



**Parent Project UK Muscular Dystrophy**  
Epicentre, 41 West Street, London E11 4LJ, RU  
Tel.: \*44-20 8556 9955,  
e-mail: [nick@ppuk.org](mailto:nick@ppuk.org), internet: [www.ppek.org](http://www.ppek.org)

## La 4ta Conferencia Internacional en Londres, 21 y 22 de Octubre del 2006

### 20 años después de encontrar al Gen Duchenne: Una Enfermedad Terrible está siendo Conquistada.

**Standing on the Shoulders of Giants – Parándose en los Hombros de los Gigantes** - este era el título de la 4<sup>ta</sup> conferencia internacional del Parent Project Muscular Dystrophy del Reino Unido (PPUK) que tuvo lugar 21 y 22 de Octubre del 2006 en Londres. Treinta científicos y médicos de enfermedades musculares presentaron y hablaron de sus más recientes resultados de investigación, pruebas clínicas en curso y planeadas, métodos de manejo médico actualizado, y registro en base de datos. A mí, *Günter Scheuerbrandt*, un bioquímico de Alemania, se me pidió por *Nick Catlin*, presidente del PPUK, escribir este informe para usted, los niños y sus familias, que desean estar al tanto de cada paso exitoso en este camino a un tratamiento eficaz. Como yo no soy un experto médico, el informe contiene 23 resúmenes de solamente las presentaciones científicas, 16 de los científicos presentes en la reunión, 2 de científicos que no pudieron asistir, y 5 de otros investigadores que no estaban en la reunión pero cuyo trabajo es igualmente importante para el desarrollo de las terapias para Duchenne.

Todos los científicos cuya investigación es resumida, han tenido la oportunidad ver el borrador del resumen de sus presentaciones y corregirlo si era necesario, y todos han lo hecho, por lo tanto, debe haber pocos errores. Otra consecuencia es que incluso son reportados resultados que fueron obtenidos entre la conferencia y escribir este informe en enero del 2007.

Después de la reunión anual del Parent Project Muscular Dystrophy de EUA en Cincinnati/Ohio del 13 al 16 de julio del 2006, he escrito un informe similar que puede ser visto en Internet en [www.duchenne-research.com](http://www.duchenne-research.com). Los dos informes vienen juntos y ambos no son publicaciones científicas, son escritos para usted, los niños y sus padres, en una lengua que usted debe ser capaz comprender.

En general, estoy usando los nombres de los científicos sin sus títulos, la mayoría son profesores y todos tienen un Postgrado o un título en Medicina o ambos. Y casi todos son jefes de laboratorios, eso quiere decir que tienen colegas y postgraduados y estudiantes que trabajaban como un equipo en los proyectos reportados aquí, pero es imposible mencionar todos sus nombres.

Alrededor de 140 años después de la descripción de *Guillaume Duchenne de Boulogne* y 20 años después de que *Louis Kunkel* aisló su gen, el gen de la distrofina, esta enfermedad terrible que es la distrofia muscular Duchenne, está soltando su grillete lentamente, esto es obvio después de las presentaciones de tantos nuevos resultados de investigación en estas dos reuniones. La distrofia muscular Duchenne está siendo conquistada paso a paso por tantas personas dedicadas que trabajan para nosotros en muchos países. Los dos informes están mostrando por qué es así.

### Introducción de Nick Catlin: Parándose en los Hombros de los Gigantes

En 1675, Isaac Newton escribió a Robert Hooke que para hacer grandes avances en la ciencia debemos *pararnos en los hombros de los Gigantes*. Por supuesto estaba siendo muy humilde y quizás haciendo hincapié a Hooke que debía tomar mas tiempo a estudiar a personas como Copernico, Kepler y Galileo que frecuentar los cafés de Londres. Durante esta conferencia somos muy privilegiados de tener algunos de los científicos exponentes que han hecho descubrimientos esenciales que han abierto las posibilidades para las nuevas terapias génicas para distrofia muscular Duchenne. Por más de 100 años desde la primera descripción de la enfermedad por Duchenne, teníamos pocos conocimientos de las causas de la DMD. En 1986, éste es el 20 aniversario, la estructura de gen de la distrofina fue descubierta por *Luis Kunkel*, *Anthony Mónaco*, *Kay Davies*, *Eric Hoffman* y otros. Sin su trabajo tendríamos poca esperanza de encontrar hoy una cura para Duchenne.

Hubo una gran oleada de optimismo que siguió inicialmente al descubrimiento de la estructura de gen. Pero en 20 años hemos perdido otra generación de chicos debido a

esta terrible enfermedad deteriorante del músculo. Un general pesimismo profundo empezó en la época en que mi hijo Saul fue diagnosticado en el 2000. Sociedades benéficas y científicos se atrevieron a no hablar de curas o tratamientos a los padres e incluso el uso de corticoides todavía no era común. Muchos científicos habían dejado el campo de investigación de Duchenne cuando la financiación se secó y las enfermedades neuromusculares parecía se olvidaron en la pelea mundial contra el cáncer, el SIDA y otras enfermedades que afectan grupos más grandes de la población del mundo. Sin embargo los grupos dedicados de investigadores, científicos y médicos y padres han peleado en tratar de superar una enfermedad devastadora que resulta en la parálisis total y la muerte temprana. También sabemos que muchos niños jóvenes están también afectados por problemas relacionados de aprendizaje y conducta.

Para mí y el PPUK el punto decisivo más importante vino cuando obtuvimos 1.6 millones de Libras de financiación del Ministerio de Salud en el 2003 para el consorcio de MDEX del R.U. de omisión de exón. Esto era un

momento crucial en relación con nuestro gobierno por fin haciéndolo consciente de las necesidades de familias con Duchenne y suministrando importante financiación para un proyecto de investigación de terapia génica muy importante. El consorcio MDEX de médicos y científicos ha abierto nuevas vías en investigación colaborativa y tenemos grandes esperanzas para la primera terapia génica para DMD. Desde entonces otras pruebas clínicas han proliferado y ahora tenemos compañías de biotecnología como VASTox en el R.U., Prosenza en Holanda, PTC y AVI del USA, y Santhera en Suiza que no solamente añaden proyectos para Duchenne a sus portafolios si no viendo como conducen los principales desarrollos de proyecto.

Esta tendencia de nuevos proyectos de investigación y pruebas clínicas adicionales al parecer continuara en el 2007. El MYOAMP ha sido fundado de una gran financiación europea para acelerar los avances prometedores en la terapia de células madre de músculo. Para tratar enfermedades neuromusculares ha asegurado 10 millones de euros

## Veinte Aniversario: Descubriendo el gen de la distrofina y su proteína.

En 1980, *Louis Kunkel* empezó el trabajo como un compañero postdoctorado en el laboratorio de *Samuel A. Latt* en el Hospital Infantil de la Universidad de Harvard en Boston con la intención de encontrar finalmente la causa de la distrofia muscular Duchenne, 118 años después que el Dr. *Duchenne* en París describió correctamente esta enfermedad hereditaria más frecuente de la infancia. Él pidió a la Asociación de Distrofia Muscular de EUA, MDA, financiar este proyecto, pero ellos no creyeron que él realmente pudiera encontrar el gen defectuoso de la DM Duchenne, entonces él les dijo como planeaba hacerlo: (1) Mapear el gene, es decir encontrando donde exactamente está en el cromosoma X; (2) comprobar que tanto y como estaba mutado, o dañado, en pacientes con Duchenne; (3) identificación de las secuencias codificadas, aquellas varias cadenas separadas de letras genéticas, los exones, que contienen la información para hacer una proteína; (4) juntar estos exones, es decir, haciendo el llamado ADNc que consiste en estas partes activas del gen; (5) predicción de la secuencia de aminoácidos de la proteína con la ayuda del código genético; y (6) finalmente aislamiento de la proteína. Eso convenció a la MDA, y Louis consiguió el dinero.

En esta reunión, *Louis Kunkel* describió estos pasos, que lo llevó a su objetivo. En ese momento, hace un cuarto de siglo, era mucho más difícil y consumía más tiempo que hoy aislar un gen y luego pronosticar y encontrar su proteína. Aquí están, muy abreviados, los pasos tomados para descubrir el gen:

Era sabido que el gen Duchenne debía estar en el cromosoma -X, porque - con excepciones muy infrecuentes - solamente los varones desarrollan la enfermedad y sus madres son a menudo las portadoras genéticas. *Kay Davies* y *Bob Williamson* separaron el cromosoma X entero de los otros usando nuevas técnica. Marcadores fueron encontrados, pequeñas secuencias o etiquetas genéticas, que permitían determinar con precisión la posición del gen en el cromosoma en relación con los muchos otros genes. Ya en esta etapa se descubrió, que había solo un gen para la distrofia Duchenne y Becker. Y con *Gertjan van Ommen*, los métodos para diagnosis tempranas y prenatales fueron des-

de presupuesto para poner juntos nuevas redes de científicos y médicos para promover una mejor practica clínica y acelerar las pruebas clínicas. El PPUK a través de los esfuerzos estupendos de muchas familias con Duchenne del R.U. ha financiado ahora seis proyectos clave con cerca de 300,000 libras en sociedad con nuestros grupos internacionales de Parent Project en Francia y Mónaco.

