

AVANCES EN EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES

Tomás López-Alburquerque

Unidad de Enfermedades Neuromusculares

Servicio de Neurología

Hospital Universitario de Salamanca

RESUMEN

El tratamiento de enfermedades neuromusculares, y en particular de la distrofia muscular de Duchenne como entidad paradigmática por su frecuencia y severidad, debe ser realizado por un equipo multidisciplinar. La intervención farmacológica (corticoides) y rehabilitadora, y el control de las complicaciones (cardíacas, respiratorias, músculoesqueléticas) han supuesto una modificación de su historia natural, un aumento de la longevidad y una mejora de la calidad de vida. El apoyo psicosocial al niño y a la familia es necesario. Hay en marcha múltiples estrategias terapéuticas, de tipo celular y génicas, dirigidas a la curación de la enfermedad, aunque la mayoría en una fase experimental. Desafortunadamente, el primer ensayo basado en la técnica del salto del exón con un oligómero antisentido (Ataluren) ha resultado negativo en la DMD.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neuromusculares (ENM) incluyen todos los procesos que afectan a las motoneuronas de las astas anteriores de la médula, las raíces, los plexos y nervios periféricos, la unión neuromuscular y el músculo, tanto de etiología hereditaria o adquirida. Su inclusión dentro de las enfermedades raras no es debido tanto al reducido número de personas que padecen estas enfermedades (unos 40.000 en España) sino a la gran dispersión de entidades nosológicas que se incluyen (más de 150), algunas muy raras y de difícil diagnóstico, que precisan de un equipo de especialistas expertos para su estudio y tratamiento. Por ello, su tratamiento debe ser integral y realizado por un equipo multidisciplinar.

La mayoría de la ENM son crónicas y progresivas, muchas de ellas sin tratamiento curativo en la actualidad, que afectan a diversos órganos y sistemas, como el corazón, sistema respiratorio, esquelético o digestivo. Debido a la discapacidad que producen, los enfermos necesitan programas de rehabilitación, terapia ocupacional, adaptación del entorno doméstico y laboral y apoyo psicosocial. Aunque aún no se ha conseguido el gran reto de encontrar un tratamiento curativo para las enfermedades de origen genético, con los recursos actuales se está modificando la historia natural de muchas de ellas mediante el retrasar y el control de las complicaciones y, en definitiva, se está consiguiendo una mejora de la calidad de vida.

La presente revisión se limitará a distrofia muscular de Duchenne, una miopatía paradigmática, tanto por su frecuencia como por su severidad. Los avances que se obtengan en su tratamiento, particularmente en el ámbito de la genética molecular y de la terapia celular, repercutirán, en mayor o menor medida, en el resto de las miopatías hereditarias.

DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una miopatía hereditaria debida a deleciones, duplicaciones o mutaciones puntuales del gen de la distrofina, que se encuentra localizado en el cromosoma Xp21. Al ser un gen recesivo, la transmiten las mujeres y la padecen los varones, aunque hasta un tercio de los casos son debidos a mutaciones *de novo*. Este gen, uno de los más grandes conocidos (79 exones), codifica una proteína de 427 kDa y 3.685 aminoácidos, la *distrofina*, de localización subsarcolemal, que, junto a otras proteínas denominadas *glicoproteínas asociadas a la distrofina* (2), con las que forma un complejo estructural y funcional, une la actina del citosqueleto de la fibra muscular a la matriz extracelular, ejerciendo una función estabilizadora del sarcolema durante la contracción muscular. Además del músculo esquelético, se encuentra en el músculo cardíaco y liso, y en el cerebro, con diferentes

isoformas según el tejido. La ausencia de distrofina origina la DMD y su deficiencia, la enfermedad de Becker.

La DMD es la forma más grave de distrofia muscular. Afecta aproximadamente a 1 de cada 4.000 varones nacidos vivos (3,4). Se manifiesta antes de los 5 años, con retraso en el inicio de la marcha, debilidad severa de predominio en ambas cinturas y pseudohipertrofia de pantorrillas, que confina al niño a una silla de ruedas al final de la primera década. Se asocia a cardiopatía, leve retraso mental no progresivo en un tercio de los casos y niveles de CK muy elevados por rotura del sarcolema. Fallecen hacia el inicio de la tercera década por insuficiencia cardiorrespiratoria.

