



Cuarta conferencia de mesa redonda en Mónaco del 15 de Enero de 2005: Regulación del crecimiento muscular: ¿Un método terapéutico para distrofia muscular Duchenne?

Tres acercamientos farmacológicos pueden ser más rápidos que las técnicas de terapia génica para desarrollar un fármaco que pueda mantener los músculos y su función por un tiempo limitado.

La cuarta conferencia de mesa redonda en Mónaco tomo lugar el 15 de Enero de 2005. Como las mesas redondas anteriores, fue organizada y financiada por la *Association Monégasque Contre les Myopathies* y el *Duchenne Parent Project France*, ambas pertenecientes al internacional *United Parent Projects Muscular Dystrophy*, UPPMD. Dieciocho científicos de seis países fueron invitados a presentar y discutir los resultados de sus investigación sobre diferentes acercamientos para mantener la masa y función muscular de los chicos con DM Duchenne, no por técnicas genéticas, si no por métodos más convencionales como fármacos conocidos, acercamientos que podrían ser capaces de ayudar a los pacientes durante un tiempo limitado mientras ellos esperan una cura de largo plazo. Once representantes de las asociaciones de padres de ocho países estaban también presentes, principalmente porque

sus miembros, las familias con chicos con DM Duchenne, son aquellos que están más interesados en el progreso de la investigación que beneficiará a sus niños. Este informe es escrito para ellos y para todas las otras familias Duchenne en el mundo entero, así como también para sus pediatras. Este texto no es un informe científico, pero trata de resumir lo que dijeron los científicos en un lenguaje que pueda entenderse fácilmente.

Esta cuarta conferencia de mesa redonda constaba de tres sesiones principales sobre: *factor de crecimiento similar a la insulina*, *inhibidores de proteasa* y *miostatina*, cada uno precedido por una introducción. Los científicos son mencionados en este informe sin sus títulos. La mayoría de ellos son profesores y todos tienen un doctorado en medicina (MD) o ciencia (PD).

El factor de crecimiento similar a la insulina, IGF-1, estimula la regeneración muscular.

El IGF-1 todavía no es un fármaco para DM Duchenne.

En su introducción, **Gill Butler-Browne** del *Hôpital Pitié-Salpêtrière* en París advirtió que el IGF-1, el cual es ofrecido en Internet como un medio de retardar el envejecimiento, no debería ser usado como una terapia para distrofia muscular antes de que un efecto beneficioso haya sido probado en pruebas clínicas. Aunque ha sido demostrado que este factor de crecimiento causa hipertrofia muscular en ratones vivos – un aumento de tamaño de las células musculares, pero no un aumento de su número-, este parece sólo tener un pequeño efecto en cultivos de células musculares humanas, probablemente debido a que el número de células de satélite, las cuales regeneran las fibras musculares dañadas, no aumentan junto con un tamaño mayor de las células musculares. Y los músculos aumentados en los ratones no parecen tener una mejor función a menos que ellos sean ejercitados al mismo tiempo. Así, antes de que el IGF-1 puede ser recomendado para niños con distrofia muscular, debe ser probado que no sólo el tamaño de los músculos aumenta sino también su función sin la necesidad de ejercicio físico excesivo y sin un agotamiento del número limitado de células satélite, lo que significaría una disminución de la capacidad de regeneración muscular.

Ratones con más IGF-1 de lo normal. **Nadia Rosenthal** del *Laboratorio Europeo de Biología Molecular* en Monterotondo cerca de Roma describió sus experimentos con ratones que habían sido genéticamente alterados para producir cantidades mayores de lo normal del factor de crecimiento natural IGF-1.

Tal factor, una proteína de aproximadamente 70 aminoácidos en una cadena con tres puentes químicos que la estabilizan, así como con una forma similar a la insulina, existe en seis formas con estructuras ligeramente diferentes. Los efectos de estas formas diferentes no son sólo positivos como la promoción del crecimiento de la célula muscular, sino también negativos como causar cáncer. Una de las diferentes formas, llamada mIGF-1, que esta localizada en el tejido muscular, es de interés para un posible uso terapéutico en niños con DM Duchenne.

A fin de contestar la pregunta de lo que pasará cuando la cantidad del mIGF-1 en los músculos es aumentada por encima del bajo nivel normal, fueron creados ratones transgénicos que no tenían ninguna distrofia, pero que tenían genes extra del IGF-1 en los núcleos de sus células musculares. Este fue hecho con técnicas genéticas que no pueden ser aplicadas en la gente. Estos *ratones no-*

distróficos con altas concentraciones de mIGF-1 mostraron una fuerte hipertrofia muscular después de 14 meses. Algunos otros efectos eran una disminución de la grasa, el mantenimiento extendido de la masa y fuerza muscular en animales envejecidos, y una curación acelerada del músculo lesionado. El mIGF-1 adicional no indujo problemas cardíacos, no promovió el cáncer, y no tenían ningunos otros efectos secundarios patológicos. Los ratones mdx *distróficos*, los cuales tenían también genes IGF-1 adicionales, mostraron una inflamación y fibrosis menor, y redujo mucho la degeneración muscular. Así el mIGHF-1 mejora el ambiente local para una eficiente regeneración muscular.

Antes que el IGF-1 sea aplicado como un fármaco terapéutico para pacientes con DM Duchenne, tiene que ser encontrada una manera de tener de forma más eficaz el factor, mIGF-1, en los músculos sin necesidad de transferir su gen, es decir sin procedimientos genéticos. Simplemente ingerir el compuesto purificado o una mezcla indeterminada de diferentes formas como es ofrecido en Internet, o inyectándolo en la corriente de sangre o directamente en los músculos será ineficaz o hasta peligroso.

Mejora de función de corazón en hámsteres por IGF-1.

Yves Fromes del *Institut de Myologie* en París describió sus estudios para mejorar la función cardíaca de hámsteres. Animales con un defecto genético después de una mutación espontánea fueron usados. Ellos tenían una distrofia del Anillo Óseo (Cinturas) con una afectación cardíaca, que era clínicamente similar a la distrofia del corazón en las etapas tardías de los pacientes con DM Duchenne y Becker.