Pero este no es momento de recostarse y esperar. Nuestras familias deben comprender la necesidad urgente de redoblar nuestras campañas y esfuerzos de recaudación de fondos si vamos a salvar esta generación de niños con esta enfermedad devastadora. Tenemos que dar nuestra inspiración y esperanza a esos científicos que han preparado el terreno para el progreso que está siendo hecho hoy. También tenemos que pararnos en los hombros de gigantes como Pat Furlong en EUA, que se ha negado a dejar la pelea para curar la DMD a pesar de perder a sus propios dos hijos. Fue Christopher Furlong quien le dijo antes de morir "Si tu no luchas por una cura mamá, nadie más lo hará"

arrollados, lo que hizo entonces aun el asesoramiento genético mucho más preciso.

Entonces algunos pacientes inusuales ayudaron acercarse al gen Duchenne aun más lejos. Había una mujer que tenía síntomas de Duchenne. *Ronald Worton* descubrió que una pequeña pieza del brazo corto de su cromosoma X se había unido a un cromosoma 21 acortado, y le faltaba un trozo al cromosoma 21 que estaba ahora ubicado en donde el cromosoma X había perdido esa parte de su estructura. Por lo tanto, una translocación, un cambio del material del cromosoma había ocurrido en todas sus células. Los científicos podían ver estos cromosomas cambiados bajo el microscopio, por lo tanto, podían localizar el punto de ruptura. Y porque el paciente de sexo femenino tenía síntomas de Duchenne, este punto de ruptura debía haber estado dentro del gen Duchenne y por lo tanto afectandolo y desactivandolo.

Entonces apareció un niño que tenía distrofia Duchenne y también otras tres enfermedades con el mismo modo de herencia. Así que con *Uta Francke*, pudo ser mostrado que todos los tres genes estaban perdidos, había una supresión muy grande en el cromosoma X que podía ser visto. Otros pacientes aparecieron con supresiones más pequeñas también cerca de donde el gen Duchenne se suponía debía estar. Entonces muchas piezas de material del cromosoma normal que representaba las regiones eliminadas estaban aisladas, y entre ellas una, llamada PERT87, que actualmente detecta supresiones en 5 % de los niños con Duchenne. Muchos más investigadores empezaron a trabajar con esta corta secuencia cromosómica que a través de su muy específico emparejamiento de bases de ADN uniéndose por si misma a la secuencia complementaria dentro del gen Duchenne y en ningún otro lugar. Pero esto pasaba solo si la secuencia objetivo estaba ahí; si no estuviera ahí, suprimida o delecionada, la PERT87 no podía ser encontrada y por lo tanto, los científicos podían distinguir a pacientes con y sin una supresión en ese lugar.

*Louis Kunkel* con su equipo en crecimiento colecto todos los datos de sus colegas y finalmente pudo analizar los detalles genéticos de los 1,346 pacientes con Duchenne y Becker, todavía el más grande estudio de esta clase.

Debido a que el 8.7 % de los pacientes tenían una supresión en el sitio PERT87, el gen Duchenne tenía que estar ahí. Debido a que este gen es muy importante no sólo para los humanos sino también para todos otros animales con músculos, experimentos similares con la PERT87 fueron hechos en músculos de ratones, pollos, y monos, y efectivamente, este gen fue conservado durante la evolución. Finalmente, clones o copias fueron hechas de la zona alrededor del sitio PERT87 hasta que todas las secuencias de codificación, los 79 exones del gen, fueron identificadas.

Así que, seis años después que el Dr. Kunkel empezó su trabajo, en 1986, él y sus colegas lo habían hecho realmente, ellos tenían el gen con, como es ahora conocido, exactamente 2,220,223 nucleótidos o letras genéticas. Es con mucho el más grande de los aproximadamente 22,000 genes humanos, representando el 0.1 % del genoma entero, y todavía no es conocido por qué es necesario que tal gen sea tan grande.

De la secuencia del ADNc y con ayuda del código genético, *Michel Koenig* y otros en el laboratorio de Kunkel pudieron pronosticar la estructura de la proteína cuya producción es controlada por este gen. Tenía que ser una cadena de proteína con forma de varilla de 3,685 aminoácidos. ¿Pero dónde estaba ubicada? Junto con *Eric Hoffman* y *Kevin Campbell*, dos grandes secuencias de codificación de varios exones del ADNc fueron aisladas y luego trasladadas a bacterias tipo coli que entonces produjeron, expresaron, grandes cantidades de dos proteínas que realmente eran pequeñas extensiones de la proteína del gen Duchenne. Estas proteínas acortadas fueron inyectadas en conejos, las cuales su cuerpo trató de la misma manera que vacunas e hizo anticuerpos contra ellas. Después de unirles marcadores fluorescentes a estos anticuerpos, entonces los equipos de investigación de *Ronald Worton* en Canadá e *Hideo Sugita* en Japón, y también el grupo de Kunkel, pudieron mostrar que la proteína estaba ubicada en la parte interior de las membranas de la fibra muscular. Reveló su presencia allí produciendo luz azulada fluorescente alrededor del borde de las fibras musculares verticalmente cortadas bajo el microscopio, una técnica que todavía es usada para demostrar la presencia de esta proteína Duchenne o su ausencia en el tejido muscular.

Así que, un año después que el gen fue encontrado, la proteína que producía era también conocida, que los investigadores nombraron *distrofina*. Ahora el gen no era más el

gen Duchenne desconocido sino el *gen de la distrofina*.

Estos descubrimientos condujeron al desarrollo de los métodos diagnósticos moleculares. *Jeffrey Chamberlain* y su grupo usaron la nueva reacción en cadena de polimerasa, PCR, para notar las supresiones o deleciones en el gen de la distrofina y descubrieron que aproximadamente 65 % de los pacientes de Duchenne tenían tales deleciones. *Kevin Flanigan* y otra vez el grupo de Kunkel empezó a trabajar en los métodos de secuenciación de alta velocidad para detectar mutaciones puntuales y otras mutaciones más raras en el gen.

Entonces *Eric Hoffman* se dio cuenta de que mientras que los pacientes de Duchenne no tienen o tienen muy poca distrofina en sus músculos, los pacientes de Becker tienen distrofinas alteradas, y mientras *Anthony Monaco* trataba de explicar este descubrimiento, le vino la hipótesis del marco de lectura en 1988, que con algunas excepciones, ahora es la base probada para la tecnología de *omisión de exón*. De hecho, este método que ahora es muy prometedor para restaurar el marco de lectura, fue discutido y propuesto como un enfoque terapéutico posible entre los investigadores ya en ese momento, pero nadie sabía en ese entonces cómo eliminar exones del ARN mensajero.

Otra consecuencia importante del trabajo de Louis Kunkel y sus colegas fue la detección de los genes para las varias distrofias musculares Del Anillo Óseo, LGMD o Cinturas, porque cuando jalaban la distrofina afuera de los músculos con anticuerpos, un algo grande número de otras proteínas fueron sacadas también. Como *Kevin Campbell* en Iowa City y *Eijiro Ozawa* en Tokio mostraron, ellas pertenecían a un complejo de proteínas asociado con la distrofina al cual anclaba a la distrofina al exterior de la membrana celular del músculo. Es ahora conocido que las mutaciones en los genes de estas proteínas causan las formas diferentes de LGMD.

Ahora, 26 años después de trabajar para encontrar el gen, *Louis Kunkel* todavía está trabajando en distrofia muscular en el mismo hospital infantil en Boston, concentrándose en la técnica de transferencia celular con mioblastos y otras células madre de músculo que se muestran prometedoras para volverse métodos terapéuticos en adición a las otras técnicas. Terminó su presentación con la declaración: **"Estamos en una etapa ahora donde ya no es desesperanzador para un niño ahora nacido y diagnosticado con Duchenne"**.

## ¿Por qué necesitamos pruebas clínicas?

En su primera presentación, *Kate Bushby* de la Universidad de Newcastle en Tyne explicó que las pruebas clínicas eran mucho muy necesarias para el desarrollo de un fármaco eficaz y que estas pruebas pueden tomar mucho tiempo. Pero los chicos con Duchenne no tienen muchos años para esperar hasta que tales pruebas sean realizadas y finalmente un fármaco sea desarrollado. Así que ellos y sus padres deben comprender que los científicos que trabajan en una terapia eficaz entienden su situación y están trabajando con los reguladores para asegurar que los tratamientos eficaces puedan llegar a pruebas tan rápidamente como sea posible. En interés de la familia y sus niños afectados, los científicos, cuando ellos tienen una idea, una hipótesis, de cómo una terapia podría funcionar, tienen que trabajar paso a paso, incluso antes de que una prueba clínica pueda

empezar, con el fin de tener certeza que cada paso de investigación de respuestas validas en las que más investigación pueda basarse, primero con pequeños animales de laboratorio, el ratón mdx por ejemplo, luego con animales más grandes, el perro distrófico o simios, hasta que finalmente la técnica desarrollada a través de estos pasos pueda ser probada en paciente vivos, los chicos con Duchenne. Cualquiera errores, a veces causados por atajos peligrosos, no pueden ser tolerados porque retrasarían el progreso de la investigación por muchos años.