La **enfermedad de Becker**, debida a una delección que respeta el marco de lectura genética, y por tanto la síntesis, aunque anómala, de la distrofina, tiene un curso más benigno. Comienza después de los 5 años y caminan después de los 15. Fallecen después de los 40 años. No suelen presentar miocardiopatía sintomática, aunque en algunos casos puede ser grave precisando incluso trasplante cardiaco.

Tratamiento

No existe un tratamiento curativo de esta enfermedad. Las investigaciones terapéuticas se han desarrollado en una triple vertiente: terapias farmacológicas, terapias celulares y terapias génicas. En el campo de la genética, reside el consejo genético, la detección de portadoras y las técnicas de diagnóstico prenatal precoz, incluido el preimplantacional. Los pilares fundamentales del manejo terapéutico continúan siendo la fisioterapia, la cirugía correctora y el tratamiento de las complicaciones (cardíacas, respiratorias, sobrepeso, etc.).

Tratamiento farmacológico

Durante mucho tiempo, las enfermedades genéticas han sido consideradas refractarias al tratamiento farmacológico. A ello ha contribuido su escasa prevalencia, con la consiguiente dificultad para captar pacientes para los ensayos clínicos, y por lo tanto poco atractivas para la industria farmacéutica, los limitados conocimientos fisiopatológicos y las dificultades en el diseño de ensayos clínicos, sobre todo, en la objetivación de la mejoría de la fuerza muscular y en la evaluación de la actividad de la enfermedad. Afortunadamente, todo esto está cambiando durante los últimos años. Los tratamientos farmacológicos de mayor relevancia clínica que se han ensayado en la DMD se exponen a continuación:

Corticoides

La *prednisona* se ha demostrado eficaz en la DMD a dosis de 0.75 mg/kg/día (5) modificando la historia natural de la enfermedad. Los efectos beneficiosos se consisten en aumento de la fuerza y de la masa muscular, enlentecimiento de la progresión de la debilidad, prolongación del tiempo de deambulaci3n (pueden caminar sin muletas hasta los 15 a1os), con la consiguiente reducci3n de las deformidades esquel3ticas y retraso de la necesidad de ventilaci3n asistida, y, finalmente, aumento de la longevidad. En estudios posteriores, se ha comprobado la eficacia, aunque menor, de dosis m1s bajas (0.35 mg/kg/día) (6). Una alternativa razonable sería la administraci3n de una dosis intermedia (0.50 mg/kg/día). Con la pauta de administraci3n en días alternos no se obtuvo una mejoría significativa de la fuerza y no se observó una reducci3n apreciable de los efectos secundarios. Otras pautas se han mostrado tambi3n eficaces, como 5 mg/kg/dosis dos días a la semana (7). Los efectos secundarios m1s frecuentes son ganancia de peso (síndrome cushingoide en el 50% de los casos), retraso del crecimiento, diabetes, osteoporosis, aumento de infecciones, hipertensi3n, etc. Por este motivo, no es una terapia universalmente aceptada. Una alternativa es el *deflazacort*, un derivado sint3tico de la prednisona, que es tan eficaz como ésta y tiene menos efectos secundarios, particularmente aumento de peso. La dosis establecida es de 0.9 mg/kg/día en una única dosis matutina (8).

Se desconoce la edad m1s apropiada para iniciar el tratamiento con corticoides en la DMD. El principal problema estriba en los efectos secundarios, particularmente el retraso del crecimiento. Una opci3n de compromiso sería comenzar el tratamiento hacia los 4-5 a1os de edad. Otros investigadores recomiendan iniciar el tratamiento cuando los ni1os presentan caídas frecuentes por problemas de la deambulaci3n.

