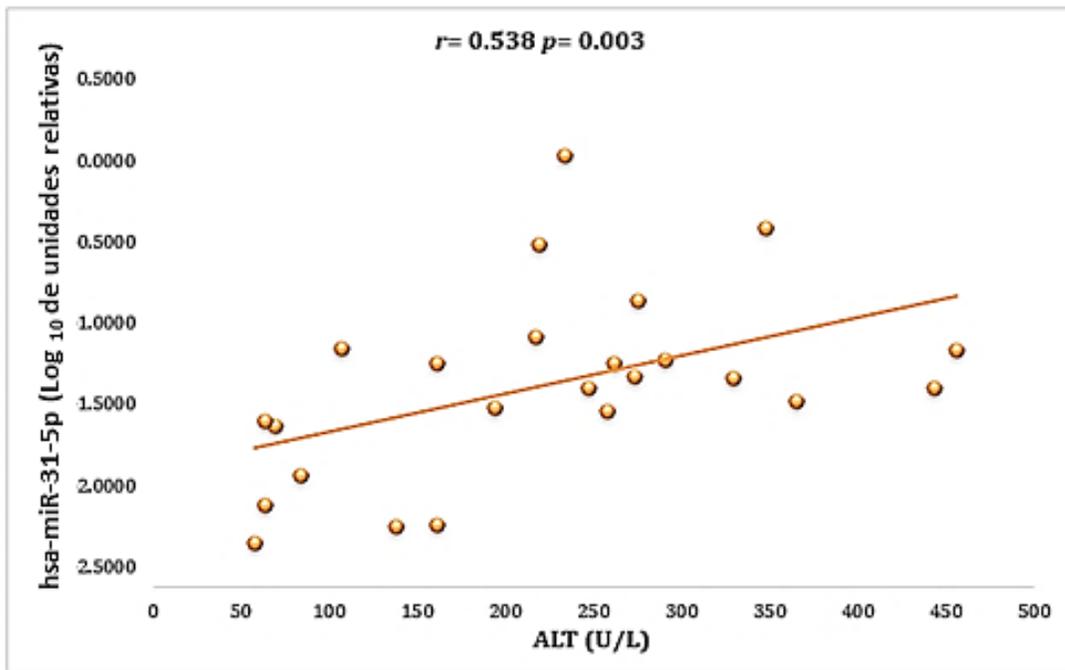
**Fig. 14.** Correlación entre la expresión del miR-31 con la AST. El análisis de correlación se realizó utilizando la prueba de Spearman.



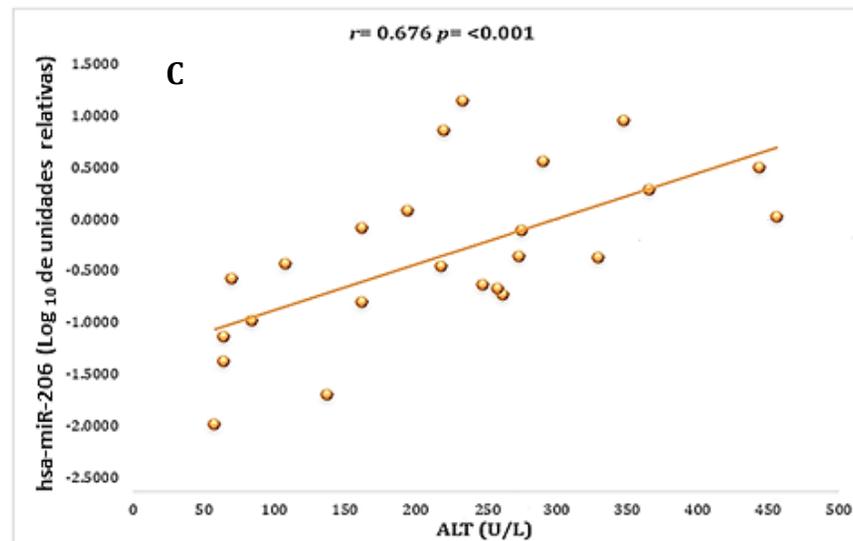
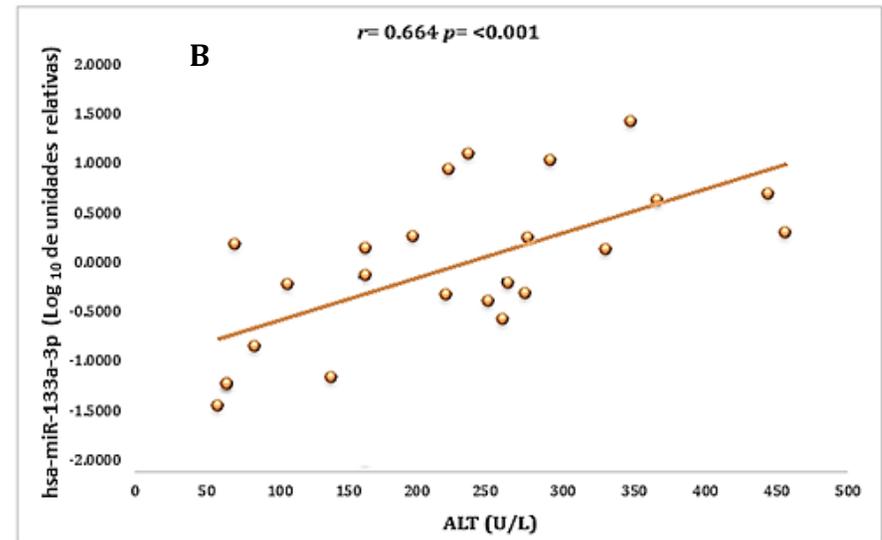
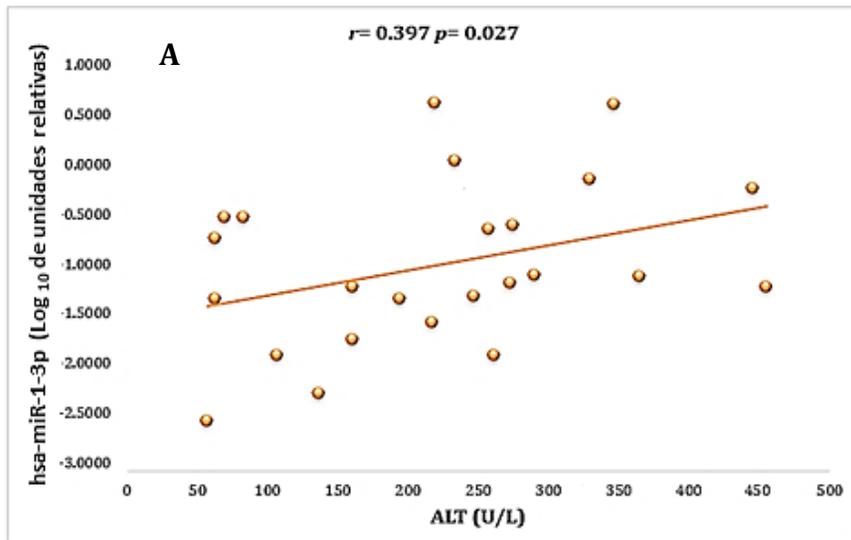
**Fig. 15.** Correlación entre la expresión de los miomiRNAs circulantes con los niveles de AST. **(A)** miR-1-3p, **(B)** miR-133a-3p y **(C)** miR-206. Correlación de Spearman. El análisis de correlación se realizó utilizando la prueba de Spearman.