La distrofia muscular Duchenne es un trastorno complicado y los tratamientos eficaces a largo plazo probablemente tendrán que actuar sobre la maquinaria genética que hace distrofina en los músculos sanos pero no en los Duchenne. Tal fármaco genético será probablemente un total-

mente nuevo tipo de fármaco, capaz de trabajar por un muy largo tiempo, para tratar los muchos kilos de músculos de un chico, incluso los interiores como aquellos de los pulmones y el corazón. Por lo tanto, las demandas para la seguridad y la eficacia de tal fármaco para Duchenne son muy severas.

Para comprender qué son las pruebas clínicas, Kate Bushby mencionó cuatro reglas:

*Regla 1:* Las pruebas tratan de probar una hipótesis, que una idea tiene sentido. Están ahí para contestar una pregunta para la que una respuesta es necesitada - por ejemplo "¿funciona este fármaco para curar la DMD?"- y no necesariamente dan la respuesta esperada. Tal hipótesis debe estar basada en buenos datos preliminares confiables.

*Regla 2:* Ser un participante en una prueba no debe ser un sustituto para recibir el mejor cuidado disponible. Uno no debe dejar todo lo que uno sabe, después de todo, una prueba podría no funcionar.

*Regla 3:* El diseño de una prueba es determinado por la naturaleza de la hipótesis a responder. Podría ser una prueba piloto, abierta, método ciego, o doble-cego controlado con placebo. El número de pacientes participantes depende de qué grado de la confiabilidad de datos sea necesitado para responder a la pregunta, más participantes hacen los resultados más precisos y más confiables. Generalmente, las pruebas tienen que pasar a través de tres fases, y es importante notar que en las fases I y II los participantes en la prueba no pueden en realidad experimentar mejora ya que estas clases de pruebas son hechas para responder solo preguntas sobre seguridad y de limitada eficacia: (1) fase I para probar la toxicidad, (2) fase II para probar la eficacia, la dosificación y la seguridad, y (3) fase III para confirmar un efecto positivo relevante clínicamente y determinar la dosis óptima. Las pruebas con niños que tienen una enfermedad progresiva como la DM Duchenne son un reto, tienen que ser diseñadas muy cuidadosamente porque los niños pequeños con DMD crecen y se ponen mejor incluso sin un fármaco.

*Regla 4:* La supervisión y regulación impuesta por autoridades diferentes están ahí para proteger a los pacientes de un daño y también a sus médicos de las consecuencias legales de un tratamiento posiblemente peligroso. Las consideraciones éticas son más que solo las cuestiones del consentimiento de los padres y los pacientes mismos, pero también tienen que asegurar que una prueba es adecuada para responder la pregunta que está siendo hecha. Las regulaciones también deben asegurar la consistencia y exactitud de los datos para las aprobaciones reguladoras siguientes y final. El papeleo extensivo, las largas demoras, y el

gasto algo grande de los ensayos clínicos asegura de que todo se haga correctamente.

Las pruebas clínicas para encontrar una terapia para Duchenne presentan varios problemas especiales: (1) Esta enfermedad es rara, por lo tanto la industria farmacéutica no siempre esta interesada, pero su participación es necesaria para el desarrollo de un fármaco. También necesitan un motivo de ganancia para atraer capital suficiente, así como la regulación de enfermedad-huérfana para deducción de impuestos es importante. (2) Debido a que la distrofia Duchenne es algo rara, los pacientes con mutaciones específicas en su gen de la distrofina serán escasos, a menudo causado por la falta de diagnóstico molecular completo. Así que los padres deben insistir en que la mutación exacta en el gen de la distrofina de su hijo afectado sea determinada lo antes posible. (3) El establecimiento de registros con los datos de diagnósticos completos de tantos pacientes como sea posible de todas partes del mundo sería una ventaja tremenda para el diseño de las futuras pruebas, y las familias deben ser animadas a enterarse de la existencia de tales registros e inscribir a su hijo. (4) Una real cultura de pruebas entre la comunidad de familias Duchenne, doctores, y científicos con cooperación internacional debe ser desarrollada en tantos países como sea posible. Hay un nuevo esfuerzo de colaboración internacional dirigido por *Kate Bushby* y su colega *Volker Straub* - TREAT-NMD: [www.treat-nmd.eu](http://www.treat-nmd.eu) - que esperanzadoramente acelerará el progreso de moléculas prometedoras en las pruebas y los tratamientos.

Hay mas pruebas clínicas negativas que positivas, así que ningún paciente debe detener o descuidar la mejor atención médica posible que ya está disponible. Por la misma razón, no tiene sentido recorrer grandes distancias para tomar parte en una prueba cuando todavía no hay ninguna idea si va a dar un resultado positivo. El consentimiento debe siempre ser dado voluntariamente después de la explicación completa de todos los detalles positivos y negativos. Las discusiones con los científicos y los médicos deben ser siempre posibles, y a los padres debe permírseles retractarse de que su hijo afectado participe en la prueba en cualquier momento sin tener que defender su decisión.

Kate Bushby dijo finalmente: Solamente las pruebas clínicas correctamente diseñadas y llevadas a cabo traerán una terapia efectiva dentro de un tiempo razonable. Los errores deben ser evitados a todo costo: podrían retrasar esfuerzos enteros de investigación y prolongarían el tiempo que los niños tienen que esperar para un cambio decisivo y positivo de su futura vida.

## Omisión de exón.

**Cómo trabaja la omisión de exón:** La omisión de exón es una de las técnicas terapéuticas potenciales que ya esta siendo probada clínicamente en pacientes con Duchenne. En su presentación introductoria, *Steve Wilton* de la Universidad de Australia Occidental en Perth, describió esta técnica en detalle. Los lectores de este informe que no están familiarizado con la bioquímica de cómo los genes hacen las proteínas, de la estructura y la función del gen de la distrofina y la proteína distrofina, y cómo las mutaciones causan distrofia Duchenne, deben por favor primero leer los capítulos introductorios del informe sobre la reu-

nión del Parent-Project en Cincinnati/Ohio en Julio del 2006. Este informe está disponible en inglés, alemán, y español en Internet en [www.duchenne-investigacion.com](http://www.duchenne-investigacion.com).

La técnica de omisión de exón trata de transformar una mutación Duchenne en una mutación Becker, así la gravedad es reducida. Si una mutación altera el marco de lectura y por lo tanto causa distrofia Duchenne, el marco de lectura puede ser corregido retirando artificialmente del ARN mensajero uno o más exones directamente antes o después de la delección, duplicación, o el exón que contiene una mutación puntual. En el último caso, el retiro de un solo

exón mutado puede evitar el defecto, o podría ser necesario retirar uno o más exones cercanos para mantener el marco de lectura.

Los exones pueden ser eliminados del ARNm con *oligorribonucleótidos en antisentido*, AONs. Ellos son cortas estructuras de ARN que constan de 20 a 30 nucleótidos cuyas secuencias son construidas en tal manera que ellos mismos por emparejamiento Watson-Crick de bases se unían solamente a la secuencia complementaria dentro del exón a ser retirado o a las regiones de sus fronteras. En *antisentido* quiere decir que su secuencia de bases está en el orden contrario a la secuencia objetivo en el ARNpre-m. Estos AONs interfieren así con la maquinaria de empalmado con el fin de que los exones seleccionados no sean más incluidos en el ARNm por lo tanto, son *omitidos*.

El empalmado de los exones del ARNpre-m al ARNm es un procedimiento muy complicado y preciso mediado por un complejo de muchas proteínas que reconocen las fronteras entre los exones y los intrones. Los AONs tienen que tener una secuencia de nucleótidos suficientemente larga con el propósito de inhibir el empalmado de solamente esos exones seleccionados que son necesarios para devolver el marco de lectura al ARNm de la distrofina defectuosa. Actualmente son conocidos 231,677 exones de los aproximadamente 23,000 genes humanos. El proceso de omisión de exón, por lo tanto, tiene que ser sumamente específico y preciso. Si los AONs causaran omisión de exón en otros genes, efectos secundarios peligrosos serían la consecuencia.

La omisión de exón *no altera el gen mismo con su mutación*, pero su ARNm no contiene más la información del exón o exones omitidos, y ni tampoco de los exones deletados. Esta terapia afecta cómo es leído y procesado el gen defectuoso. Como este ARNm omitido es más breve de lo normal, la proteína distrofina es también más corta, contiene menos aminoácidos. Si los aminoácidos faltantes forman parte de regiones no-esenciales de la distrofina, como los dominios de la varilla central (central rod), la proteína más corta puede a menudo todavía llevar a cabo su papel estabilizador en la membrana celular del músculo. El resultado sería el cambio de síntomas severos Duchenne a síntomas mucho más leves de distrofia muscular Becker.