El mecanismo por el que actúan los corticoides se desconoce. En principio va contra el sentido com3n, ya que los corticoides tienen un efecto catab3lico sobre el m3sculo. Inicialmente, se administraron para controlar la inflamaci3n secundaria observada en el m3sculo distr3fico. Sin embargo, no se ha demostrado que la mejoría se deba a este efecto, ya que la prednisona no ha sido eficaz otras distrofias, como la facioescapulohumeral, donde aparecen con m1s frecuencia signos inflamatorios en el m3sculo. Podrían actuar estabilizando la membrana, por un mecanismo inespecífico o por un efecto general anabolizante. En cualquier caso, se ha demostrado que la administraci3n de corticoides a pacientes con DMD no aumenta la expresi3n de la distrofina en el m3sculo.

Esteroides anabolizantes

Se cree que los esteroides anabolizantes actúan aumentando el efecto o la producción del factor-1 de crecimiento de la insulina. En la DMD, se ha ensayado la *oxandrolona*, un derivado sintético de la testosterona, que requiere monitorización de la función hepática y de la tensión arterial. Aunque en un estudio piloto se demostró eficaz en la DMD (9), ensayos posteriores no han confirmado estos resultados (10).

Agonistas beta-adrenérgicos

Los estudios experimentales en modelos animales han mostrado que los agentes beta-adrenérgicos aumentan la proliferación de células satélites y de proteínas musculares, inhiben la proteólisis muscular y tienen efectos protectores en la denervación, en la sepsis, en la atrofia por esteroides y en el ratón mdx (modelo de DMD).

En un ensayo clínico con *albuterol (salbutamol)* durante 12 semanas en la DMD, se produjo un aumento de la masa corporal y una reducción del contenido de grasa, así como una mejoría de algunos test funcionales (deambulación), pero no se observó mejoría de la fuerza en las extremidades (11). El medicamento fue bien tolerado, aunque puede producir algunos efectos secundarios, como taquicardia, nerviosismo, temblor, palpitaciones, calambres en piernas, mareo, cefalea, alteraciones gastrointestinales. Antes de su administración, es preciso realizar un estudio de la función cardíaca y hepática.

Creatina

La creatina, que forma parte de múltiples suplementos vitamínicos y de forma natural de la carne y el pescado, es un complemento alimenticio utilizado para aumentar la masa muscular. Tiene un efecto protector del daño oxidativo en las mitocondrias, aunque no se ha demostrado ningún efecto positivo en las enfermedades mitocondriales (12). Con dosis de 5 g/día en niños y 10 g/día en adultos, se ha observado una leve aunque significativa mejoría en algunas distrofias musculares (13), que no se ha confirmado en ensayos posteriores (14). No se observó ningún efecto secundario. No debe administrarse si se detectan signos de insuficiencia renal.

Glutamina

La glutamida es un aminoácido no esencial que se produce y se almacena principalmente en el músculo y se ha mostrado eficaz en diferentes estados catabólicos. Su síntesis *de novo* se encuentra reducida en la DMD (15). Debido a que esta deficiente síntesis podría reflejar un descenso de su producción muscular, se

llevó a cabo un ensayo clínico en 30 niños con DMD que conservaban su capacidad deambulatoria. La ingestas de glutamina (0.5 g/kg/día) durante dos periodos de 4 meses no supuso ningún beneficio frente a placebo en los parámetros seleccionados (deambulación, fuerza o masa muscular) (16).

No hay evidencia de otros suplementos alimenticios, como el coenzym Q10, la carnitine o los antioxidantes, mejoren la DMD (17).

TERAPIA CELULAR (TRANSPLANTE DE MIOBLASTOS)

Esta técnica consiste en inyectar mioblastos de un donante sano en el interior de los músculos de pacientes con DMD con la finalidad de que se fusionen a las fibras distróficas y reparen el defecto genético de éstas mediante la síntesis de distrofina.

Los mioblastos tienen varios orígenes. Habitualmente, se obtienen mediante la activación de las *células satélite*, que son células miógenas mononucleadas de reserva que están adosadas a la fibra madura, sobre el sarcolema, por debajo de la membrana lámina basal o lámina externa. Se identifican porque poseen un marcador específico, la proteína de superficie M-caderina (M-cad).