Dos formas diferentes de proteínas IGF-1 humanas hechas artificialmente fueron aplicadas a estos hámsteres de dos

maneras, inyectándose bajo la piel, subcutáneamente, o transfiriendo su gen como ADN desnudo por un plásmido directamente en el músculo del corazón. Después de unas semanas, los signos patológicos fueron considerablemente normalizados, especialmente la dilatación del corazón, su fibrosis fue reducida y la contractibilidad de los músculos cardíacos fue mejorada.

Esta terapia IGF-1 parece ser segura sin efectos secundarios negativos. Sin embargo, hay probablemente un rango de concentración óptimo de IGF-1 porque un exceso puede inducir una hipertrofia indeseable de los músculos cardíacos.

Tratamiento con IGF-1, una estrategia para generar

crecimiento muscular. En la primera parte de su presentación, **Lorenzo Puri** del *Dulbecco Telethon Institute* en Castel Romano cerca de Roma, Italia, habló en la primera parte de la presentación de sus estrategias para aumentar la regeneración muscular. Esto puede ser hecho activando o inhibiendo genes que influyen en las células satélite. Estas células satélite son necesarias para reparar las células musculares después de una lesión, o durante la degeneración muscular causada por la ausencia de distrofina en pacientes con distrofia muscular Duchenne.

El IGF-1 es uno de muchos factores que activan los genes miogénicos que producen nuevos componentes musculares y organizan su correcta interacción para crear nuevas estructuras en la célula muscular después de un daño o degradación. El conocimiento cada vez más detallado de las vías de señalización, en las cuales el IGF-1 participa, permitirá encontrar intervenciones terapéuticas con otros factores que podrían dirigir posiblemente la influencia del IGF-1 en músculos *distróficos* y así aumentar su actividad.

Inhibidores de proteasa, leupeptina y BBIC, retardan la degeneración muscular.

El papel de las proteasas. **Alfred Stracher** de la *Universidad Estatal de Nueva York* inicio esta sesión explicando que la degradación muscular en la distrofia Duchenne es principalmente causada por la enzima *calpaina*, una enzima que destruye proteínas, una proteasa, la cual es activada por el calcio. Las células musculares contienen una forma inactiva de esta enzima en sus estructuras contráctiles. Cuando, como en la distrofia Duchenne, las membranas de la célula muscular son dañadas por la ausencia de distrofina, iones de calcio del exterior de la célula llegan hasta la *calpaina* y la activan conduciendo así a la destrucción extendida de la mayor parte de las proteínas en la célula. Usando inhibidores de la *calpaina* como un tripeptido modificado, la *leupeptina*, que consiste de tres aminoácidos - leucina-leucina-arginina-, la degradación muscular en ratones mdx puede ser casi completamente parada. La *leupeptina* puede ser dada por vía de la boca y puede ser por lo tanto idealmente dada como una terapia de la distrofia Duchenne.

En un estudio clínico preliminar en Italia, siete chicos con Duchenne, de 8 a 12 años de edad, fueron tratados durante un año con dosis muy bajas de *leupeptina*. Sus niveles activos de creatina kinasa (CK) disminuyeron considerablemente de aproximadamente 10 000 U/L a entre 600 y 2

000 U/L. Esto es una indicación de una disminución de la degradación muscular.

Prueba clínica del inhibidor de la calpaina C101. La *CepTor Corporation* en Baltimore desarrolla un inhibidor de la *calpaina* basado en los resultados experimentales positivos con la *leupeptina*. **Theresa Michele**, la vicepresidente de la investigación para la compañía, reporto sus esfuerzos para dirigir la *leupeptina* hacia los músculos, principalmente combinando *leupeptina* modificada con carnitina para la cual las células musculares tienen una proteína receptora en sus membranas.

Pruebas de este nuevo compuesto, llamado C101 o *Myodur*, en ratones y perros son iniciadas para asegurar que una aplicación a largo plazo en niños será posible.

Un formato de nuevo fármaco de aplicación investigacional (IND) será llenada con la agencia licenciada de la FDA a finales del 2005, de modo que un estudio clínico fase-I/II para probar la seguridad y farmacocinética, el destino final del fármaco en el cuerpo, comience en los Estados Unidos en el 2006. Debido a su denominación de fármaco huérfano como compuesto terapéutico para DM Duchenne, niños con DM Duchenne de 6 a 13 años de edad participarán en este primer estudio clínico.

Inhibidor de la calpaina BBIC. Lee Sweeney de la *Universidad de Pennsylvania* en Filadelfia habló de otra proteína capaz de bloquear la actividad de proteasas llamada *inhibidor concentrado Bowman-Birk* (BBIC) que es una proteína natural formada de 71 aminoácidos y aislada de las semillas de la soya (soja). El BBIC no es activo contra la calpaina la cual es una proteasa de la cisteína, pero si contra las proteasas de la serina como las enzimas digestivas normales tripsina y quimotripsina. Esta proteína puede ser aplicada oralmente. Es demasiado grande para entrar en las células musculares así que esta actúa fuera de las células bloqueando una vía de señalización. Las semillas de la soya (soja) contienen a otros inhibidores de proteasas también, pero el BBIC debe ser purificado de ellas, comer las semillas directamente no tiene ningún efecto. El BBIC bloquea el proceso distrófico en ratones mdx inhibiendo la degradación muscular. La masa muscular es aumentada y la fuerza muscular es también aumentada, así las células musculares más grandes también aumentaron la fuerza. Los niveles activos de CK se redujeron bastante y la fibrosis también. Y de otras aplicaciones en pacientes de cáncer se sabe que el BBIC es un fármaco muy seguro. De este modo, las pruebas humanas con niños con Duchenne están ya siendo preparadas por el NIH. El BBIC hace más lento el proceso de degradación. Una futura terapia de DM Duchenne podría usar ambos acercamientos: BBIC o leupeptina para bloquear la degradación muscular, y el IGF-1 para estimular el proceso de regeneración.

Estudio clínico del BBIC. Kenneth Fischbeck de los *Institutos Nacionales de la Salud (NIH)* en Bethesda cerca

La inhibición de la Miostatina libera la limitación del crecimiento muscular

Innervación de las fibras musculares. Jean-Marie Gillis de la *Université de Louvain* en Bruselas inicio esta sesión describiendo la manera que la motoneuronas, los nervios que transmiten las órdenes de movimiento que se forman en el cerebro al músculo, que se conectan con las fibras musculares.