Los *oligorribonucleótidos* son pequeños trozos de ARN - oligo significa pocos. Los *nucleótidos* son los componentes básicos de los ácidos nucleicos. Constan de tres unidades moleculares: una ribosa, una base, y un fosfato. Así que hay cuatro *ribonucleótidos* diferentes. Lo dos tipos de AONs que son mayormente usados en la omisión de exón, son *oligorribonucleótidos* protegidos con el propósito de que no sean destruidos en las células musculares por nucleasas, enzimas, que destruyen ácidos nucleicos.

Los científicos holandeses están usando los *2'O-metilfosfotioatos*, también llamados *metil-tioatos* o *2O-metilos*. Ellos tienen un grupo metilo, un carbono con tres átomos de hidrógeno, unido al oxígeno del segundo carbono de las unidades de ribosa y un átomo de azufre en lugar de uno de los átomos de oxígeno de los grupos de fosfato. Los *morfolinos*, que los investigadores australianos han encontrado más prometedores, y que los británicos usarán en su prueba planeada, tienen uno de los oxígenos del fosfato reemplazado con un grupo dimetil amido, un nitrógeno con dos grupos metilos, y las unidades enteras de ribosa son reemplazadas por anillos morfolidos, seis anillos unidos, cada uno consiste de cuatro átomos de carbono, uno

de oxígeno y un átomo de nitrógeno con átomos de hidrógeno unidos a los carbonos.

En el laboratorio del Dr. Wilton, AONs morfolidos están siendo desarrollados, probados, y optimizados, para que todos los exones de la distrofina puedan ser omitidos, uno solo o varios al mismo tiempo, en cultivos de células musculares normales y distróficas de ratón, perro, y humano. Algunos exones son omitidos más fácilmente que otros. Los exones que son difíciles de retirar del ARNm necesitan concentraciones más altas de AONs, pero el trabajo continúa para optimizar sus estructuras. Los AONs Morfolinos son probablemente muy seguros en los humanos, porque ya han sido evaluados en adultos, no en niños, como antibióticos para destruir virus.

La omisión de exón *no será una cura para distrofia Duchenne*, deberá reducir la severidad de sus síntomas al convertirla en distrofia Becker con una mejor prognosis. Esto probablemente beneficiará hasta un 80 % de todos los pacientes con Duchenne. Los primeros estudios clínicos, uno usando 2O-metilos y el otro morfolidos como se describe abajo, se dirigirán al exón 51 localmente en un solo músculo para establecer el *principio de prueba*. Pruebas sistémicas con inyecciones de los AONs en la circulación sanguínea seguirían pronto. Los investigadores continuarán trabajando para evaluar ambas clases de AONs clínicamente, porque al poder ocurrir resultados negativos en futuras pruebas clínicas con un tipo de AON hará aconsejable no usarlo en estudios a largo plazo. Incluso es concebible que combinaciones de ambos tipos de AON podrían ser usadas en el futuro.

Muchos detalles sobre la omisión de exón fueron hablados en una entrevista con *Steve Wilton* que era parte del informe de la reunión de Cincinnati. Ese informe contiene también en su última página un ejemplo detallado de la omisión del exón 46 para devolver el marco de lectura después de la delección del exón 45.

**Omisión de exón el corazón:** Al principio de su presentación, *Dominic Wells* de la Universidad Imperial de Londres resumió sus experimentos de omisión de exón con ratones mdx. El usó un *oligorribonucleótido en antisentido morfolino*, AON, que contenía 25 unidades de ribonucleótidos cuya secuencia fue dirigida contra las últimas 7 bases del exón 23 y las primeras 18 bases del siguiente intrón 23 del ARNpre-m de la distrofina de ratón. Este AON se une por si mismo exclusivamente a la secuencia complementaria en la región fronteriza del exón 23 /intrón 23. Esto previene que la maquinaria de empalme inserte el exón 23 entre los exones 22 y 24 del ARNm, *omitiendo el exón 23*. Y esta es la intención, porque en el ratón mdx, este exón tiene una mutación puntual en la posición 3,185, que cambió el codón CAA para el aminoácido glutamina por TAA un codón de parada prematuro. Por lo tanto, la producción de distrofina se termina en esta señal de parada y el animal no tiene ninguna o muy poca distrofina en sus músculos. La eliminación del exón 23 entero quita esta señal de parada, y debido a que ambas fronteras del exón 23 acaban entre codones de aminoácidos enteros, el omitir este exón no afecta el marco de lectura. Los ribosomas, las "fábricas de proteínas" entonces hacen una distrofina más corta de lo normal, 72 aminoácidos están faltantes, querer decir que la nueva distrofina es aproximadamente 2% más corta que lo normal. Después de una sola inyección local del AON específico en solo un músculo esquelético, el músculo

recuperó su función significativamente y expresó, produjo, distrofina durante al menos 10 semanas. El trabajo antes divulgado por el grupo de *Terry Partridge* ha mostrado que en una aplicación sistémica, una normalización similar de la estructura y la función de varios músculos esqueléticos fue obtenida después de 7 inyecciones intravenosas semanales de 100 mg de AON/ kg de peso en ratones mdx de 6 semanas. *Sin embargo, no era posible conseguir que los AONs morfolinos entraran en los músculos del corazón de los ratones.* Esto era una desventaja grave de los morfolinos comparado con los AONs 2O-metilo que en dosis altas entraban en los músculos del corazón y causaban la omisión de exón.

*Julia Alter* en el laboratorio de *Dominic Wells* podía cambiar esta situación aplicando ultrasonido con equipo comercial de ultrasonido de diagnóstico enfocándolo directamente al corazón de los ratones. El ultrasonido causa poros temporales en las membranas celulares de los músculos cardíacos. Esto permite que las moléculas de AON morfolino pasen al interior de las células. Cuando el tratamiento de ultrasonido es interrumpido, los poros en las membranas desaparecen otra vez. Y este efecto fue aumentado significativamente aplicando al mismo tiempo el agente de contraste *Optison* que es burbujas de albúmina cargadas con gas de aproximadamente 2 micrómetros de diámetro.

Esta técnica muy simple de aplicar incrementó considerablemente el número de fibras positivas de distrofina en el corazón. Y no interfirió en el tratamiento de AON en los músculos esqueléticos, e incluso ha sido demostrado incrementa el efecto de omisión de exón en los gastrocnemius, el músculo de la pantorrilla, y ningunos efectos secundarios han sido notados.

Esta tecnología simple usa un procedimiento evaluado y a menudo empleado para diagnóstico que uno debe considerar aplicarlo en las pruebas clínicas de omisión de exón sistémica no sólo con morfolinos sino también con AONs 2O-metilo donde también debe aumentar su fijación en todo tipo de músculos.

**Omisión de exón: Preparación de una prueba clínica en el Reino Unido:** en el Reino Unido, el consorcio *MDEX* fue creado en enero del 2005 para desarrollar la técnica de omisión de exón más allá y llevar a cabo estudios clínicos. Los miembros del consorcio son *Francesco Muntoni, Kate Bushby, Volker Straub, Dominic Wells, Jenny Morgan, George Dickson, Ian Graham, Matthew Wood, Steve Wilton, y Jenny Versnel*, todos son activos en investigación de Duchenne. El Departamento de Salud, el Concilio de Investigación Médica, el Parent Project del R.U., y la asociación británica de distrofia muscular, el Muscular Dystrophy Campaign, están también involucrados. Adicionalmente, el Comité Científico Asesor (SAB) de *MDEX* consta de *Kay Davies, Serge Braun, Ian Eperon, David Hilton-Jones, Chris Mathew, y Stephen Meech*, así como representantes sin derecho a votar de algunas asociaciones se están reuniendo cada 4 a 6 meses para supervisar y validar el trabajo del consorcio.

En la reunión, el presidente del consorcio *MDEX, Francesco Muntoni* del Colegio Imperial en Londres, presentó un informe sobre el estado de los preparativos para la próxima primera prueba y los planes para el futuro. Para esta prueba, varias decisiones ya han sido hechas: el exón a ser omitido será el exón 51, porque el grupo más grande

de mutaciones Duchenne como la delección de los exones 45-50, 47-50, 48-50, 49-50, 50, 52, 52-63, aproximadamente el 19 % de todas las delecciones Duchenne podían ser tratadas omitiendo sólo este exón 51. Seis AONs diferentes fueron probados en cultivos de músculo humano normal, en cultivos de músculo de niños con Duchenne, en preparaciones enteras de músculo (con *Steve Wilton*) y en ratones distróficos humanizados que contienen músculo de pacientes con Duchenne (con *Judith van Deutekom*). Los mejores resultados fueron obtenidos con el AON morfolino *H51A* desarrollado en el laboratorio de *Steve Wilton*.

*Dominic Wells* podía mostrar que después de la inyección en ratones mdx, estos tipos de AONs todavía estaban presentes después de 14 semanas, lo que mostraba que los AONs morfolinos son suficientemente estables para el tratamiento a largo plazo que será necesario para una terapia de por vida de chicos con Duchenne.