Los mioblastos también pueden obtenerse de la *células mesenquimales pluripotenciales del tejido conectivo* (fibroblastos de la dermis o músculo liso de los vasos) o de la *médula ósea*. Como inductor de la diferenciación de las células mesenquimales del tejido conectivo se utiliza una lectina, denominada proteína unida a la α beta-galactosidasa (*beta-galactosidase-binding protein*). Para inducir la miogénesis se utiliza el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I y IGF-II). Para realizar esta conversión *in vitro* se requieren varios meses.

En los ensayos clínicos realizados en pacientes con DMD, aunque aparece un discreto aumento (10%) de la producción de distrofina, no se ha observado mejoría de la fuerza (18). Aparte del rechazo (al parecer, no sobreviven los mioblastos transplantados), existen otros problemas técnicos que aún no han sido resueltos, particularmente, la producción de mioblastos en cantidad suficiente y la necesidad de realizar múltiples inyecciones en los diferentes músculos, algunos de difícil acceso. En la actualidad, se está investigando una terapia mixta para evitar el rechazo que consiste en extraer mioblastos de un paciente con DMD, manipularlos genéticamente (introducción del gen de la distrofina) y reimplantarlos en el mismo paciente. La utilización de células precursoras de la médula ósea podría resolver el problema de las dianas (implantación de los mioblastos en los diferentes músculos) por la fácil accesibilidad del torrente sanguíneo a todos los tejidos (19).

TERAPIA GÉNICA

La terapia génica consiste en la introducción dentro de la célula muscular enferma del gen normal, para que produzca la proteína adecuada. Este procedimiento se denomina *transfección*. En la actualidad, nos encontramos en los inicios de la *genética molecular terapéutica o reparadora*.

La *transfección*, como se ha expuesto, es el proceso por el que un gen o un fragmento de ADN foráneo es introducido en el interior de una célula. Para que esto sea posible debe disponerse del gen en unas concentraciones determinadas mediante su aislamiento y clonación en bacterias. Normalmente, el gen se administra unido a un segmento de ADN que puede facilitar la captación por la célula. Aunque el gen puede ser captado de forma directa, existen unos métodos o vectores que mejoran la transfección. Estos vectores pueden ser químicos (fosfato de calcio, liposomas), físicos (microinyección, electroporación, bombardeo de micropartículas) o biológicos (virus, particularmente adenovirus y retrovirus). Idealmente, un vector debería poseer las siguientes características: no ser inmunógeno, tóxico ni degradable con el paso del tiempo, y penetrar específicamente en el músculo.

Los métodos físicos y químicos suelen tener una eficacia baja y una expresión con frecuencia transitoria, ya que el ADN no suele alcanzar el núcleo celular e integrarse en el ADN nuclear, al ser destruido precozmente por nucleasas, con formación de pequeños oligonucleótidos, que desencadenan una reacción inmune.

Los virus, particularmente los adenovirus, son los vectores más eficaces. Entre sus ventajas destacan que pueden producirse en grandes cantidades, transferirse a células proliferativas y no proliferativas y no producen mutagénesis insercional, como los retrovirus, debido a su localización epicromosómica. Presentan algunas desventajas, como la inducción de respuesta inflamatoria y la limitada duración de la expresión (de semanas a meses), precisando una readministración periódica, y la dificultad para llegar a todos los blancos. Asimismo, tienen dificultad para vehicular genes de gran tamaño como el de la distrofina. Este problema se ha intentado solventar con la transfección de una parte del gen, una minidistrofina obtenida por ingeniería genética capaz de restablecer la estabilidad funcional a la membrana (20).

Los genes pueden ser manipulados con fármacos. Entre un 5% y un 15% de los niños con DMD presentan una mutación "sin sentido" (*nonsense*) que da lugar un codón stop prematuro en el gen de la distrofina y produce una interrupción de la síntesis de la proteína, dando lugar a una distrofina incompleta no funcionante. Investigaciones sobre ratones con DMD (*mdx*) demostraron que añadiendo gentamicina, las fibras musculares obviaban este codón stop prematuro y sintetizaban la proteína de la distrofina completa (21). Esta técnica, que se la conoce como "*salto del exón*" (*exon skipping*), pretende obviar o saltar la lectura del codón mutado