Cada fibra nerviosa individual se conecta con un grupo de fibras musculares, una unidad motora. No todas las unidades motoras trabajan simultáneamente, sólo tantas como son necesarias por la demanda de fuerza para llevar a cabo un movimiento deseado. Durante la contracción muscular, las unidades motoras son activadas en un patrón rotativo. Las fibras musculares individuales tienen diámetros diferentes, y entre más grande el diámetro, más fuerza puede producir una fibra.

Cuando una fibra muscular se hipertrofia, es decir cuando es aumentada por fármacos o actividad muscular, esta puede producir más fuerza. Así, cuando un músculo hipertrofiado tiene que producir una cierta fuerza, este tendrá que contraerse menos a menudo que un músculo normal. Cada fibra muscular individual de un chico con Duchenne tendría que trabajar entonces menos a menudo cuando su tamaño ha sido aumentado después de un tratamiento con un fármaco. Esta reducción en la carga de trabajo individual genera menos estrés en las fibras y disminuye el daño

de Washington reporto el primer estudio clínico planeado con el inhibidor de proteasa natural BBIC. Este compuesto ha sido probado como fármaco potencial para el cáncer y anti-inflamatorio en seis estudios clínicos de fase-I en aproximadamente 150 adultos sin ningún efecto secundario tóxico. Pero no ha sido todavía probado en niños.

La primera prueba clínica fase-I con niños con Duchenne está siendo preparada ahora. Esta comenzará en el otoño del 2005. Quince niños, de 4 a 8 años de edad, participarán. Diferentes dosis de BBIC serán usadas mayores a 2 000 unidades por día durante un mes. Un gramo de BBIC purificado contiene 500 a 600 unidades. Este es un polvo que los niños pueden beber disuelto en jugo de fruta. El objetivo de la prueba es descubrir cualquier efecto secundario y determinar la dosis máxima tolerada.

Una prueba de fase-II seguirá en el 2006, esta será aleatoria, con método doble ciego, prueba controlada con placebo con 24 niños de entre 4 a 6 años de edad con Duchenne durante 6 meses. Se espera que los beneficios del tratamiento sean similares a un tratamiento con prednisona, esto es, el mantenimiento de la masa y fuerza muscular reduciendo la degradación muscular. Si los resultados de la Fase-I e II de pruebas son positivos, un estudio de fase-III con muchos pacientes y centros clínicos participantes seguirá, a menos que el denominación de fármaco huérfano como terapéutico para DM Duchenne permita la aprobación inmediata de un tratamiento con BBIC.

No es conocido aún de que modo el BBIC influye en el crecimiento muscular a nivel molecular. Pero los resultados experimentales con animales y gente adulta sugieren que será seguro y posiblemente eficaz en niños Duchenne. Por lo tanto, el inicio inmediato de pruebas clínicas es justificado.

y degradación. Sin embargo, las fibras musculares con Duchenne con un diámetro grande se degradan más rápido que las fibras que son pequeñas. Un tratamiento que implique la hipertrofia muscular debería ser entonces puesto a punto para producir tamaños de fibra óptimos.

Inhibición de la miostatina por anticuerpo y propéptido.

Tejvir Khurana de la *Universidad de Pennsylvania* en Filadelfia presentó los resultados de experimentos para aumentar el tejido muscular bloqueando la actividad de la proteína miostatina.

La miostatina, también llamada *factor de diferenciación de crecimiento 8*, GDF-8, es sintetizada como una proteína inactiva que consiste en 375 aminoácidos. Para hacerse biológicamente activa, los 266 primeros aminoácidos, llamados el *propéptido*, son separados, y dos cadenas de la parte restante con 109 aminoácidos se combinan juntas para formar un doble anillo. El propéptido separado otra vez se une al doble anillo, todavía inactivado. El propéptido es removido cuando el complejo se une a su molécula receptora por fuera de la membrana de la célula muscular. Esta ahora *activa miostatina* inicia una serie de reacciones químicas dentro de la célula, una cascada de señales, que finalmente interrumpe la regulación genética que conduciría por otra parte a la biosíntesis de nuevas proteínas mus-

culares. Como ocurre esto, no es completamente entendido todavía.

Estos hechos condujeron a la idea de que al inactivar la miostatina, la regeneración de los músculos de los chicos con Duchenne podría ser estimulada de modo que ellos no fueran destruidos tan rápido o hasta incrementar su tamaño.

En un primer acercamiento para bloquear la actividad de la miostatina, un anticuerpo monoclonal contra la miostatina de ratones, o JA16, preparado por la compañía *Wyeth Research*, fue usado. Este es una proteína inmune que se une muy por sí misma muy específicamente sólo a la miostatina y así inactivarla. Una solución que contiene estos anticuerpos fue inyectada una vez por semana bajo el diafragma de ratones mdx. Después de tres meses, los animales tratados eran 12 % más pesados que los animales de control sin el tratamiento, ellos tenían una mejor función muscular, y su degeneración muscular había disminuido junto con sus niveles activos de creatina kinasa.

En un segundo acercamiento, un péptido artificialmente creado fue usado, el cual además, tuvo que ser estabilizado uniéndolo al llamado fragmento Fc de una inmunoglobulina normalmente presente en el suero sanguíneo. Este péptido estabilizado fue inyectado durante tres meses en ratones mdx. Los resultados eran similares a aquellos del primer acercamiento, excepto que no sólo la fuerza absoluta de las fibras musculares era mayor como se espera después de que la fibra se había hecho más grande, sino también la fuerza específica había aumentado, la fuerza por volumen, así la fibra entera era más fuerte.

Estos resultados muestran que estudios adicionales deberían ser realizados y, como los siguientes párrafos muestran, pruebas clínicas están siendo preparadas ya por la compañía *Wyeth*. Pero debe ser entendido que esta clase de tratamiento no puede ser una cura completa de la distrofia muscular Duchenne porque la causa genética de la enfermedad no sería eliminada. Pero, comparado con otros métodos, este tendría la ventaja que no generaría problemas inmunes o de toxicidad, ni ningunos riesgos genéticos por virus. Las compañías farmacéuticas como *Wyeth* están interesadas ya en esta técnica porque el aumento de la masa muscular también sería importante para personas viejas y personas con otras enfermedades que degradan el músculo.