## ALT

De igual manera, la correlación realizada entre la ALT y los miRNAs nos muestra una correlación significativa entre los valores de expresión del miR-31-5p ( $r = 0.538$ ,  $p = 0.003$ ; **Figura 16**), el miR-1-3p ( $r = 0.397$ ,  $p = 0.027$ ; **Figura 17A**), el miR-133a-3p ( $r = 0.664$ ,  $p < 0.001$ ; **Figura 17B**) y el miR-206 ( $r = 0.676$ ,  $p < 0.001$ ; **Figura 17C**) con la concentración de la ALT.



**Fig. 16.** Correlación entre la expresión del miR-31 con la ALT. El análisis de correlación se realizó utilizando la prueba de Spearman.



**Fig. 17.** Correlación entre la expresión de los miomiRNAs circulante con los niveles de las ALT. **(A)** miR-1-3p, **(B)** miR-133a-3p y **(C)** miR-206. El análisis de correlación se realizó utilizando la prueba de Spearman.

## Correlación entre la expresión del miR-31 con la expresión de los miomiRNAs

El análisis de correlación entre la expresión del miR-31 con la expresión de los miomiRNAs circulantes nos permitió cumplir con nuestro tercer objetivo. Los resultados que obtuvimos fueron los siguientes:

Los resultados muestran que existe una correlación significativa en la expresión de cada uno de los miRNAs estudiados ( $p < 0.05$ ). Como observamos en la **Tabla 5**, la expresión del miR-31-5p mostró una correlación fuerte con la expresión del miR-206 ( $r = 0.768$ ,  $p = < 0.001$ ) y del miR-133a-3p ( $r = 0.668$ ,  $p = < 0.001$ ). Con respecto a la expresión de los miomiRNAs, los resultados muestran una correlación fuerte entre el miR-133a-3p y el miR-206 ( $r = 0.939$ ,  $p = < 0.001$ ).

**Tabla 5.** Correlación entre el nivel de expresión del miR-31 con la expresión de los miomiRNAs.

Correlación entre los miRNAs circulantes analizados *				
	miR-31-5p	miomiRNAs		
	miR-31-5p	miR-1-3p	miR-133a-3p	miR-206
miR-1-3p	$r = 0.348$ $p = 0.048$	-	-	-
miR-133a-3p	$r = 0.668$ $p = < 0.001$	$r = 0.567$ $p = 0.002$	-	-
miR-206	$r = 0.768$ $p = < 0.001$	$r = 0.550$ $p = 0.003$	$r = 0.939$ $p = < 0.001$	-

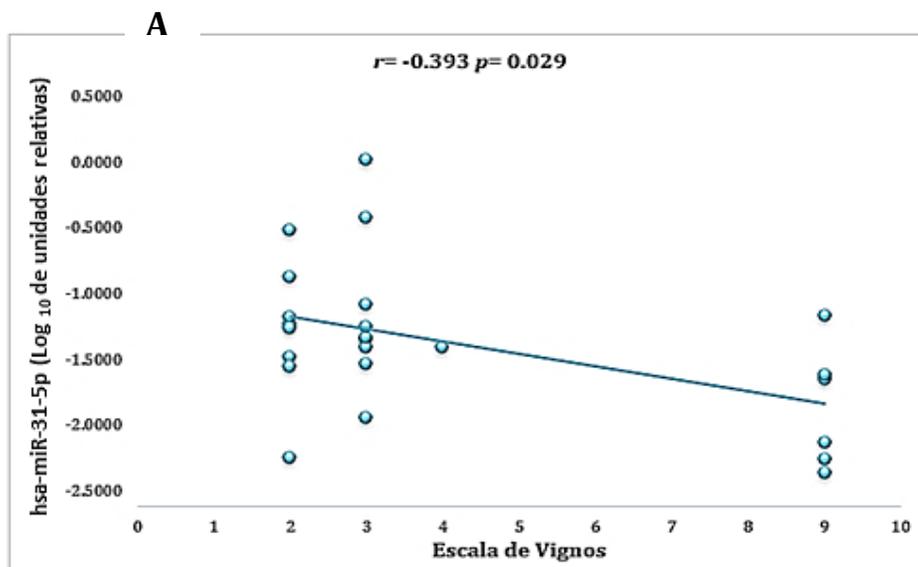
\* El análisis de correlación se realizó utilizando la prueba de Spearman.

## Correlación entre los niveles de expresión del miR-31 y de los miomiRNAs circulantes con los valores de score de las escalas de función muscular.

El análisis de correlación entre los niveles de expresión del miR-31 y de los miomiRNAs circulantes con los valores de score de las escalas de función muscular nos permitieron cumplir con nuestro cuarto objetivo a partir del cual obtuvimos los siguientes resultados:

### miR-31

En la **Figura 18** podemos observar una correlación débil ( $r = -0.393$ ,  $p = 0.029$ ) entre los niveles de expresión del miR-31-5p con el puntaje de la escala de Vignos. Con respecto a las escalas de Brooke ( $r = -0.248$ ,  $p = 0.121$ ), el porcentaje de MRC ( $r = 0.291$ ,  $p = 0.95$ ) y del GMFCS ( $r = -0.245$ ,  $p = 0.122$ ) no mostraron una correlación significativa con la expresión de ninguno de los miRNAs estudiados.

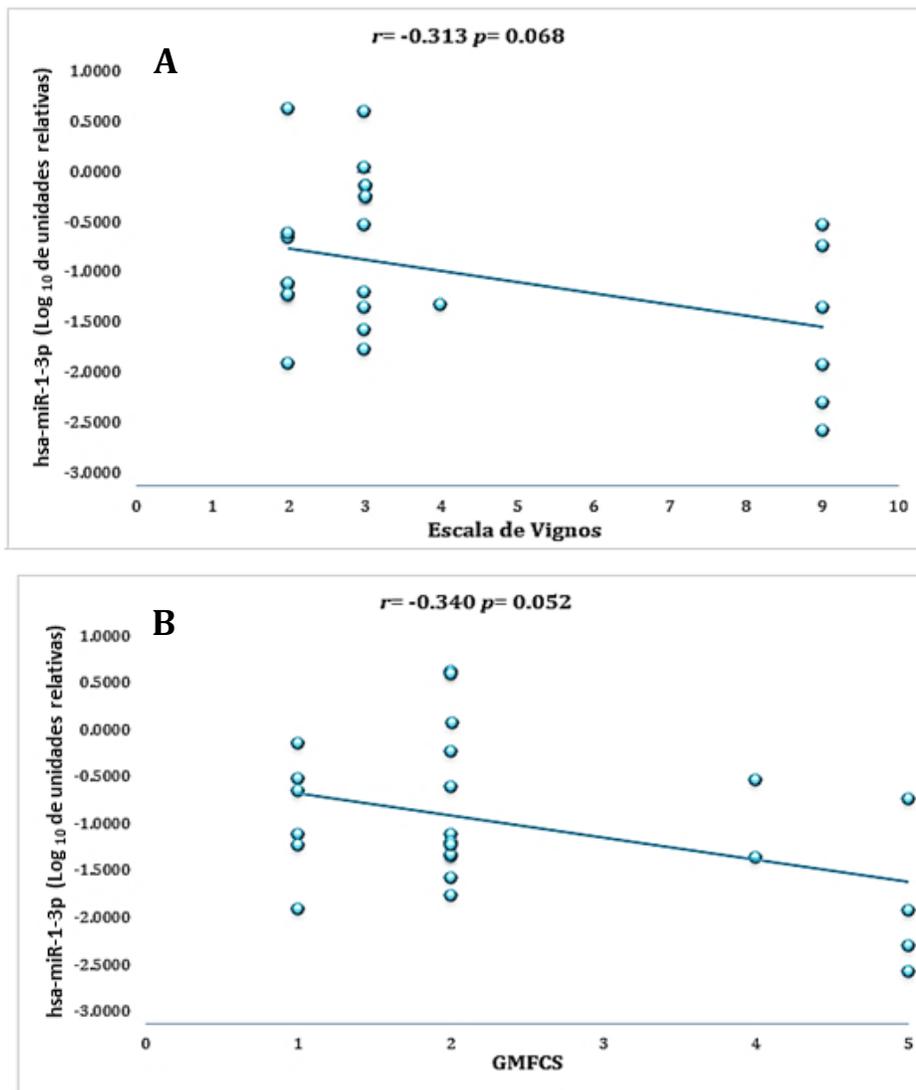


**Fig. 18.** Correlación entre la expresión del miR-31-5p con el puntaje de escala de Vignos. El análisis de correlación se realizó utilizando la prueba de Spearman. Las unidades relativas de expresión del miR-31-5p se presentan como Log<sub>10</sub> para una mejor presentación de los gráficos.