durante la traducción (lectura del ARNm por los ribosomas) continuando la síntesis completa de la distrofina tras haberse restablecido el marco de lectura. Los ensayos clínicos con gentamicina han arrojado resultados dudosos (22). Posteriormente, se ha llevado a cabo un ensayo clínico con el PTC 124, denominado genéricamente Ataluren, un oligonucleótido antisentido de administración oral. En cultivos celulares, en modelos animales y en un ensayo en fase IIa, se comprobó su capacidad para producir distrofina funcionante y para descender los niveles de CK sanguínea (23). Recientemente, la compañía PTC Therapeutic ha comunicado que el ensayo en fase IIb con este fármaco ha sido negativo en niños con DMD que mantenían la capacidad de caminar. El primer objetivo del ensayo (la distancia capaz de caminar en seis minutos) no mostró diferencias significativas entre los grupos tratados y no tratados durante 48 semanas. Entre los aspectos positivos del ensayo, destacan la buena tolerancia del medicamento (ningún paciente abandonó el estudio) y la ausencia de efectos secundarios significativos. Está pendiente el análisis por subgrupos y prosigue el estudio en otras enfermedades, como la fibrosis quística y la hemofilia.

Otra posibilidad de tratamiento génico en las distrofinopatías consiste en estabilizar la membrana induciendo la sobreexpresión de *utrofina*, una molécula estructural y funcionalmente similar a la distrofina en un 80%, que se expresa en las uniones neuromuscular y miotendinosa (24). Los ensayos en modelos animales (ratones mdx) son prometedores (25).

La *miostatina* es un regulador negativo del crecimiento muscular. Estudios iniciales sobre ratones mdx (modelo de DMD) a los que se les había suprimido el gen de la miostatina desarrollaron mayor masa y fuerza muscular (26). La inhibición de la miostatina mediante la folistina o anticuerpos específicos abre una nueva vía para la regeneración muscular en la DMD.

Diagnóstico prenatal y preimplantacional

El diagnóstico prenatal puede realizarse mediante amniocentesis o biopsia de las vellosidades coriónica a las 8 semanas con vistas a un aborto siempre condicionado por los principios éticos de la gestante. Una opción más avanzada consiste en la fecundación *in vitro*, estudio genético de los embriones e la implantación posterior solamente de aquellos en los que se ha descartado la enfermedad (27).

Consejo genético y detección de portadoras

La madre de un niño con DMD que tiene un familiar varón afectado (hermano, tío materno o sobrino) es portadora obligada. Una mujer es portadora probable si tiene

dos hijos afectados o un hijo y un nieto, y posible portadora, si solo tiene un hijo con la enfermedad.

Cuando se conoce el tipo de deleción que presenta el niño con DMD, la detección de portadoras se realiza fácilmente. En caso negativo, el procedimiento es más complejo. Puede servir de ayuda la historia clínica (presencia de mialgias o calambres), la exploración neurológica (debilidad muscular, pseudohipertrofia de pantorrillas cardiopatía en un 5-10% portadoras), la determinación de CK (está aumentada en el 70% de las portadoras), el ECG, el EMG y la biopsia muscular. En la información de los resultados a las portadoras debe preservarse la confidencialidad y, en el caso de hermanas pequeñas, retrasarla hasta la edad en que puedan tomar decisiones.

Conviene tener presente que hasta un tercio de los casos de DMD se deben a mutaciones *de novo*.

Fisioterapia

La fisioterapia continua siendo un arma terapéutica básica en el manejo de la DMD para evitar o retrasar la retracción tendinosa, las contracturas articulares, las deformidades esqueléticas y la insuficiencia respiratoria. Deben establecerse programas de movilización activa y pasiva de las articulaciones. Las ortesis nocturnas están indicadas para prevenir la retracción aquílea. Son beneficiosos la natación y los ejercicios en bicicleta siempre realizados a un nivel intermedio, nunca forzados. Frente a la creencia derivada de modelos animales con distrofinopatía (ratón mdx) de que el los ejercicios de entrenamiento muscular podrían tener un efecto deletéreo sobre la integridad muscular, estudios recientes en sujetos con enfermedad de Becker han demostrado que el entrenamiento muscular (pedaleo en bicicleta) es beneficioso (28). No existe acuerdo sobre la conveniencia de los ejercicios para el fortalecimiento de la musculatura respiratoria (29).