Estudio clínico de un anticuerpo contra la miostatina.

Anthony Celeste de la *Wyeth Research company* en Collegetown cerca de Filadelfia informó que el bloqueo con el anticuerpo de la miostatina está siendo probado ya clínicamente en una prueba de fase-I con voluntarios adultos sanos.

El anticuerpo JA16 contra la miostatina de ratón fue usado para las investigaciones preparatorias con ratones mdx como la presentada por *Tejvir Khurana*. Para la prueba humana, el anticuerpo humano específico para miostatina MYO-029 fue preparado y primero probado en ratones SCID que no tienen un sistema inmunológico intacto que interferiría con el anticuerpo humano. En estos ratones, la masa de músculo esquelético aumentó hasta un 30 % después de una aplicación de sólo 1 mg./Kg./semana de este anticuerpo humano durante 3 meses. La fuerza muscular aumentó también significativamente, y no hubo evidencia

de toxicidad. Veinte semanas después del final del tratamiento, la masa muscular regresó a su normalidad. Este resultado es importante porque si en una aplicación humana posterior algunos problemas ocurrieran, el tratamiento podría ser detenido y los pacientes volverían a la situación original. Estudios preclínicos también fueron realizados con el anticuerpo humano en otros animales, ratas, conejos y monos, con dosis muy altas de hasta 100 mg./Kg. No hubo otra vez ninguna evidencia de toxicidad u otros efectos secundarios.

Después de que estos resultados positivos fueron obtenidos, "los esfuerzos en la compañía escalaron exponencialmente". La *Wyeth* esta comprometida ahora con este proyecto y hará que un tratamiento este a disposición de los pacientes.

Los siguientes pasos planeados es encontrar una pequeña molécula inhibidora en vez del anticuerpo que es una proteína que tiene que ser inyectada. Un pequeño compuesto molecular podría ser posiblemente administrado oralmente como una píldora. El trabajo está ya en progreso para encontrar formas solubles que se unan a la estructura del receptor y del péptido que sería capaz de remover la miostatina antes de que esta se una al receptor en la membrana de célula muscular. Esto dejaría el receptor libre para unirse con otras sustancias que también son necesarias para afectar otras vías de señalización en la célula. Después de la reunión, *Wyeth* ha anunciado el inicio de una fase I/II de prueba clínica con pacientes adultos con distrofia muscular Becker, del anillo óseo (cinturas), y FSH, no solo para otra vez evaluar la seguridad en pacientes sino también medir cualquier efecto positivo en la preservación de la masa muscular. Se espera que los resultados de este estudio estén disponibles a finales del 2006. Y la Asociación de Distrofia Muscular de EUA MDA ha decidido apoyar estos estudios con una beca de 1,5 millones de dólares.

Transferencia del gen del péptido de la miostatina.

El equipo de investigación de **Luis García** en el *Instituto Génethon* en Evry cerca de París investiga la posibilidad de transferir el gen del péptido de la miostatina en los músculos de modo que ellos puedan producir continuamente al agente que realiza la inhibición de su propio crecimiento.

La estructura de ADN con la información genética para los 262 aminoácidos del péptido y los 4 aminoácidos del sitio de anclaje fue empacada en un virus adeno-asociado tipo 1, AAV1, junto con secuencias de control. Mil millones de estos vectores de transferencia génica fueron entonces inyectados en músculos de la pata de ratones normales. Después de 2 semanas, los músculos inyectados habían aumentado en un 25 %, y este aumento de su masa permaneció estable.

Una construcción similar del vector fue usada para inyecciones en las arterias de las patas de ratones normales y mdx/REX distróficos mientras el flujo de salida venoso fue bloqueado por un pico máximo de presión arterial. Seis semanas después de esta inyección parcialmente sistémica bajo presión, todos los músculos de la pata de los ratones normales habían aumentado en aproximadamente un 35 %. Como los ratones mdx/REX comienzan a perder sus músculos cuando ellos tienen aproximadamente 5 meses de

edad, las inyecciones intra-arteriales fueron comenzadas en este tiempo. Dos meses más tarde, sus músculos no habían aumentado significativamente, posiblemente porque el número de sus células satélite, las cuales son responsables de la regeneración, fue disminuido por el proceso de distrófico. Pero el tejido muscular lucía más sano que el de los animales de control sin tratar con menos necrosis y con muy poca fibrosis.

Cuando la estructura genética del propéptido tiene una mutación que causa el reemplazo del aminoácido ácido aspártico en la posición 99 por alanina, el propéptido mutado es mucho más estable que el natural. Experimentos con esta estructura mutada están siendo preparados así como pruebas con perros distróficos.

Follistatina, un inhibidor de la miostatina. En la segunda parte de su presentación, **Lorenzo Puri** relató que era posible aumentar considerablemente la actividad del gen de la *follistatina* con el fármaco *tricostatina* (TSA) que es un inhibidor de la deacetilasa que actúa expresamente en los cromosomas en el núcleo de las células musculares. Y la follistatina por su parte bloquea la actividad de la miostatina.

Soluciones de TSA aplicadas bajo el diafragma de ratones mdx durante 3 meses aumentaron su masa muscular y redujeron los niveles activos de creatina kinasa considerablemente, y tenían otros efectos benéficos. Pero la TSA tiene efectos secundarios indeseables como la caída del cabello. El fármaco antiepiléptico *ácido valproico* tiene un efecto similar a la TSA, y como este es un fármaco aprobado para el tratamiento a largo plazo de niños, este no necesitaría nuevos estudios de toxicidad. Sin embargo, antes de que las pruebas clínicas sean comenzadas, la relación compleja de todos estos varios factores implicados tiene que ser investigados.

Función de la miostatina. En su presentación, **Ketan Patel** del *Colegio Veterinario Real* en Londres habló de su trabajo para averiguar donde y de que modo la miostatina inhibe el crecimiento del tejido muscular.

Pollos fueron usados como animales de laboratorio porque es fácil seguir el desarrollo de sus músculos en tiempos diferentes en el embrión durante la incubación. Entre los *somitas*, que son los precursores más tempranos de todos los músculos esqueléticos, sólo algunas células contienen miostatina activa, así que no proliferan. Otros somitas contienen follistatina la cual inactiva la miostatina, y así asegura que estos somitas pueden dividirse para formar la siguiente estructura en el desarrollo muscular, el miotoma. Esto significa que la división celular sólo ocurre donde no hay ninguna miostatina activa.