## miomiRNAs

### miR-1

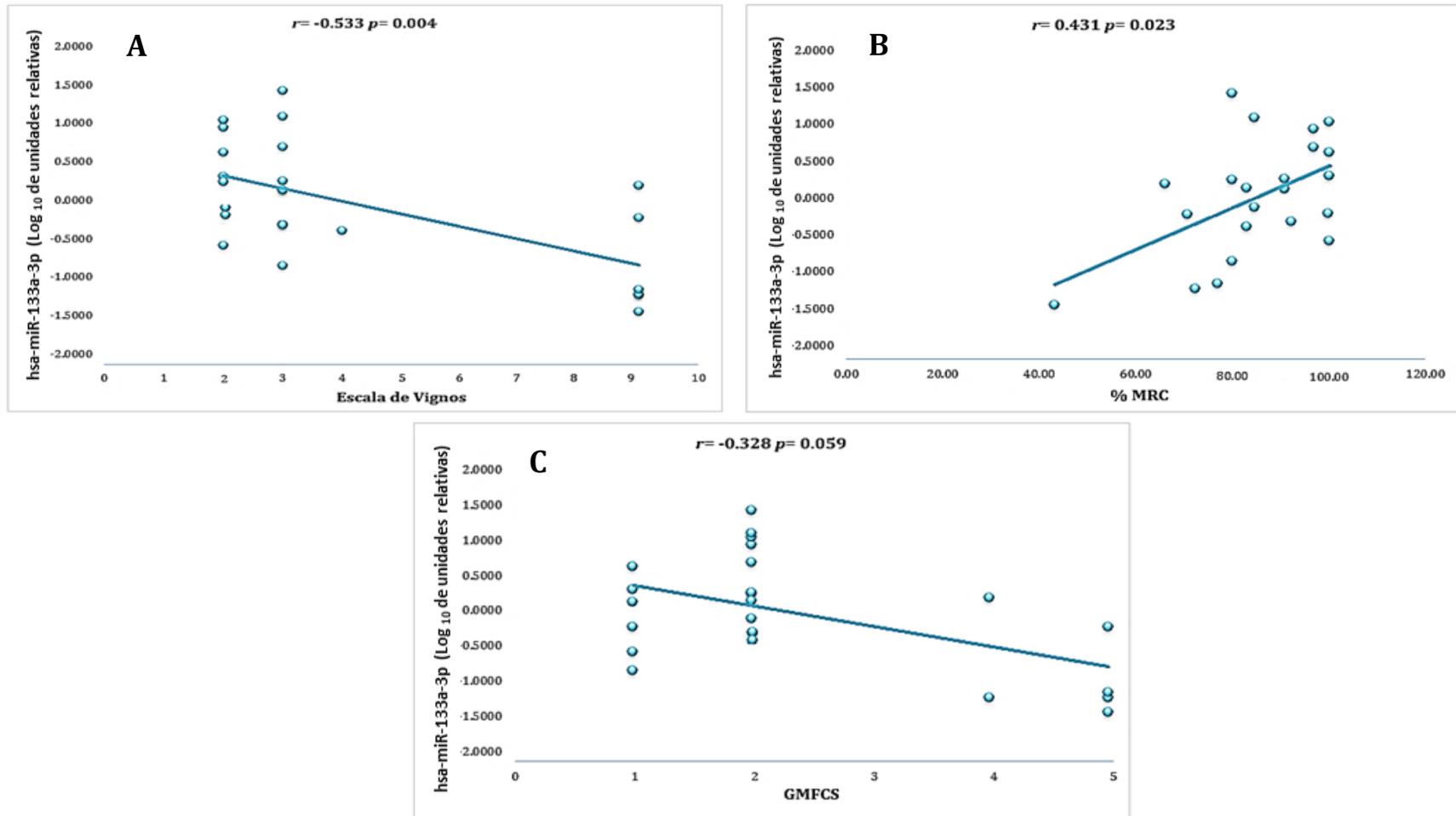
Como se muestra en las **Figuras 19A y 19B** observamos que el *score* de las escalas de Vignos ( $r = -0.313$ ,  $p = 0.068$ ) y del GMFCS ( $r = -0.340$ ,  $p = 0.052$ ) mostraron una tendencia a correlacionar de manera negativa con los niveles de expresión del miR-1-3p. Por otro lado, el puntaje de la escala de Brooke ( $r = -0.060$ ,  $p = 0.390$ ) y el porcentaje del MRC ( $r = 0.234$ ,  $p = 0.147$ ) no mostraron una correlación significativa ( $p < 0.05$ ) con la expresión del miR-1-3p.



**Fig. 19.** Correlación entre la expresión del miR-1-3p con el puntaje de la escala de **(A)** Vignos y **(B)** GMFCS. El análisis de correlación se realizó utilizando la prueba de Spearman. Las unidades relativas de expresión del miR-1 3p, se presentan como Log<sub>10</sub> para una mejor presentación de los gráficos.

## miR-133

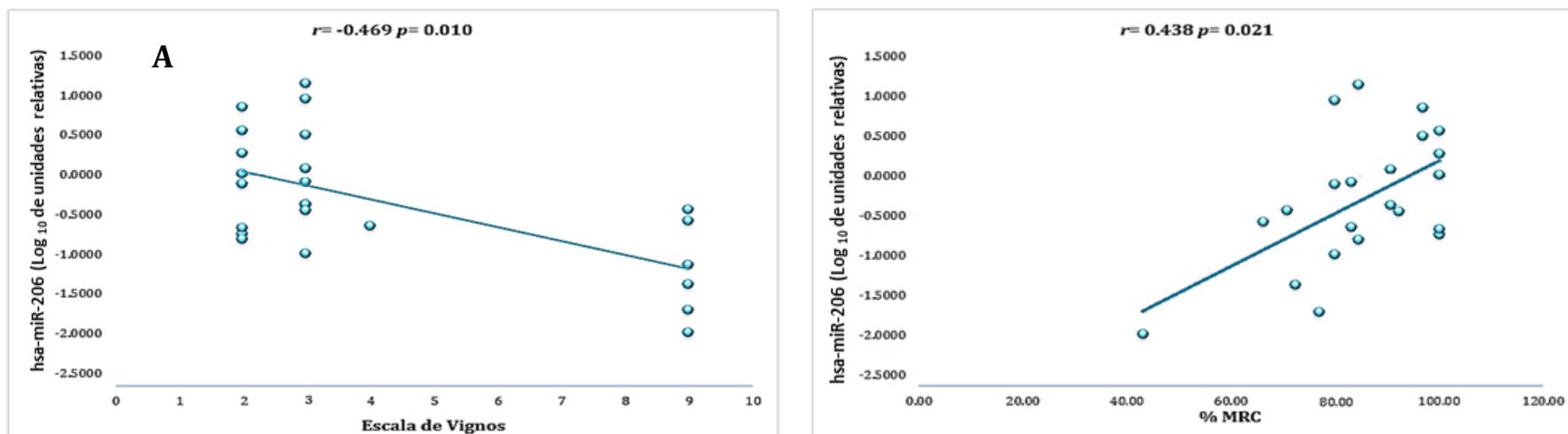
Con respecto a los niveles de expresión del miR-133 encontramos que su expresión se correlaciona de manera moderada con el *score* de la escala de Vignos ( $r = -0.533$ ,  $p = 0.004$ ; **Figura 20A**) y con el porcentaje del MRC ( $r = 0.431$ ,  $p = 0.023$ ; **Figura 20B**). Aunque el puntaje de la escala del GMFCS tendió a correlacionar con la expresión del miR-133a-3p ( $r = -0.328$ ,  $p = 0.059$ ; **Figura 20C**). Por lo contrario, el *score* de la escala de Brooke no mostró correlación ( $r = -0.299$ ,  $p = 0.140$ ) con los niveles de expresión del miR-133.