Tres grupos de dos chicos con Duchenne cada uno, de edad de 12 a 18 años, participarán en esta primera prueba. Después que todas las tres autoridades relevantes, el Comité Asesor de Terapia Génica (GTAC), la Agencia Reguladora de Productos Médicos y Salud (MHRA), y un comité local hayan dado su aprobación, el primer chico será reclutado y recibirá sus inyecciones en marzo del 2007. Tres dosis diferentes: 0.09, 0.297, y 0.9 miligramos de AON en 0.9 ml de solución será usado en cada grupo, administrado en un volumen de un centímetro cúbico de músculo con nueve inyecciones directamente en uno de los dos músculos *extensor digitorum brevis* (EDB) en el exterior del pie que es necesitado solamente para mover los dedos del pie. Los humanos no lo necesitan realmente y 0.8 % de la población general no lo tiene ni siquiera. Así que puede ser retirado sin serias consecuencias si algunos efectos secundarios inaceptables ocurrieran. Extensivos chequeos clínicos incluyendo biopsias serán hechos antes y 30 días después de las inyecciones para valorar los resultados del tratamiento. Una dosis más alta será usada solo si las dosis más bajas no son suficientes. Y la prueba no continuará si resultados claros positivos o negativos, son obtenidos en los primeros dos grupos de pacientes.

Ningunos resultados preliminares sobre esta primera prueba serán dados a conocer, a menos que haya resultados negativos que indicarán que la prueba tiene que ser detenida en el área de seguridad. Los resultados finales del estudio entero serán dados a conocer tan pronto como sean analizados y aprobados por el Comité Científico Asesor de *MDEX*.

Esta primera prueba es solamente un paso muy pequeño, sólo proveerá el principio de prueba de que la administración local de AON morfolino en un solo músculo humano es segura y eficaz para restituir por lo menos algo la producción de distrofina. Se espera que con las diferentes dosis usadas distrofina aparecerá en más del 10 % de las fibras musculares. Esto permitiría tener resultados confiables y también calcular la cantidad total de AONs necesaria para tratar todos los músculos de un chico en un futuro tratamiento sistémico.

Los chicos que participarán en esta primera prueba con morfolinos inyectados a nivel local no tendrán ningún beneficio terapéutico. Pero todos los resultados de esta prueba serán necesarios para un tratamiento verdadero, para una aplicación sistémica de los fármacos potenciales para Duchenne en la circulación sanguínea de un chico con el propósito de que todos sus músculos puedan ser alcan-

zados. Si la primera prueba local es exitosa, esta segunda prueba más importante con inyecciones intravenosas sistémicas empezará en la segunda mitad del 2007, y sus resultados deben estar disponibles en el 2008.

Que tanto esta interesada la comercialización, esto dependerá de los resultados de las pruebas. Si los enfoques británicos u holandeses no funcionan sistémicamente, es improbable que el desarrollo comercial de los fármacos AON comenzara. Sin embargo, si muestran que la aplicación sistémica trabaja con la eficacia suficiente en chicos con Duchenne, entonces es esperado que después en breve, pudiera haber producción en grandes cantidades de AONs dirigidos a muchos exones para el protocolo de estudios clínicos extendidos.

**Omisión de exón: La primera prueba clínica en Holanda.** En la reunión en Cincinnati, *Gerard Platenburg*, presidente de la compañía biotecnológica *Prosensa B.V.* en Leiden, Holanda, y, en la reunión en Londres, *Judith van Deutekom* del Centro Médico de la Universidad de Leiden informó sobre la *primera prueba en humanos con la técnica de omisión de exón*.

El objetivo de esta prueba es probar que la omisión de exón es segura y trabaja eficazmente en pacientes con Duchenne. Es un "estudio local" en una área pequeña de un solo músculo, el *tibialis*: un músculo anterior de la espinilla, que está siendo tratado con un oligorribonucleótido en antisentido, AON, contra el exón 51. La prueba solo proveerá una *prueba de principio* y aunque distrofina acortada es generada, ningún beneficio terapéutico es esperado en los chicos tratados, como el tratamiento es aplicado localmente y solo una vez.

El exón 51 fue escogido como el primer blanco a omitir porque fue exitoso omitir este solo exón permitiendo la restauración del marco de lectura de la proteína en casi el 25 % de todos los chicos con Duchenne con deleciones. Para esta prueba, cuatro chicos holandeses con Duchenne de 8 a 16 años de edad, han sido escogidos. Cada chico tiene una deleción diferente, concretamente de los exones 50, 52, 48-50, y 49-50 respectivamente. El estudio es abierto, o sea que todos los interesados saben quien de todos los cuatro niños está recibiendo un fármaco potencial para Duchenne.

Debido a que la omisión de exón es un nuevo procedimiento médico sin precedentes, intensivas pruebas clínicas y genéticas moleculares y una biopsia de piel fueron realizadas en cada niño antes de que se les permitiera tomar parte en esta prueba. Del material de la biopsia, cultivos de células serán preparados en los cuales la deleción particular fue determinada en el ADN y también en el ARN mensajero y – para tener totalmente certeza – las secuencias de bases esperadas de las regiones fronterizas alrededor de los exones delecionados fueron confirmadas en detalle. Además, el gen de la distrofina entero fue secuenciado para asegurarse de que no había ninguna irregularidad inesperada. Este cuidado especial tuvo que ser tenido, porque esta primera aplicación humana de la omisión de exón tendrá una influencia decisiva en el desarrollo posterior de esta terapia potencial para Duchenne.

Para esta prueba, los investigadores holandeses han escogido la versión de 2'-O-metil-fosfotioato AON, anti-exón 51 - también llamado 2O-metilo - porque tienen experiencia extensiva con estos AONs químicamente estabilizados, no sólo tratando fibras de músculo con éxito en

cultivos de células sino también por inyección local y sistémica en músculos individuales y la circulación sanguínea de animales vivos.

En esta prueba actualmente en curso, cada chico recibió una sola inyección bajo anestesia local en una pequeña área del músculo *tibialis anterior* de una solución que contenía 0.8 mg del 2O-metilo anti-exón 51. Cuatro semanas después de la inyección, una biopsia de músculo ha sido o será hecha y el tejido de músculo se checará para la presencia de proteína distrofina acortada, y su ARN mensajero.

Ninguna reacción adversa seria fue observada en todos los cuatro pacientes tratados. Dos biopsias ya habían sido realizadas a finales de octubre y los primeros resultados del ARN y los análisis de distrofina en el tejido muscular obtenido ¡eran muy prometedores! Aunque a la Dra. *van Deutekom* no le era posible proveer más detalles en este momento, pudo decir que el procedimiento al parecer trabaja algo bien y que el estudio puede ser continuado y terminado como era planeado.

Los investigadores holandeses ahora están preparando la siguiente prueba clínica en el que tratarán de omitir el exón 51 por la *aplicación sistémica* de los AONs 2O-metilos apropiados en la circulación sanguínea, con el propósito que el fármaco potencial pueda alcanzar todos los músculos incluyendo los de los pulmones y el corazón. Estos estudios serán pruebas de corto plazo que serán probablemente seguidos por estudios a largo plazo, el cuál podría posiblemente ya poder disminuir la velocidad de los síntomas de Duchenne de los chicos significativamente. Cuánto será mejorada la función muscular dependerá de las proteínas tipo Becker obtenidas después de la omisión. Algunas trabajarán mejor que otras.

Al final de su presentación, la Dra. *Van Deutekom* pidió a los padres ser cuidadosos y no sacar precipitadamente conclusiones prematuras. "*No estamos ahí aún*", dijo. Incluso si la omisión de exón trabaja en un paciente, no quiere decir que trabajará en otros. Todos los datos tienen que estar disponibles antes de que pueda ser dicho si realmente trabaja después de una aplicación local. Pero la área tratada es muy pequeña, por lo tanto ninguna mejora en la fuerza muscular es esperada. Ése no era el objetivo de este primer estudio, si no solamente de que la prueba de principio de que la omisión de exón trabaja y es segura. Sin embargo, las inyecciones intramusculares locales no serán la manera de tratar a los pacientes. Por lo tanto, antes de que empiecen pruebas adicionales, más datos y más estudios animales son necesarios, para encontrar - entre otras cosas - la mejor dosificación de AON para un tratamiento sistémico de cuerpo entero.

¿La respuesta para la cuestión de "Cuando estará esto en venta?" Esto tardará al menos cinco años más para tener el AON para la omisión del exón 51 listo. Si esto trabaja bien, el desarrollo de otros AONs seguirá poco después. En adición al AON 2O-metilo para omitir el exón 51, la compañía *Prosensa* ya ha diseñado y producido cuatro otros 2O-metilos en cantidades suficientemente grandes. Estos AONs permitiría el tratamiento de más del 50 % de todos los pacientes con deleciones. El desarrollo de fármacos necesita muchas pruebas, toma mucho tiempo y dinero. Sin *Prosensa*, las cosas podrían haber ido mucho más lentas. Incluso con su compromiso tardó dos años preparar y empezar el estudio clínico actual.