A fin de ver el efecto local de la miostatina, muy pequeñas cuentas de cristal fueron cubiertas de miostatina y luego inyectadas en las estructuras del miotoma que proliferan en los embriones tempranos de pollo. Las cuentas mismas no interfieren con el crecimiento del embrión, pero la miostatina adicional inactiva los genes de varios, pero no de todos, factores de proteína necesarios para el desarrollo de músculo adicional. Las cuentas con miostatina paran así el crecimiento de músculo donde ellas están localizadas, y este es un efecto a largo plazo. Las cuentas también pue-

den ser sacadas, y entonces los factores de crecimiento aparecen otra vez y el crecimiento muscular se reinicia. En otros experimentos con ratones que tienen su gen de la miostatina inactivado, se encontró que la masa muscular aumentó considerablemente, pero que la fuerza del músculo no aumentó de acuerdo con el tamaño más grande de las fibras musculares, es decir su fuerza específica disminuyó. Y las células musculares de los ratones machos contenían inclusiones citoplásmicas, conjuntos tubulares de una estructura desconocida, que parecen ser la causa de que la fuerza del músculo específica disminuyera.

Efecto a largo plazo de la inhibición de la miostatina.

Kathryn Wagner de la *Universidad John Hopkins* en Baltimore investigó el efecto a largo plazo de la inhibición de la miostatina. Examinando la estructura muscular de ratones no-distróficos que tenían entre 3 meses y 2 años de edad y que tenían inactivado su gen de la miostatina por métodos genéticos, podría ser mostrado que aun en ausencia de miostatina durante períodos de hasta su tiempo de vida normal entero, todos los ratones incluyendo los más viejos tenían músculos normales con masa aumentada. Los ratones mdx cuyo gen de la miostatina también fue inactivado mantuvieron su aumentada masa y fuerza muscular en la vejez.

Para probar que tanto la regeneración muscular se deteriora en ratones viejos normales y mdx sin miostatina, los músculos fueron dañados con fármacos tóxicos. En ambos casos, la capacidad regeneradora de los músculos no fue alterada, pero la degeneración de los músculos mdx causados por la ausencia de distrofina continuó como antes. Estos resultados muestran que la ausencia prolongada de miostatina no tiene efectos negativos en ratones. Pero que tanto esto significa que la inactivación de miostatina por un largo plazo en pacientes con Duchenne podría también no producir ningún efecto adverso debe ser checado en estudios clínicos a largo plazo.

Un joven muchacho sin miostatina.

Markus Schülke del *Hospital Charité* de la Universidad Humboldt en Berlín describió al primer niño humano conocido, ahora un chico de 5 años de edad, cuyos genes de la miostatina en ambos de sus cromosomas 2 estaban inactivados por una mutación. La adenina en el 5o nucleótido del primer intron de su gen de la miostatina está sustituida por una guanina. Así, esta mutación ha cambiado una parte no codificada del gen, una región altamente conservada durante la evolución que afecta el empalme de sus tres exones. Esto causó un empalme alterno del 70 % de los pre-ARNm's de la miostatina del muchacho, conduciendo a la adición de 109 nucleótidos codificados después del primer exon con la consecuencia de que aparezca un codón de parada prematuro, que interrumpe la biosíntesis de esta pequeña proteína. Estos hechos moleculares explican las concentraciones muy bajas de miostatina en los músculos y su completa ausencia en el serum sanguíneo del chico.

A causa de la actividad reducida de la miostatina, los músculos esqueléticos del chico son el doble de grandes de un niño normal, y él es físicamente muy fuerte. Su madre, una atleta profesional, es heterocigótica, o sea ella tiene la misma mutación sólo que en uno de sus cromosomas 2. Varios parientes varones de la madre eran o son también

excepcionalmente fuertes. Sin embargo, el padre del muchacho no pudo ser investigado.

En Bélgica, el ganado "azul blanco" que tiene una masa muscular aumentada aproximadamente del 20 %. Sin embargo ellos no toleran la tensión física muy bien. Ellos tienen otra mutación, una delección (falta) de 11 nucleótidos en su gen de la miostatina. Así que la inhibición de la miostatina en chicos con Duchenne podría conducir a problemas de salud todavía desconocidos. Posiblemente, un tratamiento no debería ser comenzado demasiado temprano. Pero el chico alemán no muestra ningún efecto secundario médico a la edad de cinco años.

¿Cómo ocurre la hipertrofia de los músculos? Durante la discusión general al final de la reunión, **Terence Partridge** del *Hospital Hammersmith* en Londres de nuevo hizo surgir la cuestión sobre la manera natural en que las fibras musculares cambian, cuando ellas se ven hipertrofiadas, esto es cuando se hacen más grandes después de un aumento de los factores de crecimiento o por la inhibición de la miostatina. Y de que realmente todavía no ha sido mostrado aún con estudios, que la hipertrofia conduzca a un aumento del número de los núcleos celulares o de las células satélite. Tales estudios serían fáciles de realizar y darían información importante de la manera en que el aumento de los músculos es producido.

Se discutieron los métodos estadísticos los cuales permiten determinar el número y la capacidad de proliferar de

las células satélite después de que estas son aisladas de los músculos de los animales que fueron primero tratados con factores de crecimiento o inhibidores. Los resultados preliminares de tales estudios no mostraron un efecto directo de la miostatina en las propiedades de las células satélite adentro o afuera de los animales de laboratorio.

Las discusiones adicionales trataron las dificultades de explicar el efecto obviamente positivo sobre los síntomas distróficos de los ratones por el aumento de sus músculos. Teóricamente, la actividad muscular debería dañar las fibras aumentadas más que las normales. El estado mejorado de los músculos hipertróficos de los ratones mdx después del tratamiento es difícil de explicar.

Es posible que la activación de las células satélite y el aumento de los músculos no sean los únicos efectos de los tratamientos discutidos y que el estado de las fibras musculares es mejorado por un mecanismo todavía desconocido.