**Fig. 20.** Correlación entre la expresión del miR-133a-3p con el puntaje de la escala de (A) Vignos, (B) porcentaje de MRC y (C) el GMFCS. El análisis de correlación se realizó utilizando la prueba de Spearman. Las unidades relativas de expresión del miR-133a-3p se presentan como Log<sub>10</sub> para una mejor presentación de los gráficos.

## miR-206

Referente a los niveles de expresión del miR-206, encontramos que esta expresión correlaciona de manera moderada con el puntaje de la escala de Vignos ( $r = -0.469$ ,  $p = 0.010$ ; **Figura 21A**) y de manera positiva con el porcentaje de MRC ( $r = 0.438$ ,  $p = 0.021$ ; **Figura 21B**). Por lo contrario, el score de las escalas de Brooke ( $r = -0.231$ ,  $p = 0.138$ ) y del GMFCS ( $r = -0.320$ ,  $p = 0.064$ ) no mostraron una correlación significativa.



**Fig. 21.** Correlación entre la expresión del miR- 206 con el puntaje de la escala de **(A)** Vignos y **(B)** el porcentaje del MRC. Correlación de Spearman. El análisis de correlación se realizó utilizando la prueba de Spearman. Las unidades relativas de expresión del miR-206 se presentan como Log<sub>10</sub> para una mejor presentación de los gráficos.

## DISCUSIÓN

La distrofia muscular de Duchenne es una de las enfermedades neurodegenerativas más letales en los niños, debido a la ausencia de la proteína distrofina, lo que provoca inestabilidad sarcomérica en el músculo esquelético y, cuya complicación principal es la pérdida de la capacidad funcional muscular de los pacientes afectados.<sup>51, 52</sup>

En la actualidad, los métodos para el diagnóstico, así como para el monitoreo de la función muscular antes, después y durante el tratamiento son limitados. Los marcadores de daño muscular dentro de los cuales se incluyen a la CK y a las transaminasas (AST y ALT) son utilizados para monitorear y, en algunos casos, identificar una enfermedad muscular existente<sup>53</sup>

En nuestro estudio podemos observar que la concentración de CK circulante en pacientes ambulatorios es mayor que la de pacientes no ambulatorios. A pesar de que sabemos que esta enzima es el marcador de daño muscular más utilizado, en la mayoría de las unidades hospitalarias es de gran utilidad por ser una prueba asequible, sensible y económica para realizar, aunque está no es específica ya que solo puede detectar entre un 50-70% de pacientes con DMD. Su elevación se ve influenciada por diferentes factores, como la edad, la actividad física, una cirugía reciente, enfermedad activa (crisis epilépticas, miopatía, rabdomiólisis) o incluso algún traumatismo,<sup>27</sup> por lo que el análisis de este único elemento limita el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con DMD.

De igual manera, las concentraciones circulantes de AST y ALT son más altas en los pacientes ambulatorios que en aquellos que aún no han perdido la capacidad para deambular. Aunque estos marcadores son producidos principalmente en el hígado, también pueden expresarse en el músculo esquelético, por lo que, su elevación está relacionada con el daño muscular.<sup>29</sup> En 2011, McMillan y cols. informaron que los valores de ALT se elevan hasta 22.6 veces, respecto al límite normal en pacientes con DMD.<sup>54</sup> Sin embargo, nosotros observamos que la ALT fue de 8-9 veces más alto que el valor superior normal en los pacientes estudiados.

Por lo tanto, dado que la CK sérica se encuentra considerablemente elevada cuando ocurre una lesión del músculo, asumimos que las transaminasas también son liberadas a circulación debido al daño en la membrana de las fibras musculares, esto sucede en la DMD. Por lo que, la medición simultánea de estos tres marcadores de daño muscular permite identificar de manera oportuna una enfermedad muscular activa.<sup>55</sup>

Debido a las limitantes que presentan los biomarcadores actuales para el monitoreo del progreso y tratamiento de la DMD, los miRNAs representan hoy en día un elemento cuantificable eficaz que pueden restringir las limitantes antes mencionadas. Estos RNAs no codificantes ejercen una función

importante al regular la expresión génica a nivel postranscripcional y su expresión es de utilidad en diversas patologías como el cáncer, enfermedades cardíacas, neurológicas y musculares.<sup>46</sup> El miR-31 y los miomiRNAs circulantes (miR-1, miR-133 y miR-206), tienen un papel en el mantenimiento y la regeneración del músculo esquelético.<sup>38, 49</sup> Debido a esto, en la actualidad los estudios de las patologías musculares estén enfocados en ellos como un método no invasivo en el monitoreo de la enfermedad.

Nuestro estudio evaluó el nivel de expresión que tuvieron los miomiRNAs circulantes y el miR-31 en los pacientes con DMD que conservan la capacidad para deambular y en pacientes que perdieron esta capacidad. Los resultados mostraron que existe una mayor expresión del miR-31, miR-133 y miR-206 en los pacientes que aún tienen conservada la función muscular y no han perdido la capacidad para caminar. Estos hallazgos coinciden con estudio previos, específicamente la expresión de los miomiRNAs séricos se ha reportado elevada en pacientes ambulatorios.<sup>37, 38, 39, 40</sup> De acuerdo con Mitchell et al. en 2008 y Mizuno et al. en 2011, la mayor cantidad de miRNAs séricos en pacientes ambulatorios puede ser en parte debido a que estos podrían formar parte de partículas exosomales o a que exista un aumento en la fuga o secreción de miRNAs del músculo y no por ningún cambio en los niveles de expresión en el músculo esquelético.<sup>43, 55</sup> Lo antes mencionado nos sugiere que durante las primeras etapas de la enfermedad, los pacientes ambulatorios presentan una mayor degeneración del músculo esquelético. Como consecuencia, los sistemas de regeneración muscular (incluida la miogénesis), se encontrarán más activados para reparar el daño. Sin embargo, dado que existe la ausencia de la distrofina, la reparación no podrá llevarse a cabo, por lo tanto, el músculo esquelético no podrá regenerarse lo que dará como resultado una destrucción y una degeneración de este, con un aumento de los miomiRNAs circulantes convirtiéndose en un círculo vicioso.