A la pregunta de cómo los pacientes podían participar

en los próximos estudios, la respuesta era que si los datos clínicos y genéticos de los chicos están en las bases de datos holandesas, los padres serán llamados si su hijo cumple todos los criterios de inclusión y es necesario para las pruebas.

*Judith van Deutekom* finalmente agradeció por encima de todo a las organizaciones Parent Project en los diferentes países, pero también a otras agencias financiación por su apoyo financiero y pidió a los chicos y sus padres que tuvieran paciencia y confianza porque ¡"Llegaremos hasta allí!"

**Omisión de exón sistémica en perros: Terry Partridge** del Centro Médico Infantil Nacional en Washington, que no estaba presente en Londres, envió el siguiente mensaje el 23 de enero del 2007:

### Transferencia del gen de la distrofina.

**Vectores virales y células madre de músculo: Jennifer Morgan** de la Unidad Neuromuscular Dubowitz del Colegio Imperial en Londres empezó su presentación con una descripción de los diferentes vectores que son usados para la transferencia de la secuencia de codificación entera del gen de la distrofina o las partes de él en células de músculo de chicos con Duchenne. La palabra *vector* es usada para los transportadores moleculares de las secuencias del gen. Son mayormente virus que normalmente infectaban células vivas y traen sus propios genes consigo que entonces ordenan a las células que los multipliquen. Los científicos han aprendido a crear virus no patógenos que no causan enfermedades severas en el laboratorio después sacar todos sus genes de multiplicación pero dejando lo que ellos necesitan para introducirse en sus células objetivo. Esto deja espacio para material genético foráneo, que puede ser introducido en su envase de proteína casi vacío. Estos virus modificados todavía pueden infectar sus células objetivo, pero no pueden ser multiplicados más en ellas. El material genético foráneo transportado es dejado en el núcleo de la célula, dentro o fuera de los cromosomas. Bajo las circunstancias correctas, este material foráneo, este gen foráneo, puede volverse activo y encargarse de la función de un gen dañado que no puede más trabajar apropiadamente. Los virus modificados llevan todo o solamente algunas de las secuencias de codificación del gen de la distrofina, por lo tanto pueden causar que la proteína distrofina sea hecha otra vez, así, los virus pueden proveer una terapia genética, pueden ser un *fármaco genético*.

Hay un número de diferentes clases de virus que han sido usados como vectores en los experimentos de terapia genética. El tipo, con el que los investigadores de Duchenne trabajan principalmente para restituir la proteína distrofina en células musculares, son los *virus adeno-asociados*. Son virus pequeños que tienen solo una molécula de una hebra de ADN como su material genético normal, su genoma normal. Ellos pueden entrar en las células musculares esqueléticas post-mitótica que son del 40 a 45 % del peso del cuerpo de un ser humano. Post-mitótica significa que estas células no pasan por la mitosis, no se están dividiendo más. Debido a que estos virus son tan pequeños, solo pueden aceptar material genético foráneo no más largo de aproximadamente 5,000 nucleótidos. Por lo tanto, solo pueden transportar aproximadamente un tercio del ADNc

En la colonia japonesa de perros distróficos, la mutación ha sido encontrada en un perro de raza *perdiguero dorado*. A un perro de 5 meses de edad se le dieron infusiones intravenosas de la combinación de morfollinos diseñada para omitir la mutación. Dos semanas después de la última inyección, tenía cantidades importantes de distrofina en varios de sus músculos, la patología muscular lucía mejor y había mantenido su velocidad para correr. Sus dos hermanos no tratados no tenían ninguna cantidad importante de distrofina y se habían deteriorado en todas las medidas usadas. Ningunos efectos tóxicos fueron notados en el perro tratado. Estamos justo a punto de empezar experimentos adicionales en dos perros usando dosis más altas y administrando la dosis original durante un período de tiempo más largo.

de la distrofina, un tercio de los exones unidos del gen. La construcción del vector ahora usado en la primera prueba clínica de transferencia del gen de la distrofina realizada en Columbus/Ohio, contiene un ADNc de micro distrofina que hace una proteína distrofina acortada que consta de solamente 2,539 aminoácidos, que es 31.1 % de los 3,685 aminoácidos de la distrofina normal. Debido a esta distrofina más corta de lo normal, este tipo de terapia genética no curará la distrofia Duchenne completamente, pero, como la omisión de exón, solo reducirá la severidad de sus síntomas hasta aquellos de progresión más lenta de distrofia muscular Becker.

Los virus adeno-asociados reparten su cargamento, el material genético terapéutico, en un cromosoma al azar, y no puede ser pronosticado o controlado donde esto ocurre. Pueden insertar el gen transferido entre dos otros genes, dentro de un intrón o un exón, y por lo tanto pueden activar, desactivar o destruir otro gen. Esto puede causar otra enfermedad o incluso cáncer cuando un proto-oncogen es activado.

Por esta y otras razones, la Dra. Morgan y su equipo de investigación han empezado a trabajar en otra estrategia: *la combinación de células madre con terapia genética*. Las células satélite de las fibras musculares son células madre que pueden dar lugar a nuevas células musculares completas en el tejido muscular dañado. Algunas de ellas se dividen asimétricamente, como las células madre lo hacen a menudo, y por lo tanto crean más células satélite que entonces se colocan en el exterior de la membrana de la célula muscular, desde donde pueden regenerar la célula muscular si es dañada. De hecho, células satélite de un donante sano, una persona con genes de la distrofina normales, han mostrado causar la producción de distrofina nueva y normal después de que fueron inyectadas en los músculos de un paciente con Duchenne. Otros tipos de células madre también han mostrado regeneran músculo esquelético, p.e. las células madre sinoviales y mesoangioblastos. Encontraremos la célula madre que da la mejor regeneración del músculo esquelético y usaremos este tipo de célula en los futuros experimentos.

Los *lentivirus* son un tipo de retrovirus con ARN como su material genético que se integra en el ADN de la célula del anfitrión y, crean una copia de una doble-hebra de ADN dentro de las células infectadas. Estos virus pueden



contagiar células que se dividen y que no se dividen, por lo tanto, también las células satélite de las fibras musculares. El equipo de investigación de la Dra. Morgan usa tales lentivirus para transferir los genes de un modificado factor de empalmado U7 con una secuencia en antisentido para omitir el exón 51 en células satélite. Esta es una técnica similar a la desarrollada por los científicos franceses alrededor de *Luis García*, que están usando virus adeno-asociados como vectores. El Dr. García proveyó a la Dra. Morgan con la construcción U7 lentiviral. En experimentos preliminares con esta técnica de lentivirus, la omisión del exón 51 fue obtenida en los cultivos de células de músculos humanos después de unas horas. Pero éstos son resultados muy preliminares de los experimentos, que tienen que ser repetidos y desarrollados todavía más. Más noticias sobre este enfoque adicional para una terapia de Duchenne son esperadas pronto.

**Primera prueba clínica de transferencia del gen de la distrofina en EUA: Xiao Xiao** de la Universidad de North Carolina en Chapel Hill, no pudo asistir a la reunión en Londres, pero envió el siguiente informe sobre el estado en curso de la terapia génica de mini-distrofina con AAV para distrofia Duchenne:

La terapia génica es una de las numerosas estrategias que están desarrollándose enérgicamente para el tratamiento de distrofia Duchenne. Entre los enfoques de terapia génica, la entrega génica mediada por virus adeno-asociado (AAV) de un gen de mini- o micro-distrofina funcional tiene algunas ventajas aparentes. Es muy eficaz en el músculo y el corazón y es capaz de cubrir casi el espectro entero de los pacientes con Duchenne. Los estudios preclínicos de principio de prueba en modelos animales pequeños y grandes han respaldado el desarrollo de la terapia de mini-gen de la distrofina para pruebas clínicas.

A través de la colaboración entre la Universidad de North Carolina, la Universidad de Ohio State y la compañía bio-farmacéutica *Asklepios* y apoyo de la Asociación de Distrofia Muscular de EUA MDA, una fase-Ia de prueba clínica de terapia génica ha sido iniciada en marzo del 2006. Fue aprobada por la Agencia Federal de Fármacos FDA luego de pruebas de seguridad y toxicología del vector AAV de mini-distrofina en animales de laboratorio.

Es una prueba aleatoria, con método doble-ciego, con seis pacientes y dos dosis diferentes que involucran una inyección intramuscular local del vector génico. Los objetivos principales son: (1) coleccionar datos de seguridad incluyendo la historia del paciente de los síntomas, reacciones febriles, hinchazón o eritema - inflamación de la piel - en el sitio de la inyección, medición de cambios en la química del serum y hematología, urinalisis, prueba de función pulmonar, y prueba isométrica de fuerza muscular; (2) determinar la dosis requerida para conseguir la producción - expresión - del mini-distrofina en el músculo y (3) monitorear las reacciones inmunológicas potenciales para la mini-distrofina así como al vector de entrega mismo.