En resumen, parece que algunos de los diferentes métodos de aumentar los músculos tienen un efecto positivo en la distrofia muscular de ratones, porque ellos pueden mejorar sorprendentemente el estado de sus músculos. Algunos de estos métodos están ya siendo probados en humanos o tales estudios están siendo planeados. Sin embargo, los participantes de la conferencia estuvieron de acuerdo que deben continuarse estos estudios con mucha cautela, porque es muy poco conocido el mecanismo exacto de la acción de los tratamientos propuestos.

Entrevista con Nadia Rosenthal:

Los padres no deben perder la esperanza mientras esperan por una terapia génica para distrofia Duchenne.

Nadia Rosenthal es la cabeza del *Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL)* en su Dependencia en *Monte Rotondo* cerca de Roma. Después de la reunión de mesa redonda ella respondió preguntas (en cursiva) de Guenter Scheuerbrandt sobre las posibles intervenciones en el crecimiento muscular promovido por fármacos mientras las más permanentes terapias genéticas todavía están siendo desarrolladas y que la esperanza los padres no la deberían de perder.

Los padres con chicos con DM Duchenne necesitan la esperanza de una cura para esta terrible enfermedad. Ellos colectan dinero, a menudo en bastantes pequeñas cantidades, que ellos donan a los parent projects creyendo que eso salvara a sus niños enfermos. Cuando el gen de la distrofina fue encontrado en 1986, cada uno pensó que habría una cura al año siguiente. En las dos últimas Mesas Redondas en Mónaco, se concluyó que esto tomará todavía varios años más hasta que la omisión de exon este lista como una terapia, y que al parecer las técnicas de transferencia génica no estarán listas más rápido.

Si vemos la historia de la terapia génica, vemos que las promesas fueron hechas tan temprano como en los años 1970s, aun por científicos, sobre las perspectivas de la terapia génica, y aquí estamos 30 años más tarde, y no estamos todavía allí. Por supuesto, la terapia génica podría lograrse algún día, nuevos descubrimientos podrían ser

hechos, un nuevo vector viral podría ser encontrado y esto de pronto haría las promesas una realidad. ¡Si fuera así de simple!

Pero aun entonces, una terapia génica tendría que pasar por pruebas clínicas. Y es lo que yo les digo a los padres, ya que todos ellos quieren que su niño sea el primer conejillo de indias. El problema es que un niño no puede hacer una decisión informada de si desea participar en una prueba peligrosa. Por supuesto es una tragedia personal tener a un niño con una enfermedad terminal que puede matarlo antes de que una cura sea encontrada. Pero más daño podría hacerse precipitándose en estas pruebas. Si un tratamiento fuera tan fantástico que no tuviera ningunos efectos secundarios y curara al niño, lo habríamos encontrado ya. Los sueños de los investigadores es que ellos tropezaran de repente con algo que trabajara perfectamente, pero no es algo realista.

Así que obviamente, los investigadores han tenido muchas hipótesis que comprobar, y por lo que resulta que tarda mucho tiempo en conseguirse toda la información básica. Yo trabajo ahora en un acercamiento terapéutico prometedor, pero la ignorancia en este campo es simplemente profunda. He hablado muchas veces a diferentes audiencias y he tratado de explicar muy racionalmente el potencial aparentemente milagroso del IGF-1 para regenerar el tejido, pero sólo si sabemos mucho más sobre cual es la proteína IGF-1 correcta para usar.

De todos modos pienso que hay mucho espacio para la esperanza. Comencé a trabajar en distrofia muscular en 1984, y entonces existían los mismos problemas que ahora pero sabíamos mucho menos. Nadie sabía sobre la miostatina, nadie sabía aun por qué la enfermedad era causada. Desde aquel tiempo, se ha hecho un progreso extraordinario, y aún así, para los padres, nada de eso significa algo porque no hay ninguna cura aún. Así que tenemos el problema de como decir a los padres que a pesar del progreso no tenemos todavía la cura. Pienso en el hecho que los terapéuticos potenciales están ya siendo probados para conocer la seguridad en la fase-I de pruebas clínicas y es enormemente emocionante.

Y también el número creciente de laboratorios que trabajan en este campo.

Sí, y el número de acercamientos. Y pienso que la sugerencia para combinar acercamientos es muy importante. Y lo que estos seminarios en Mónaco hacen, debe animar la discusión entre nosotros los investigadores. De este modo, por ejemplo, ya he ofrecido mi ayuda y enviar reactivos a mi colega Kathryn Wagner en Baltimore quien trabaja en la combinación de IGF-1 con inhibición de la miostatina, porque necesitamos saber que tanto aquellas dos cosas podrían ser puestas juntas. Estoy también muy interesada en la inhibición de la proteasa, porque sabemos actualmente que el IGF-1 hace eso de alguna forma. De este modo, la pregunta es cuantas formas diferentes de atacar se necesitan, y la respuesta es: tantas como sea posible porque la célula es una pequeña máquina extremadamente compleja. Y no sabemos qué acercamiento llevará a una cura. Aunque la lesión en la distrofia muscular Duchenne pudiera ser completamente simple, sólo una proteína falta, no puede ser reparada como un coche estropeado que puede ser arreglado cambiando un pedazo roto. Debido a que una célula tiene muchos modos diferentes de trabajar alrededor de los problemas. Y así pueden haber maneras que nosotros podamos inducir a la célula a compensar su fragilidad y mantener al menos al músculo durante el tiempo que necesitamos hasta que podamos sustituir realmente el gen, que es el objetivo final, o la reparación de el, de modo que haga otra vez distrofina funcional.

La otra cosa a decir a los padres es, que la investigación que ellos apoyan es cada vez más realzada por el reconocimiento de que hay muchas otras clases de debilidad muscular que ocurren por envejecimiento, cáncer, insuficiencia cardiaca crónica, enfermedades infecciosas, y hasta SIDA, las cuales también tienen que ser tenidas en cuenta. Así que hay una enorme necesidad de intervención, porque muchos de los mismos procesos de degradación que vemos en estas enfermedades son potencialmente tratables por las mismas vías terapéuticas que intentamos desarrollar para distrofia muscular.

Y sería entonces también interesante para las compañías farmacéuticas.