Es importante mencionar que nuestro estudio es uno de los primeros en comprobar que existe una correlación entre los marcadores de daño muscular (CK, AST y ALT), con los niveles de expresión del miR-31 y de los miomiRNAs circulantes. Esto indica que entre mayor sea la liberación del marcador de daño muscular, mayor será el nivel de expresión de estos miRNAs y esto pudiera ser explicado debido a que al inicio de la enfermedad, la destrucción del músculo se encuentra muy activa, lo que provoca un aumento en la liberación de los marcadores de daño muscular y de los miRNAs a circulación.

Los miRNAs presentan ventajas sobre los demás elementos bioquímicos, principalmente debido a que sus niveles séricos son estables, reproducibles y consistentes entre individuos de la misma especie, así como una expresión tejido-específica, por lo que su utilidad resulta ser mayor en comparación con los elementos de evaluación disponibles.<sup>46</sup>

Con estos datos podemos resaltar que, tanto los marcadores de daño muscular como los miRNAs, se encuentran aumentados en gran medida en el suero de los pacientes ambulatorios con DMD que usualmente es el momento en el que se realiza el diagnóstico de la enfermedad y disminuyen conforme avanza la edad a medida que la masa muscular es reemplazada por tejido adiposo. Es posible que los niveles de estos elementos en sangre sean proporcionales a la cantidad de fibras musculares que se están regenerando, las cuales son abundantes en los pacientes más jóvenes en comparación con los de mayor edad las cuales se encuentran fibróticas.<sup>50</sup>

La mayor cantidad de fibras musculares que se están regenerando en los pacientes jóvenes indica la importancia que tiene la edad en la DMD,<sup>50</sup> esto también es apoyado por los resultados de la presente investigación que muestran una mayor expresión de los miRNAs en los pacientes de menor edad. De acuerdo con los hallazgos reportados por Mazzone et al. en 2011, la mayoría de los niños menores de 7.5 años, muestran poco o ningún deterioro causado por la enfermedad, en comparación con los niños mayores de esta edad que, en su mayoría, presentan un deterioro mucho más marcado.<sup>51</sup> En nuestro estudio, al comparar los niveles de expresión de los miRNAs en pacientes  $\leq 7$  años con aquellos niños  $> 7$  años observamos que sólo los niveles de expresión del miR-1 son mayores en los pacientes de menor edad ( $\leq 7$  años). A nuestro conocimiento, no existe un estudio similar reportado que nos permita explicar nuestros resultados. Sin embargo, podemos hipotetizar que, a una edad temprana, la poza de células satélites musculares es suficiente para llevar a cabo la regeneración del músculo dañado y, como consecuencia, existirá una liberación de miomiRNAs en el torrente sanguíneo que se encontrará elevada por un tiempo limitado. Conforme avance la edad, la miogénesis se verá afectada completamente, lo que conllevará a una degeneración progresiva de las fibras musculares manifestada por una pérdida de la capacidad para la deambulación, así como una disminución de los niveles de expresión de los miomiRNAs circulantes y los marcadores de daño muscular.

Asimismo, nuestros datos muestran que a medida que aumenta la expresión del miR-31 también aumenta la expresión de los miomiRNAs circulantes. A su vez, la expresión de los miomiRNAs también se correlacionó entre ellos, siendo la correlación más fuerte entre el miR-133 y el miR-206. No existen estudios en los que se reporte la expresión del miR-31 y de los miomiRNAs en la DMD, la única evidencia fue reportada por Bonanno, S. et al en el 2020 pero en pacientes con atrofia muscular espinal. Nuestros resultados son consistentes con los reportados por estos autores, quienes determinaron el perfil de expresión de los miomiRs en el suero de 21 pacientes pediátricos (8 niños y 13 niñas) con una edad media de  $13.9 \pm 9.63$  meses con atrofia muscular espinal antes y después de los 6 meses de tratamiento con Nusinersen (oligonucleótido antisentido que inhibe al silenciador del splicing N1, situado en el intrón 7 del gen *SMN2*, promoviendo la inclusión del exón 7 en el mRNA, de esta manera se lleva a cabo la síntesis completa de la proteína SMN2 para suplir el déficit de la proteína SMN1). Los autores reportaron una correlación significativa en los niveles

de expresión entre; el miR-133 y el miR-206 (antes del tratamiento:  $r = 0.93$ ,  $p = 0.0001$ ; después del tratamiento:  $r = 0.63$ ,  $p = 0.003$ ), entre el miR-133a y el miR-1 (antes del tratamiento:  $r = 0.67$ ,  $p = 0.0008$ ; después del tratamiento:  $r = 0.67$ ,  $p = 0.0008$ ); pero la correlación entre el miR-206 y el miR-1 no fue significativa al inicio del estudio, pero sí al final de este ( $r = 0.46$ ,  $p = 0.03$ ). Nuestros resultados junto con los reportados por Bonanno y colaboradores sugieren por primera vez que los niveles de expresión de estos miRNAs en la DMD son sinérgicos y podrían ser de utilidad al evaluar la respuesta a algún tratamiento en específico.<sup>56</sup>

En este estudio, también evaluamos la capacidad funcional utilizando las escalas de fuerza (GMFCS y MRC) y función (Vignos y Brooke) muscular. Las escalas de Brooke y Vignos son rápidas y fáciles de aplicar, además, nos permiten evaluar las funciones de las extremidades superiores e inferiores respectivamente, por lo que, su aplicación resulta de gran utilidad para los pacientes con DMD.<sup>57</sup> Los resultados de esta investigación indican que el *score* de la escala de Vignos se correlaciona con los niveles de expresión del miR-31, miR-133 y miR-206, lo que sugiere que, a mayor función muscular, mayor es la expresión de los miRNAs. Esto demuestra que los niveles elevados de los miRNAs se relacionan con una fuerza y función muscular conservada.

A pesar de que la escala de Brooke es una herramienta de utilidad para evaluar la función de las extremidades superiores, no observamos correlación entre el *score* de esta escala con los valores de expresión de los miRNAs analizados.<sup>58</sup> Esto se podría deber a que, en las primeras etapas de la enfermedad, los grupos musculares de las extremidades inferiores son los primeros que se ven afectados, a diferencia de los superiores cuya afectación resulta más tardía. De acuerdo con Bushby, K. et al. en 2011, los puntajes de la escala de Brooke generalmente muestran una disminución funcional entre los 7-18 años.<sup>58</sup> Dado que nuestra población corresponde a niños con edades de entre 6 a 10 años en su mayoría, el deterioro de los grupos musculares de las extremidades superiores ocurrirá conforme progrese la enfermedad y, por lo tanto, se deberá de realizar su evaluación en etapas posteriores.

Con respecto a la evaluación de las escalas de fuerza muscular (GMFCS y el % del MRC), los resultados muestran que el *score* del porcentaje del MRC se correlacionó con el miR-133 y con el miR-206, mientras que el *score* del GMFCS no mostró correlación con ninguno de los miRNAs analizados. Actualmente no existen estudios que nos ayuden a explicar estos resultados. Sin embargo, una posible hipótesis es que en el caso del GMFCS, esta escala realiza una evaluación muy general e inespecífica de la fuerza muscular cuyo rango de referencia se limita a si puede deambular o no. En el caso del % del MRC, a pesar de que se evalúan varios grupos musculares tanto de extremidades superiores e inferiores, el *score* obtenido es dependiente de la percepción de quien realiza la evaluación. Independientemente de lo antes mencionado, los datos muestran que los puntajes de las escalas se encuentran elevados conforme el deterioro de la enfermedad es

más acentuado. Por lo tanto, la inclusión de dichas escalas en la evaluación de la capacidad funcional muscular en los pacientes con DMD pudiera ayudarnos a tener una mayor certeza del verdadero grado de afectación muscular de forma generalizada.