Hasta ahora, todos los tres pacientes en el grupo de dosis baja han sido inyectados y las biopsias de músculo colectadas. Ningunos eventos adversos relacionados con la terapia génica fueron observados. Dos de los tres pacientes en el grupo de dosis alta también han sido inyectados. Ningunos efectos adversos relacionados con la terapia génica han sido observados entre ellos tampoco, indicando que el procedimiento es tolerado bien. Debido a la naturaleza del

diseño doble-ciego, los datos de la biopsia de músculo no serán analizados hasta que todos los seis pacientes sean inyectados y muestras de músculo colectadas. Los resultados del análisis preliminar de estos pacientes son esperados en el verano tardío del 2007.

Nuestro próximo objetivo es desarrollar métodos de entrega génica regional - similar al usado en la prueba de plasmidos francesa - para tratar grupos grandes de músculos y eventualmente el cuerpo entero. Hemos investigado este método de perfusión retrógrado intravenoso en los miembros de perros normales y distróficos tanto con genes marcadores como con el gen de mini-distrofina de perro. Alentadores resultados de transferencia génica y de expresión han sido obtenidos. Además, hemos también iniciado la investigación de este método en simios usando un gen marcador. Nuestros datos preliminares revelaron expresión génica extendida en varios grupos de músculo que evaluamos en las piernas traseras. Sin embargo estudios extensivos, a corto y largo plazo son requeridos para optimizar el sistema de entrega génica y establecer la seguridad y eficacia en animales grandes antes de que la fase-Ib de prueba clínica de la entrega génica regional pueda tener lugar.

En la reunión de Cincinnati, *Scott McPhee* de *Asklepios* informó que el vector usado en esta prueba era un AAV modificado de serotipo 2, llamado BNP2.5, conteniendo un gen de mini-distrofina que no contiene partes del exón 17, todos los exones del 18 al 59 e incluso del 70 al 79. Eso quiere decir que la distrofina Becker esperada será aproximadamente un tercio del largo de la proteína normal porque carece de las regiones R3 a la R21 de la varilla central y el extremo terminal C.

**Omisión de Exón con transferencia del gen U7: Luis García** del Instituto Génethon en Evry cerca de París presentó los resultados obtenidos en su laboratorio en un enfoque para *combinar la omisión de exón con terapia génica*. Los investigadores franceses están intentando ordenar a las células musculares que produzcan los *oligorribonucleótidos en antisentido*, AONs, que son necesarios para la omisión de exón para que no tengan que ser aplicados repetidamente. Esto puede ser conseguido transportando dentro los músculos la información genética para la construcción de los AONs. Su idea fue usar *ARNsn's-U7*, ARN's nucleares pequeños, que tienen una estructura similar a los factores empalme. Estos ARNsn's-U7 pueden ser modificados con el propósito de que puedan causar la omisión de exón.

Para proveer el *principio de prueba*, los científicos franceses evaluaron este enfoque en el ratón mdx cuya mutación en el gen de la distrofina, un codón de parada prematuro, puede ser corregido omitiendo el exón 23. Para conseguir esto, los científicos añadieron una corta secuencia de ADN con la información para dos secuencias en antisentido a la secuencia del gen para el ARNsn-U7. Es importante saber en este punto, que los ARNsn's, como todos los otros ARN's, también son "hechos" por genes. Estas secuencias adicionales de ADN en el gen del ARNsn-U7 eran de 24 a 20 nucleótidos de largo y fueron diseñadas en tal manera que, después de que son copiadas en el ARN, pueden unirse específicamente por si mismas a dos secuencias del ARNpre-m de distrofina de ratón. Una está ubicada al final del intrón 22 y la otra en la frontera del exón 23 con el siguiente intrón 23.

Para transferir el gen modificado U7, U7 SD23/BP22, a

los músculos de los ratones, fue insertado junto con secuencias adicionales de control en un vector, un *virus adeno-asociados*, AAV, de una estructura genética tipo-2 con un envase de proteína tipo-1, partes de su propio material genético fueron quitadas para hacer espacio para la secuencia génica a ser transportada. Hasta 20 billones ( $20 \times 10^{12}$ ) de estos virus modificados e inofensivos fueron inyectados en los músculos de 37 ratones-mdx. Después de seis semanas, hasta 80 % de las fibras de los músculos tratados tenían nueva distrofina acortada que no contenía más los 72 aminoácidos determinados por la secuencia normal del exón 23. Y esta nueva distrofina todavía estaba presente un año después de esta sola inyección de los vectores. La nueva distrofina emigro también a su lugar normal debajo de las membranas celulares del músculo, y las células musculares "rescatadas" lucían muy normales bajo el microscopio. Los procesos distróficos en los músculos mdx, es decir su acelerada degeneración y regeneración, fueron interrumpidos totalmente. Y tampoco había ninguna respuesta inmunitaria contra la nueva distrofina.

Entonces, otros cinco ratones-mdx fueron tratados similarmente, pero los vectores de virus fueron inyectados sistémicamente en su circulación sanguínea. Después de un mes, más del 80 % de las fibras de todos los músculos investigados de la pata tenían nueva distrofina, y también otras proteínas del complejo distrófico, que fueron analizadas, habían reaparecido. Esto quiere decir, que los sitios de unión de la nueva distrofina con estas proteínas tenían la estructura normal. Su función muscular fue estudiada midiendo la contracción espontánea de los músculos tratados después de que fueron estirados energicamente. Esta normalmente muy reducida función en los ratones-mdx había regresado a la normalidad, si los músculos contenían más del 70 % de fibras con nueva distrofina. Y los ratones-mdx tratados, que fueron físicamente estresados corriendo sobre una cinta rodante cuesta abajo, no desarrollaron el daño muscular acostumbrado encontrado en ratones-mdx no tratados.

Esta técnica de transferencia del gen-U7 fue aplicada entonces para tratar al perro *perdiguero dorado* GRMD distrófico. En contraste con el ratón-mdx, que no es significativamente incapacitado por la ausencia de su distrofina, el perro distrófico tiene síntomas clínicos severos similares a los niños con distrofia Duchenne. Su gen de la distrofina tiene una mutación puntual en la región del receptor de empalme del exón 7 con el propósito de que este exón sea eliminado y el marco de lectura después de la delección es cambiado resultando en una señal de parada prematura con el resultado de que el perro no tiene distrofina en sus músculos. Omitiendo los dos exones laterales 6 y 8 simultáneamente, el marco de lectura puede ser reparado.

Ésta es una mutación que es difícil de manejar. En principio, se trato de omitir dos exones con la transferencia simultánea de dos genes U7 modificados diferentes contra los exones 6 y 8. Como los resultados eran decepcionantes, los investigadores usaron el mismo vector con un gen modificado en contra del exón 8 y un gen modificado en contra de los dos exones 6 y 7. Después de dos meses de la inyección intramuscular local con un 1 billón ( $10^{12}$ ) de estos vectores en "tándem", se encontro un nivel de distrofina prácticamente normal en el material de la biopsia obtenido de cerca de 1 cm de largo.

Esto mostraba que hay una oportunidad de rescatar todos los músculos esqueléticos con este tipo de terapia

génica. Por lo tanto, como próximo paso, una aplicación sistémica de los vectores debe haber sido intentado. Sin embargo, los científicos franceses no tenían suficientes virus, cargando las secuencias del ARN-U7 y del AON, para tratar al perro entero. Por lo tanto, bloquearon la circulación sanguínea en una pierna e inyectaron en sus venas durante 15 minutos, prácticamente todos sus 100 billones ( $10^{14}$ ) de virus preparados. Algunos edemas se desarrollaron, pero eso no fue malo, porque entonces los virus emigraron sin problemas a donde se suponía debían ir. Bastante distrofina nueva y acortada apareció, que sin embargo no estaba distribuida uniformemente en los músculos de la pata, pero estaba en cantidades similares a lo que tienen los pacientes de Becker. Después de seis meses, ¡todavía estaba ahí!

Ahora, una fase I de prueba clínica con niños con Duchenne esta siendo preparada en la que el exón 51 será omitido. Tal tratamiento con virus vectores probablemente necesitará supresión inmune. Y Luis García y sus colegas están también tratando de combinar este tratamiento con una transferencia génica similar en la que el gen de la miostatina será bloqueado. Esta combinación ya fue probada en ratones, aunque no son los animales más apropiados, ya que regeneran sus músculos muy eficientemente. Ahora, está siendo probada en perros. Los resultados deben ser informados dentro aproximadamente un año.

**Prueba clínica de transferencia del gen de la distrofina con plasmidos en Francia:** *Serge Braun*, el Director de Investigación y Desarrollo de la de la Asociación Francesa de Distrofia Muscular AFM, quien no estuvo presente en la reunión de Londres, envió el siguiente informe:

La AFM y la compañía *Transgène* en Estrasburgo empezaron una cooperación en 1995 para probar la transferencia del gen de la distrofina con plasmidos vectores. Para esta técnica, las secuencias combinadas de ADN de los 79 exones del gen de la distrofina normal, su ADNc, y sus estructuras controladoras, fueron insertadas en el material genético de plasmidos. Los plasmidos son pequeñas estructuras circulares de ADN sin proteínas dentro de las bacterias, a las que otorgan principalmente resistencia contra los antibióticos. Como los plasmidos constan solamente de material genético, *ADN desnudo*, y no contienen alguna proteína, ninguna respuesta inmune se desarrolla contra este vector y su carga.