Así es, he hablado a varias compañías farmacéuticas y he logrado que ellos vean la distrofia muscular como un muy importante y extremadamente atractivo primer paso para tratar estas otras enfermedades con deterioro de los múscu-

los, porque el nivel de conocimiento es mucho más alto para la distrofia muscular que para, digamos, la usual atrofia de muscular en la gente envejecida. Uno sabe muy poco sobre esto, y esto mayormente ha venido de la investigación que hemos hecho sobre distrofia muscular. De este modo, los padres de chicos con DM Duchenne no son los únicos que buscan una cura para tal enfermedad. Más y más compañías farmacéuticas se dan cuenta del músculo como un objetivo clave para la terapéutica. Y lo que esto significa no es necesariamente que conseguiremos la cura para DM Duchenne más rápido, pero que cuando algo parece bien, entonces habrá dinero para pruebas y para el desarrollo de una terapia.

Y también para conseguirlo los pacientes en todas partes, porque el mercadeo será también importante.

Sí, y la investigación puede sólo venir con el principio de prueba. Y el tiempo entonces para desarrollar un fármaco y traerlo al mercado es un número bastante previsible de años. Y este no siempre pasa suficientemente rápido para el individuo. Todo lo que podemos decir hoy es, que las pruebas clínicas que hemos visto propuestas hoy, algunas de las cuales confían en sustancias que están ya aprobadas para su uso, son la mejor vía rápida posible para aminorar la enfermedad, tal vez no curar, pero al menos prevenir los problemas severos.

Lo que quise decir con mi pregunta al final de la reunión era, de que con los métodos que hemos discutido hoy, uno podría ganar tiempo hasta que algo mejor y más permanente venga.

Sí, absolutamente. Y obviamente que es una ventaja clave usar productos farmacéuticos que están ya presentes en los libros farmacológicos para algo más. Por eso comparo el SIDA y la distrofia muscular. Si la gente que sufre de ambos usa algunos anti-inflamatorios inhibidores de proteína, podríamos ser capaces de descubrir nuevos hechos prometedores. Esto es por lo que los bancos de datos clínicos son tan importantes, algunas veces proveyéndonos de información inesperada.

¿Así que, hay esperanza de que algo vaya a pasar?

¡Hay siempre esperanza! Sobre todo porque ahora hay un movimiento real en una manera que no había visto antes. Ahora pienso que es fácil imaginar como ciertos procesos en la célula pueden ser modulados por pequeñas moléculas ordinarias existentes. Esto podría conducir a una verdadera brecha, como pasó con el SIDA cuando los inhibidores de proteasa fueron desarrollados. De este modo, las enfermedades tan devastadoras como el SIDA, cuando esta primero se volvió una epidemia, parecía aparentemente incurable y rivalizo con la distrofia muscular. Y ahora la gente la maneja. De modo que es lo que esperamos, manejando la enfermedad, y posteriormente curarla.

Cuando los investigadores como usted hablan directamente a los padres en entrevistas como esta sobre las consecuencias de su trabajo, sus palabras son especialmente importantes para ellos y les dan verdadera esperanza. Le

agradezco a usted y a todos sus colegas por sus esfuerzos y dedicación y le deseo el éxito que necesitamos. Y pienso que se me permite decir esto también de parte de las fami-

lias con chicos con DM Duchenne, cuyos representantes estaban presentes en esta reunión.

Algunos hechos científicos.

Para entender mejor los diferentes acercamientos hacia una intervención farmacológica en el proceso distrófico en niños con Duchenne, algunos hechos básicos del desarrollo muscular y su enfermedad más severa, la distrofia muscular Duchenne, son resumidos aquí de un modo muy corto.

Desarrollo muscular. En el embrión prematuro, las primeras células que se convertirán en tejido muscular son las **somitas** las cuales proliferan para formar el **miotoma**. Las células del miotoma dan lugar a los **mioblastos** y las **células satélite** que son células de reserva para regenerar fibras musculares dañadas. Los mioblastos se fusionan el uno con el otro para formar **miotubos**, cuyos varios núcleos celulares están centralmente localizados, y que entonces se desarrollan en **fibras musculares** maduras cuyos núcleos se localizados en la membrana de la célula. Las células satélite, que son un tipo de células madre locales, se unen en el exterior de la membrana de la célula muscular. Cuando las fibras son dañadas por una lesión o por una enfermedad como la distrofia Duchenne, las células satélite reparan y regeneran las células musculares de una manera similar a la síntesis de nuevas fibras por los mioblastos. Muchas proteínas diferentes influyen en el desarrollo y la estructura de los músculos. Algunas de ellas son mencionadas en este informe como el IGF-1, la miostatina, y follistatina.

Estructura muscular y síntesis de proteína. La fuerza generada por la estructura actina-miosina es transferida a la fibra entera por un complejo de proteínas localizado en la membrana de la célula, con la proteína **distrofina** como uno de sus componentes más importantes. El gen que lleva la información para esta proteína es el **gen de la distrofina**. Este se localiza en el cromosoma X. Su estructura de ácido desoxiribonucleico, ADN, contiene una secuencia de 2 220 223 **nucleótidos**, o "letras genéticas", así, este gen es el gen humano más largo. Este tiene 79 regiones activas, los **exones**, con un total de sólo 11 058 nucleótidos, los cuales especifican la secuencia de 3 685 **aminoácidos**, los componentes básicos, de la proteína distrofina. El resto mayor del gen, su 99,5%, esta formado por los **intrones**, que no contienen información para la secuencia de aminoácidos de la proteína. La secuencia de nucleótidos del gen es copiada en el núcleo de la célula al ácido ribonucleico premensajero, **ARNpre-m**. Los intrones son eliminados entonces y los exones son empalmados juntos al ARN mensajero,

ARNm. Este mensajero se mueve del núcleo de la célula a los **ribosomas** en el citoplasma donde la proteína es ensamblada según la información genética conservada en su estructura.

Duchenne distrofia muscular. Esta enfermedad hereditaria es causada por una **mutación** en el gen de la distrofina, un cambio que altera la información genética de modo que la distrofina no pueda ser producida más en las células musculares. Sin distrofina, las fibras musculares se degeneran, principalmente porque sus membranas se hacen permeables. Entonces grandes cantidades de iones de calcio entran en las células y activan enzimas como la proteasa **calpaina** que destruyen todas las otras proteínas de los músculos.