Este estudio tiene algunas limitaciones. En nuestro estudio, el tamaño de la población analizada es relativamente pequeño. Los pacientes se agruparon en ambulatorios y no ambulatorios sin evaluar la capacidad funcional muscular intermedia. A pesar de estas limitaciones, nuestro estudio cuenta con fortalezas muy importantes, siendo una de ellas que los pacientes incluidos no se encontraban bajo tratamiento con glucocorticoides o ingesta de antioxidantes, de esta manera se realizó una correcta evaluación de la historia natural de la DMD sin verse alterada por algún factor externo, principalmente por fármacos. Se realizó una comparación importante entre los pacientes ambulatorios y no ambulatorios lo que permite evaluar un contraste entre el inicio y la progresión de la enfermedad. Finalmente, nuestra investigación proporciona datos importantes que apoyan el diseño de estudios enfocados a confirmar si el miR-31 y los miomiRNAs podrían ser considerados como biomarcadores potenciales para el seguimiento y monitoreo de la DMD.

## CONCLUSIONES

- Los pacientes con distrofia muscular de Duhenne con mayor afectación muscular y que han perdido la capacidad para caminar, expresan menores niveles del miR-31 y de los miomiRNAs circulantes que aquellos pacientes con menor afectación y que aún conservan la capacidad para deambular.
- La elevación de los marcadores de daño muscular como la CK, AST y ALT se correlacionan con el incremento de los niveles de expresión del miR-31 y de los miomiRNAs circulantes.
- El aumento del miR-31 se correlaciona con el incremento de los miomiRNAs: miR-133 y el miR-206 circulantes en pacientes con distrofia muscular de Duchenne. Además, los niveles en la expresión de estos miomiRNAs se correlacionan entre sí de manera directa.
- Los niveles de expresión del miR-31 y de los miomiRNAs circulantes se encuentran elevados en aquellos pacientes con una mejor fuerza y función muscular, mostrando una correlación con el puntaje de la escala de Vignos y con el porcentaje del MRC.

Los niveles del miR-31 y de los miomiRNAs circulantes se encuentran elevados en aquellos pacientes con distrofia muscular de Duchenne que tienen una mejor función muscular, pero disminuyen progresivamente a medida que ellos presentan un deterioro en la función muscular.

## PERSPECTIVAS

Los miRNAs podrían ser considerados como biomarcadores potenciales de la enfermedad ya que su elevación se relaciona con las condiciones fisiopatológicas subyacentes en etapas iniciales, por lo que se pueden considerar como una alternativa para el seguimiento, progreso y respuesta al tratamiento en pacientes con diferente capacidad funcional muscular en la DMD.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Simon, R., Greenberg, D., & Aminoff, M. (2010). *Neurología Clínica* (7a ed., pp. 188-191). McGraw Hill.
2. Theadom, A., Rodrigues, M., Roxburgh, R., Balalla, S., Higgins, C., & Bhattacharjee, R. et al. (2014). Prevalence of Muscular Dystrophies: A Systematic Literature Review. *Neuroepidemiology*, 43(3-4), 259-268. doi: 10.1159/000369343
3. Gawlik, K. (2018). At the crossroads of clinical and preclinical research for muscular dystrophy—are we closer to effective treatment for patients? *International Journal Of Molecular Sciences*, 19(5), 1490. doi: 10.3390/ijms19051490
4. Somavarapu, N. M., & Barma, R. K. (2014). Muscular dystrophy: a review. *Pharma Tutor*, 2(5), 19-30.
5. Castillo Ruiz, V., Uranga Hernández, R., & Zafra de la Rosa, G. (2019). *Genética Clínica* (2a. ed., pp. 563-573.) (2nd ed.). Editorial El Manual Moderno.
6. Guerra-Torres, M., Suárez-Obando, F., García-Roblesa, R., & Ayala-Ramírez, P. (2019). Distrofia muscular de Duchenne/Becker. *Pediatría*, 52(1), 8-14.
7. Srivastava, G., & Srivastava, P. (2018). Application of multiplex pcr for detection of Duchenne muscular dystrophy: a childhood neuromuscular disorder. *Journal Of Neurology And Neuroscience*, 09(03), 1-10. doi: 10.21767/2171-6625.1000262
8. Aartsma-Rus, A., Ginjaar, I. B., & Bushby, K. (2016). The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Medical Genetics*, 53(3), 145–151. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103387>
9. Kasper, D. L., & Martínez, M. E. A. (2008). *Harrison Principios de Medicina Interna* (17a. ed., pp 2682-2688). McGraw-Hill Education.
10. Brooke MH, Griggs RC, Mendell JR, Fenichel GM, Shumate JB & Pellegrino RJ. (1981). Clinical trial in Duchenne dystrophy. The design of the protocol. *Muscle & Nerve*, 4(3), 186-197. <https://doi.org/10.1002/mus.880040304>
11. Vignos, P., & Archibald, K. (1960). Maintenance of ambulation in childhood muscular dystrophy. *Journal Of Chronic Diseases*, 12(2), 273-290. doi: 10.1016/0021-9681(60)90105-3
12. Saavedra, J. S. (2012). *Atlas de Histología, Biología celular y tisular* (1a ed., pp.124). McGraw-Hill Education.
13. Rosenberg, A., Puig, M., Nagaraju, K., Hoffman, E., Villalta, S., & Rao, V. et al. (2015). Immune-mediated pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Science Translational Medicine*, 7(299), 299rv4-299rv4. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa7322
14. Forcina, L., Pelosi, L., Miano, C., & Musarò, A. (2017). Insights into the pathogenic secondary symptoms caused by the primary loss of dystrophin. *Journal Of Functional Morphology And Kinesiology*, 2(4), 44. doi: 10.3390/jfmk2040044
15. Kasper, D. L., Fauci, A. S., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L., & Loscalzo, J. (2018). *Harrison's Principles of Internal Medicine* (20a ed., Vol. 2.). McGraw-Hill Education.
16. Villalta, S. A., Deng, B., Rinaldi, C., Wehling-Henricks, M., & Tidball, J. G. (2011). IFN-γ promotes muscle damage in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy by suppressing M2 macrophage activation and inhibiting muscle cell proliferation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 187(10), 5419–5428. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101267>
17. Kelly-Worden, M., & Thomas, E. (2014). Mitochondrial dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Open Journal Of Endocrine And Metabolic Diseases*, 04(08), 211-218. doi: 10.4236/ojemd.2014.48020
18. Choi, M., Ow, J., Yang, N., & Taneja, R. (2016). Oxidative stress-mediated skeletal muscle degeneration: molecules, mechanisms, and therapies. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2016, 1-13. doi: 10.1155/2016/6842568