Cirugía

La cirugía de la retracción del tendón de Aquiles es la que se practica con más frecuencia. Como se ha referido previamente, las ortesis nocturnas y los ejercicios de elongación pueden retrasar su indicación.

La escoliosis se desarrolla muy precozmente en la mayoría de los niños con DMC cuando quedan confinados en silla de ruedas y va a determinar problemas con la sedestación y la respiración. La utilización de corsés no previene la escoliosis (30), aunque las ortesis articulares en piernas dirigidas a prolongar la deambulaci3n pueden retrasar su aparici3n. Se han identificado como factores de riesgo de escoliosis en

niños con DMD de diez años el deterioro progresivo de la capacidad vital forzada en exámenes periódicos, la edad en la que se pierde la deambulación y un ángulo de Cobb $>30^{\circ}$ (31). Los objetivos de la intervención quirúrgica son mejorar la función cardiorrespiratoria, equilibrar la sedestación y mejorar la estética y la calidad de vida.

Tratamiento de las complicaciones

Respiratorias

La supervivencia de los pacientes con DMD depende, por el momento, de la efectiva prevención y tratamiento de las complicaciones, particularmente, cardiorrespiratorias (infecciones, neumonías, atelectasias, etc.). Se deben realizar revisiones periódicas por el neumólogo que indicará las vacunaciones oportunas y el momento de instaurar la ventilación mecánica no invasiva (BiPAP) (32).

Cardíacas

La DMD cursa con miocardiopatía y/o arritmia, que se traduce en un patrón electrocardiográfico característico (taquicardia, aumento de RS en V1 y aumento de la onda Q en las derivaciones I, aVL, V5 y V6) (33). Es necesario hacer controles periódicos por un cardiólogo, sobre todo a partir de los 6 años. Se han publicado guías sobre los estudios que se deben realizar y tratamientos indicados (34).

Digestivos

Los pacientes con DMD pueden presentar desnutrición o sobrepeso dependiendo del momento evolutivo de la enfermedad. La disfagia aparece en las fases finales de la enfermedad. La limitación de la movilidad puede originar estreñimiento. Estas y otras complicaciones requieren la supervisión de un especialista en nutrición y gastroenterólogo.

Apoyo psicosocial

El apoyo psicosocial es obligado tanto para el niño como para la familia, que sufre un gran estrés emocional y puede derivar en depresión (35). Algunos niños presentan una leve deficiencia cognitiva que debe ser adecuadamente evaluada y tratada. Pueden presentar ansiedad, depresión y trastornos del comportamiento, como hiperactividad y déficit de atención, trastorno obsesivo-compulsivo o autismo (36).

BIBLIOGRAFÍA

1. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurol* 2010; 9: 177-89.
2. Campbell KP, Kahl SD. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 1989; 338: 259-62.
3. Emery AEH. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases. –a world survey. *Neuromusc Dis* 1991; 1: 19-29.
4. Dooley J, Gordon KE, Dodds L, et al. Duchenne muscular dystrophy: a 30-year population-based incidence study. *Clin Pediatr (Phila)* 2010; 49:177-9.
5. Mendell JR, Moxley RT, Griggs RC, et al. Randomized six-month trial of prednisone in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 1989;320:1592–1597.
6. Backman E, Henriksson KG. Low-dose prednisolone treatment in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromusc Disord* 1995;3:233–241.
7. Connolly AM, Schierbecker J, Renna R, et al. High dosis weekly oral prednisone improves strength in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2002; 12: 917-25.
8. Bonifati MD, Ruzza G, Bonometto P, et al. A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2000; 23: 1344-7.
9. Fenichel G, Pestronk A, Florence J, et al. A beneficial effect of oxandrolone in the treatment of Duchenne muscular dystrophy: a pilot study. *Neurology* 1997;48:1225-6.
10. Fenichel GM, Griggs RC, Kissel J, et al. A randomized efficacy and safety trial of oxandrolone in the treatment of Duchenne dystrophy. *Neurology* 2001; 56:1075-9
11. Skura CL, Fowler EG, Wetzel GT, et al. Albuterol increases lean body mass in ambulatory boys with Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Neurology* 2008;70:137-43.
12. Klopstock T, Querner V, Schmidt F, et al . A placebo-controlled crossover trial of creatine in mitochondrial diseases. *Neurology* 2000; 55:1748-51.