Para contrarrestar la degeneración, las células satélite son activadas para iniciar y mantener procedimientos de reparación. Los dos procesos, **degeneración** y **regeneración**, están en equilibrio durante algún tiempo hasta que el número de células de satélite se haga tan pequeño que la regeneración reduce la velocidad y finalmente se para. Este conduce al aspecto y el empeoramiento de los síntomas clínicos de la enfermedad.

Acercamientos hacia una terapia con técnicas génicas. La reparación de la mutación por **omisión de exon** y el reemplazo del gen por la **transferencia** de su estructura activa normal entera, su **ADNc**, o de sus versiones más cortas, son técnicas de investigación que han progresado considerablemente. Sus resultados alentadores, principalmente obtenidos con **ratones mdx** distróficos, están siendo ahora intentados en estudios clínicos con pacientes con Duchenne. En este momento, estas técnicas no parecen proveer una cura completa y a largo plazo de la enfermedad, pero sólo serán capaces de hacer más lenta la degeneración muscular, es decir ellas podrían cambiar una más rápida distrofia Duchenne en una mucho más lenta **distrofia muscular Becker**. Sin embargo, todavía se necesitaran algunos años hasta que una terapia, basada en estas técnicas, esté lista para los pacientes con Duchenne.

Una nota: A los científicos les gusta hablar de las cosas en que trabajan como si ellos tuvieran sólo una de cada una: *una* proteína, *la* distrofina, *el* gen, *la* fibra de muscular. En realidad, ellos producen y trabajan con millones o miles de millones de ellas. Este modo de usar el singular en vez del plural es seguido también en este informe.

Comprando tiempo con un fármaco "normal".

Un fármaco "normal" que es ya usado contra otras enfermedades, y es capaz de hacer más lenta la degeneración muscular o acelerar la regeneración muscular, necesitaría mucho menos tiempo para ser aprobado como una terapia para DM Duchenne, que una técnica completamente nueva

como la terapia génica. Esto sería de inmenso beneficio para el medio millón de familias en todo el mundo con niños con Duchenne. Algunos fármacos potenciales los cuales fueron comentados en esta reunión como: el IGF-1, BBIC, leupeptina, follistatina y otros inhibidores de la

miostatina, serían tales fármacos "normales". Aunque no sea todavía conocido como estos funcionan a nivel molecular, ellos son tan prometedores que están siendo clínicamente probados de todos modos. Y estos tendrían probablemente muchos menos efectos secundarios que los corticoesteroides como la prednisona y deflazacort que son todavía los únicos fármacos aprobados que tienen un efecto probado de retardación y cuyo mecanismo preciso de acción tampoco es conocido.

Como ha sido sugerido en la reunión, algunos fármacos bajo consideración podrían ser tomados simultáneamente, por ejemplo el IGF-1 para estimular la regeneración e

inhibidores de la calpaina para parar la degradación. Estos podrían ser usados aún más tarde en combinación con una técnica genética como la omisión de exon. Y ellos deberían ser aplicados tan pronto como después del nacimiento como sea posible, cuando la mayor parte de los músculos todavía tienen una estructura normal. Esto "compraría tiempo" para los niños mientras ellos esperan las posiblemente más eficaces terapias genéticas que tratan de corregir la mutación misma del gen. El desarrollo adicional de los fármacos "normales" potenciales hablados aquí podría bien estar en un camino de atajo, un modo de tratar a muchos de los niños enfermos a tiempo.

Científicos y especialistas médicos:

Kate Bushby (MD, PhD), University of Newcastle, RU
Gill Butler-Browne (PhD), Hôpital Pitié-Salpêtrière-CNRS, Paris, Francia
Anthony Celeste, Wyeth Research, EUA
Olivier Danos (PhD), Généthon-CNRS, Evry, Francia
Kenneth Fischbeck (MD), National Institute of Health, EUA
Yves Fromes (MD, PhD), Institut de Myologie, Paris, Francia
Jean-Marie Gillis (PhD), University of Bruselas, Belgica
Luis Garcia (PhD), Généthon – CNRS, Evry, Francia
Tejvir Khurana (MD, PhD), University of Pennsylvania, Filadelfia, EUA
Terri Michele (MD, PhD), CepTor Corp., EUA
Terry Partridge (PhD), Hammersmith Hospital, Londres, RU
Ketan Patel (PhD), Royal Veterinary College, Londres, RU
Lorenzo Puri (MD, PhD), Dulbecco Telethon Institute, Italia, Burnham Institute, EUA
Nadia Rosenthal (PhD), European Molecular Biology Laboratory, Roma, Italia
Markus Schuelke (MD), University Medical Center Charité, Berlin, Alemania
Alfred Stracher (PhD), State University of Nueva York, EUA
Lee Sweeney (PhD), University of Pennsylvania, Filadelfia, EUA
Kathryn Wagner (MD, PhD), Johns Hopkins Hospital, Baltimore, EUA

Asociaciones de DMD:

Filippo Buccella, President Duchenne Parent Project Italia
Nick Catlin, National Coordinator Duchenne Parent Project RU
Christine Dattola, President Duchenne Parent Project Francia
Pat Furlong, Executive Director, Parent Project Muscular Dystrophy, EUA
Sally Hofmeister, Aktion Benny and Co, Alemania
Peter Mac Partland, Chairman United Parent Project Muscular Dystrophy, RU
Luc Pettavino, President Association Monégasque contre les Myopathies, Monte Carlo
Helen Posselt, Parent Project Australia
Jacques Salama, Vice-president AFM, Francia
Günter Scheuerbrandt (PhD), DMD research reporter for UPPMD, Alemania
Jenny Versnel, Head of research Muscular Dystrophy Campaign, RU
Elizabeth Vroom, President Duchenne Parent Project Holanda

Este reporte fue escrito por:

Dr. Guenter Scheuerbrandt, Im Talgrund 2, D-79874 Breitnau Alemania.
gscheuerbrandt@t-online.de

Todos los reportes de las conferencias de Mesa Redonda están disponibles en www.duchennefr.org, www.uppmd.org, y www.duchenne-research.com

Traducción al español por:

Ricardo Rojas Caballero, Playa Rosarito 319 Fracc. Playa Sur CP 82040 Mazatlán, México

E-mail: distrofiamuscular@yahoo.com.mx

Internet: <http://www.distrofia-mexico.org>