19. Giordani, L., Sandoná, M., Rotini, A., Puri, P., Consalvi, S., & Saccone, V. (2014). Muscle-specific microRNAs as biomarkers of Duchenne muscular dystrophy progression and response to therapies. *Rare Diseases*, 2(1), e974969-1- e974969-4. doi: 10.4161/21675511.2014.974969
20. Yu, Yonghui; Chu, Wanli; Chai, Jiake; Li, Xiao; Liu, Lingying; Ma, Li (2015). Critical role of miRNAs in mediating skeletal muscle atrophy (Review). *Molecular Medicine Reports*, 13(2), 1470-1474. doi: 10.3892/mmr.2015.4748
21. Newsholme, P.; Cruzat, V. F.; Keane, K. N.; Carlessi, R.; de Bittencourt, P. I. H. (2016). Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochemical Journal*, 473(24), 4527–4550.
22. Deconinck, N., & Dan, B. (2007). Pathophysiology of Duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatric Neurology*, 36(1), 1-7. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2006.09.016
23. Shin, J., Tajrishii, M. M., Ogura, Y., & Kumar, A. (2013). Wasting mechanisms in muscular dystrophy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(10), 2266–2279. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.05.001>
24. Jelinkova, S., Fojtik, P., Kohutova, A., Vilotic, A., Marková, L., Pesl, M., Jurakova, T., Kruta, M., Vrbsky, J., Gailylova, R., Valášková, I., Frák, I., Lacampagne, A., Forte, G., Dvorak, P., Meli, A. C., & Rotrekl, V. (2019). Dystrophin deficiency leads to genomic instability in human pluripotent stem Cells via NO synthase-induced oxidative stress. *Cells*, 8(1), 53. <https://doi.org/10.3390/cells8010053>
25. Harris, J., & Korolchuk, V. (2018). *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part I Biomedical Science* (1a ed., pp. 145-168). Springer.
26. Timonen, A., Lloyd-Puryear, M., Hougaard, D. M., Meriö, L., Mäkinen, P., Laitala, V., Pölonen, T., Skogstrand, K., Kennedy, A., Airene, S., Polari, H., & Korpimäki, T. (2019). Duchenne muscular dystrophy newborn screening: evaluation of a new GSP® neonatal creatine kinase-MM kit in a US and Danish population. *International Journal of Neonatal Screening*, 5(3), 27. <https://doi.org/10.3390/ijns5030027>
27. Anaya-Segura, M., García-Martínez, F., Montes-Almanza, L., Díaz, B., Ávila-Ramírez, G., & Alvarez-Maya, I. et al. (2015). Non-invasive biomarkers for Duchenne muscular dystrophy and carrier detection. *Molecules*, 20(6), 11154-11172. doi: 10.3390/molecules200611154
28. Lim A. K. (2020). Abnormal liver function tests associated with severe rhabdomyolysis. *World journal of gastroenterology*, 26(10), 1020–1028.
29. Weibrecht, K., Dayno, M., Darling, C., & Bird, S. B. (2010). Liver aminotransferases are elevated with rhabdomyolysis in the absence of significant liver injury. *Journal of Medical Toxicology: Official Journal of the American College of Medical Toxicology*, 6(3), 294–300.
30. Rodríguez-Cruz, M., Almeida-Becerril, T., Atilano-Miguel, S., Cárdenas-Conejo, A., & Bernabe-García, M. (2020). Natural history of serum enzyme levels in Duchenne muscular dystrophy and implications for clinical practice. *American journal of physical medicine & rehabilitation*, 99(12), 1121–1128. <https://doi.org/10.1097/PHM.0000000000001500>
31. Alemán-Ávila, I., Cadena-Sandoval, D., Morales, M. J., & Ramírez-Bello, J. (2019). MicroRNA en enfermedades autoinmunes. *Gaceta Medica de México*, 155(1), 63–71. <https://doi.org/1024875/GMM18003591>
32. Pabón-Martínez, Y. (2011). MicroARNs: una visión molecular. *Revista De La Universidad Industrial De Santander. Salud*, 43(3), 289-297. doi: 10.18273/revsal
33. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
34. Fu, G., Brkić, J., Hayder, H., & Peng, C. (2013). MicroRNAs in human placental development and pregnancy complications. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 5519–5544. <https://doi.org/10.3390/ijms14035519>
35. de Rie, D., Abugessaisa, I., Alam, T., Arner, E., Arner, P., Ashoor, H., Åström, G., Babina, M., Bertin, N., Burroughs, A. M., Carlisle, A. J., Daub, C. O., Detmar, M., Deviatiiarov, R., Fort, A., Gebhard, C., Goldowitz, D., Guhl, S., Ha, T. J., Harshbarger, J., ... de Hoon, M. (2017). An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nature Biotechnology*, 35(9), 872–878. <https://doi.org/10.1038/nbt.3947>
36. Güller, I., & Russell, A. P. (2010). MicroRNAs in skeletal muscle: their role and regulation in development, disease and function. *The Journal of Physiology*, 588(Pt 21), 4075–4087. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.194175>
37. Horak, M., Novak, J., & Bienertova-Vasku, J. (2016). Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. *Developmental Biology*, 410(1), 1-13. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.12.013
38. Ultimo, S., Zauli, G., Martelli, A. M., Vitale, M., McCubrey, J. A., Capitani, S., & Neri, L. M. (2018). Influence of physical exercise on microRNAs in skeletal muscle regeneration, aging and diseases. *Oncotarget*, 9(24), 17220–17237. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24991>
39. Szigartyo, C. A., & Spitali, P. (2018). Biomarkers of Duchenne muscular dystrophy: current findings. *Degenerative neurological and neuromuscular disease*, 8, 1–13. <https://doi.org/10.2147/DNND.S121099>
40. Coenen-Stass, A. M. L., Wood, M. J. A., & Roberts, T. C. (2017). Biomarker potential of extracellular miRNAs in Duchenne muscular dystrophy. *Trends in Molecular Medicine*, 23(11), 989–1001. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.09.002>
41. Siracusa, J., Koulmann, N., & Banzet, S. (2018). Circulating myomiRs: a new class of biomarkers to monitor skeletal muscle in physiology and medicine. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 9(1), 20–27. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12227>