13. Walter MC, Lochmüller H, Reilich P, et al. Creatine monohydrate in muscular dystrophies: A double-blind, placebo-controlled clinical study. *Neurology* 2000; 54:1848-50.
14. Escolar DM, Buyse G, Henricson E, et al. CINRG randomized controlled trial of creatine and glutamine in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2005; 58:151-5.
15. Hankard R, Mauras N, Hammond D et al. . Is glutamine a 'conditionally essential' amino acid in Duchenne muscular dystrophy?. *Clin Nutr.*1999 Dec;18(6):365-9.
16. Mok E, Letellier G, Cuisset J, et al. Lack of functional benefit with glutamine versus placebo in Duchenne muscular dystrophy: a randomized crossover trial. *PLoS One* 2009;4(5):e5448.
17. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial Management. *Lancet Neurol* 2010; 9: 77–93.
18. Mendell JR, Kissel JT, Amato AA, et al. Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 1995;333: 832–838.
19. Pennisi E. Bone marrow cells may provide muscle power. *Science* 1998;279:1456.
20. Decrouy A, Renaud JM, Davies HL, et al. Mini-dystrophin gene transfer in mdx4cv diaphragm muscle fibers increases sarcolemmal stability. *Gene Ther* 1997;4: 401–408.
21. Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, et al. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest* 1999;104:375-81.
22. Aurino S, Nigro V. Readthrough strategies for stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol* 2006; 25:5-12.
23. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 2007;447:87-91.
24. Rafael JA, Tinsley JM, Potter AC, et al. Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. *Nature Genet* 1998;19:79–82.
25. Miura P, Jasmin BJ. Utrophin upregulation for treating Duchenne or Becker muscular dystrophy: how close are we?. *Trends Mol Med* 2006; 12:122-9.
26. Wagner KR, McPherron AC, Winik N, et al. Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Ann Neurol.* 2002;52:832-6.

27. Malcov M, Ben-Yosef D, Schwartz T et al. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) for Duchenne muscular dystrophy (DMD) by triplex-nested PCR. *Prenat Diagn* 2005; 25:1200-5.
28. Sveen ML, Jeppesen TD, Hauerslev S, et al. Endurance training improves fitness and strength in patients with Becker muscular dystrophy. *Brain* 2008;131:2824-31.
29. Finder JD, Birnkrant D, Carl J, et al. Respiratory care of the patient with Duchenne muscular dystrophy: ATS consensus statement. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:456–465
30. Mullender M, Blom N, De Kleuver M, et al. A Dutch guideline for the treatment of scoliosis in neuromuscular disorders. *Scoliosis* 2008;3:14.
31. Oda T, Shimizu N, Yonenobu K, et al. Longitudinal study of spinal deformity in Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Orthop* 1993;13:478–488.
32. Eagle M, Baudoin V, Chandler C, Giddings DR, Bullock R, Bushby K. Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation. *Neuromuscul Disord* 2002; 12: 926-9.
33. Chenard AA, Becane HM, Tertrain F, et al. Ventricular arrhythmia in Duchenne muscular dystrophy: prevalence, significance and prognosis. *Neuromuscul Disord* 1993; 3: 201–06.
34. American Academy of Pediatrics Section on Cardiology and Cardiac Surgery. Cardiovascular health supervision for individuals affected by Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Pediatrics* 2005;116: 1569–73.
35. Abi Daoud MS, Dooley JM, Gordon KE. Depression in parents of children with Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Neurol* 2004; 31: 16–19.
36. Hendriksen JG, Vles JS. Neuropsychiatric disorders in males with Duchenne muscular dystrophy: frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive-compulsive disorder. *J Child Neurol* 2008; 23: 477–81.