42. Zhang, S., & Chen, N. (2018). Regulatory role of microRNAs in muscle atrophy during exercise intervention. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(2), 405. <https://doi.org/10.3390/ijms19020405>
43. Mizuno, H., Nakamura, A., Aoki, Y., Ito, N., Kishi, S., Yamamoto, K., Sekiguchi, M., Takeda, S., & Hashido, K. (2011). Identification of muscle-specific microRNAs in serum of muscular dystrophy animal models: promising novel blood-based markers for muscular dystrophy. *PLoS One*, *6*(3), e18388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018388>
44. Cacchiarelli, D., Legnini, I., Martone, J., Cazzella, V., D'Amico, A., Bertini, E., & Bozzoni, I. (2011). miRNAs as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Molecular Medicine*, *3*(5), 258–265. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100133>
45. Cacchiarelli, D., Incitti, T., Martone, J., Cesana, M., Cazzella, V., Santini, T., Sthandier, O., & Bozzoni, I. (2011). miR-31 modulates dystrophin expression: new implications for Duchenne muscular dystrophy therapy. *EMBO Reports*, *12*(2), 136–141. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.208>
46. Hu, J., Kong, M., Ye, Y., Hong, S., Cheng, L., & Jiang, L. (2014). Serum miR-206 and other muscle-specific microRNAs as non-invasive biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Neurochemistry*, *129*(5), 877–883. <https://doi.org/10.1111/jnc.12662>
47. Li, X., Li, Y., Zhao, L., Zhang, D., Yao, X., Zhang, H., Wang, Y. C., Wang, X. Y., Xia, H., Yan, J., & Ying, H. (2014). Circulating muscle-specific miRNAs in Duchenne muscular dystrophy patients. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, *3*(7), e177. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.29>
48. Noto, R. E., Leavitt, L., & Edens, M. A. (2021). Physiology, Muscle. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
49. Kell, R. T., Bell, G., & Quinney, A. (2001). Musculoskeletal fitness, health outcomes and quality of life. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, *31*(12), 863–873. <https://doi.org/10.2165/00007256-200131120-00003>
50. Pegoraro, V., Merico, A., & Angelini, C. (2019). MyomiRNAs dysregulation in ALS rehabilitation. *Brain Sciences*, *9*(1), 8. <https://doi.org/10.3390/brainsci9010008>
51. Mazzone, E., Vasco, G., Sormani, M. P., Torrente, Y., Berardinelli, A., Messina, S., D'Amico, A., Doglio, L., Politano, L., Cavallaro, F., Frosini, S., Bello, L., Bonfiglio, S., Zucchini, E., De Sanctis, R., Scutifero, M., Bianco, F., Rossi, F., Motta, M. C., Sacco, A., ... Mercuri, E. (2011). Functional changes in Duchenne muscular dystrophy: a 12-month longitudinal cohort study. *Neurology*, *77*(3), 250–256. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318225ab2e>
52. Birnkrant, D. J., Bushby, K., Bann, C. M., Apkon, S. D., Blackwell, A., Brumbaugh, D., Case, L. E., Clemens, P. R., Hadjiyannakis, S., Pandya, S., Street, N., Tomezsko, J., Wagner, K. R., Ward, L. M., Weber, D. R., & DMD Care Considerations Working Group (2018). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *The Lancet. Neurology*, *17*(3), 251–267. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30024-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30024-3)
53. Koutsoulidou, A., & Phylactou, L. A. (2020). Circulating biomarkers in muscular dystrophies: disease and therapy monitoring. *Molecular therapy. Methods & Clinical Development*, *18*, 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.05.017>
54. McMillan, H. J., Gregas, M., Darras, B. T., & Kang, P. B. (2011). Serum transaminase levels in boys with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Pediatrics*, *127*(1), e132–e136. <https://doi.org/10.1542/peds.2010-0929>
55. Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K. C., Allen, A., Lin, D. W., Urban, N., Drescher, C. W., Knudsen, B. S., Stirewalt, D. L., Gentleman, R., Vessella, R. L., Nelson, P. S., Martin, D. B., & Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(30), 10513–10518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105>
56. Bonanno, S., Marcuzzo, S., Malacarne, C., Giagnorio, E., Masson, R., & Zanin, R. et al. (2020). Circulating myomiRs as potential biomarkers to monitor response to Nusinersen in pediatric SMA patients. *Biomedicines*, *8*(2), 21. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8020021>
57. Lue, Y. J., Lin, R. F., Chen, S. S., & Lu, Y. M. (2009). Measurement of the functional status of patients with different types of muscular dystrophy. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, *25*(6), 325–333. [https://doi.org/10.1016/S1607-551X\(09\)70523-6](https://doi.org/10.1016/S1607-551X(09)70523-6)
58. Bushby, K., & Connor, E. (2011). Clinical outcome measures for trials in Duchenne muscular dystrophy: report from International Working Group meetings. *Clinical investigation*, *1*(9), 1217–1235. <https://doi.org/10.4155/cli.11.113>

## ANEXOS



**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 (PADRES O REPRESENTANTES LEGALES DE NIÑOS O PERSONAS CON DISCAPACIDAD)**

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

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

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

### **Justificación y objetivo de estudio**

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

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

### **Procedimientos**

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

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

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

Después, a su hijo lo pesaremos, le mediremos la talla, la circunferencia de cintura y la circunferencia de cadera. Posteriormente, se le pedirá que usted o su hijo respondan un

cuestionario sobre los datos generales de su hijo como edad, edad a la que iniciaron sus síntomas, edad a la que dejó de caminar (si es el caso) antecedentes familiares de la enfermedad, cuales medicamentos está tomando su hijo, etc.

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

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

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

### **Posibles riesgos y molestias**

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

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

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

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

### **Información sobre resultados**

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

### **Participación o retiro**

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

### **Privacidad y confidencialidad**

Toda la información proporcionada sobre su hijo como nombre, número telefónico, dirección y

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

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

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

### Declaración de consentimiento

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

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

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

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

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

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

---

Nombre y firma de ambos padres o tutores o representante legal

---

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

---

Nombre, dirección, relación y firma

---

Nombre, dirección, relación y firma

## ANEXO 2



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

### CARTA DE ASENTIMIENTO EN MENORES DE EDAD (8 A 17 AÑOS)

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

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

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

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

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

Tu participación en el estudio es voluntaria, es decir, aun cuando tu papá o mamá hayan dicho que puedes participar, si tú no quieres hacerlo puedes decir que no. Es tu decisión si participas o no en el estudio.

También es importante que sepas que, si en un momento dado ya no quieres continuar en el estudio, no habrá ningún problema, o si no quieres responder a alguna pregunta en particular, tampoco habrá problema.

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

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

Si quiero participar

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

Nombre y firma de la persona que obtiene el asentimiento:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

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

## ANEXO 3



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

### SISTEMA DE CLASIFICACIÓN EN LA ESCALA DE VIGNOS

Descripción:

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



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

## SISTEMA DE CLASIFICACIÓN EN LA ESCALA DE BROOKES

Descripción:

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

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

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

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

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

6: Sin función de manos.



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

## **SISTEMA CLASIFICACIÓN DE LA FUNCIÓN MOTORA GRUESA (GMFCS, GROSS MOTOR FUNCTION CLASSIFICATION SYSTEM)**

Descripción:

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.



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

## MEDICAL RESEARCH COUNCIL

Descripción:

Grado 5: Normal.

Grado 5 -: Debilidad perceptible.

Grado 4 +: Debilidad leve pero definitiva.

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

Grado 4 -: Pone mínima resistencia.

Grado 3 +: Resistencia transitoria, pero colapsa abruptamente.

Grado 3: Movimiento activo contra la gravedad.

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

Grado 2: Puede mover si la gravedad es eliminada.

Grado 1: se puede apreciar o palpar movimiento o contracción leve en el musculo.

Grado 0: ausencia total de movimiento.

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

**% MRC** = suma total del puntaje x 100 / número de músculos valorados x 5





## ANEXO 5

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

### EVALUACIÓN DE FUERZA Y FUNCIÓN MUSCULAR

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

Clave \_\_\_\_\_

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





A qué edad dejo de caminar \_\_\_\_\_

**Miembros inferiores:**

Dificultad para subir escaleras \_\_\_\_\_

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

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

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

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

Caídas fáciles \_\_\_\_\_

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

**Miembros superiores:**

Dificultad para levantarlos \_\_\_\_\_

Cargar cosas \_\_\_\_\_

Extenderlos  
(flexión) \_\_\_\_\_

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

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

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

Visión doble (diplopia) no si, inicio \_\_\_\_\_

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

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

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

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

Dolor muscular no si, inicio \_\_\_\_\_

Mioglobinuria (orina roja asociada o no a mialgias) no si, inicio \_\_\_\_\_

Calambres no si, inicio \_\_\_\_\_

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

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

Tratamiento (no) (si),

Especificar \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Rehabilitación (no)(si)

Tipo \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Suplementos vitamínicos o antioxidantes

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dosis, frecuencia, marca y tiempo

\_\_\_\_\_

---

**Antecedentes personales patológicos:**

Hipertensión arterial  
Enfermedades del corazón (especificar)  
Enfermedades del riñón (especificar)  
Enfermedad de la vesícula biliar (especificar)  
Cirugías (especificar)  
Otras (especificar)

**Evaluación de la actividad física:**

¿Practica alguna actividad? Sí ¿Cuál? \_\_\_\_\_ No  
Duración: Mínima/ Día Veces por semana:

**Obesidad:**

Edad de inicio: años  
Peso máximo: Kg. Edad a la que lo presento: Años  
Peso hace un año: Kg.  
Peso más reciente: Kg.

Sobrepeso:

¿Ha presentado una infección aguda en las últimas dos semanas? Sí No

¿Cuál?

**IV. ÁRBOL GENEALÓGICO**