Después de experimentos preliminares exitosos en cultivos de células de músculo, y con ratones y perros distróficos, una primera prueba clínica con pacientes empezó a finales del 2000. En esta prueba, 9 chicos con Duchenne participaron, eran todos mayores de 15 años porque tuvieron que dar su consentimiento tras una explicación previa. La solución de plasmidos fue inyectada en un solo músculo del antebrazo. Nueva distrofina de largo completo apareció en hasta el 25 % de las fibras musculares alrededor de los sitios de la inyección. No había ninguna señal de una respuesta inmune, ni contra la construcción de plasmido, ni contra la distrofina recién producida. Esta fase I de prueba por lo tanto mostraba que la transferencia génica con ADN desnudo es un procedimiento seguro.

Los científicos franceses entonces empezaron a trabajar con el equipo de *Jon Wolff* de la compañía *Mirus* en Madison/Wisconsin que inyectó construcciones de plasmido similares en la circulación sanguínea de miembros solos de ratones, ratas, perros, y monos *bajo presión*. La presión

fue producida por bloqueo de corto plazo de la circulación sanguínea de un miembro con un globo para medición de presión sanguínea.

El próximo paso es empezar una prueba clínica con pacientes con Duchenne usando este nuevo sistema de entrega, la inyección intravenosa regional en miembros individuales bajo presión. El mismo sistema de entrega ha sido usado recientemente con éxito en ratones y perros para la omisión de exón después de la transferencia del AAV con el gen U7 en el laboratorio de *Luis García*. Pero para los preparativos de la prueba con plasmidos, ha habido algunas dificultades técnicas relacionadas con la producción en gran escala de los vectores plasmidos con el material genético de la distrofina. Sin embargo, esto es principalmente un problema técnico y no conceptual, y eso será resuelto pronto.

Las autoridades reguladores de EUA y Francia han sido se acercadas en vista de la nueva prueba. Los estudios preclínicos controlados de seguridad son requeridos en monos antes de que los vectores de plasmidos puedan ser aplicados en humanos. Transgene y Mirus tienen ahora buenos registros de seguridad tanto en perros GRMD distróficos, como en monos, así que esos estudios de seguridad tampoco deben ser un problema.

Este acercamiento de plasmidos de distrofina de largo completo tiene que ser desarrollado más allá, aun incluso en caso de que la omisión de exón se vuelva exitosa en humanos, los pacientes que no son idóneos para la omisión de exón necesitan alternativas.

**Transferencia de células miogénicas, pruebas clínicas en Canadá:** *Jacques Tremblay* de la Universidad Laval en Québec City, que no estuvo presente en la reunión de Londres, envió publicaciones sobre los nuevos experimentos con la técnica de transferencia de mioblastos, que debería ahora ser llamado *transplante de células miogénicas*.

En una prueba clínica con 9 pacientes con Duchenne, los científicos canadienses pudieron mostrar que en 8 pacientes más de 26 % de fibras musculares con nueva distrofina normal fueron creadas después de la inyección de células miogénicas normales de un pariente. Las células fueron inyectadas en una distancia de solo 1 a 2 mm entre sí en una área pequeña del músculo de la espinilla, el tibialis anterior.

Por el momento, una segunda prueba clínica está en marcha con inyecciones en todo un músculo en el que uno podría demostrar fácilmente una mejora funcional – levantando la mano usando solamente la muñeca -. Este transplante de células tendría algunas ventajas, entre otras, (1) la nueva distrofina tendría la longitud normal y bajo el control de sus secuencias de control normales; (2) el efecto positivo sería a largo plazo; (3) la técnica podría ser combinada con una inhibición de la miostatina; y (4), más importante, también podría ayudar a los pacientes con Duchenne más viejos. Sin embargo, el comité de ética humana de su hospital limitó la participación de los pacientes a aquellos que tienen más de 18 años. Esta es una restricción mayor que hace difícil el reclutamiento de pacientes que todavía pueden hacer este movimiento en ambos lados. Efectivamente un lado es inyectado con células miogénicas mientras el otro lado es inyectado con solución salina. El paciente no sabe qué lado fue inyectado con células con el propósito de que la mejora pueda ser valorada sin predisposición.

Algunos padres están preocupados del gran número de inyecciones requeridas para administrar los mioblastos en todo un músculo - 100 inyecciones por centímetro cuadrado -. Este tipo de transplante ha sido hecho en un gran número de monos sin problemas, y más recientemente en dos pacientes con DMD bajo solo anestesia local que era suficiente para reducir el dolor local que sentían después del final de la anestesia local, y ambos pacientes dijeron que recibirían inyecciones adicionales en otros músculos sin titubeo. En colaboración con la AFM, el Dr. Tremblay ha organizado una pequeña reunión en Evry a inicios de febrero del 2007 para comprender los mecanismos involucrados en la emigración de mioblastos en un músculo con el propósito de que el número de inyecciones pudiera ser eventualmente reducido.

El grupo del Dr. Tremblay también está siguiendo el trabajo de investigación del bloqueo de miostatina en combinación con el transplante de células miogénicas. Los resultados recientes en ratones distróficos demuestran claramente que las fibras musculares que expresan distrofina son más del doble de grandes. La presencia de distrofina debe hacer las fibras musculares más resistentes durante la contracción muscular mientras su tamaño aumentado debe incrementar la fuerza muscular.

Otro tema de la investigación es el desarrollo de la tolerancia inmunológica. Éste es un tratamiento que tiene por objetivo evitar el requisito del uso sostenido de fármacos inmunosupresores seguido del transplante de mioblastos. Los resultados obtenidos en ratones son excelentes. Fibras positivas de distrofina fueron obtenidas en músculo distrófico sin una supresión inmune sostenida y aun fue posible hacer un segundo transplante de células miogénicas sin recibir un tratamiento tolerigénico, supresión inmune. Experimentos similares están en curso en monos y perros para obtener resultados que puedan permitir un día usar tales tratamientos tolerigénicos en pacientes. Todavía, sin embargo, pasaran muchos años de investigación antes de que este objetivo sea logrado. Este tratamiento tolerigénico sería eventualmente útil para el transplante de células madre obtenidas de un donante, como los mesoangioblastos actualmente investigados por *Giulio Cossu*.

**Transferencia génica con mesoangioblastos, células madre adultas de músculo:** *Giulio Cossu* del Instituto de Célula Madre en el Hospital San Raffaele en Milán, que no estaba en Londres tampoco, actualizó y corrigió mi resumen anterior sobre su trabajo:

Para una terapia eficaz de células madre en distrofia Duchenne, una fuente segura y éticamente aceptable de una gran cantidad de células madre de músculo adultas es necesaria, que den lugar exclusivamente a células musculares y a nada más, especialmente no a tumores. Y debe ser posible aplicar estas células sistémicamente inyectándolas en el sistema de vasos sanguíneos que pueda distribuir las alrededor del cuerpo. Luego tienen que cruzar la pared del vaso, y quedarse dentro del músculo sin crear algún problema local. Estas condiciones al parecer pueden ser logradas por los *mesoangioblastos*, que son células madre adultas ubicadas en el exterior de los pequeños vasos sanguíneos entre el tejido muscular.

*Giulio Cossu* y sus colegas llevaron a cabo experimentos básicos cuyos resultados no solo se volvieron importantes para un tratamiento de células madre para distrofia Duchenne, si no también para muchas otras distrofias

musculares.

Los investigadores italianos no usaron el ratón mdx como un modelo animal, pero si un ratón cuyo gen del alfa-sarcoglicano, una de las proteínas asociadas al complejo distrófico, se le fue inactivado. Estos ratones tienen un tipo de distrofia muscular de Cinturas, Anillo Óseo o LGMD, que es clínicamente similar a la distrofia Duchenne. Los investigadores aislaron mesoangioblastos de ratones normales, que tenían intacto el gen del alfa-sarcoglicano, los trataron con algunos factores diferentes de crecimiento y luego los inyectaron en la circulación sanguínea de ratones con LGMD. Estas células madre "sanas" podían emigrar a todos los músculos esqueléticos de los ratones vivos, y causaron la reaparición de más del 80 % de la cantidad normal de alfa-sarcoglicano. Resultados similares fueron obtenidos con mesoangioblastos aislados de músculo distrófico y tratados con un vector viral con el gen expresante del sarcoglicano.

Para una posible terapia Duchenne con esta nueva técnica, el gen intacto de la distrofina tiene que ser transferido a mesoangioblastos derivados del paciente por un procedimiento ex-vivo con vectores conocidos, multiplicados luego en el laboratorio, y finalmente re-inyectados en la circulación sanguínea del paciente. Posiblemente, este tratamiento tendría que ser repetido periódicamente, por lo tanto es importante que estas células no sean vistas por el sistema inmune como "no-propias" y rechazadas. Alternativamente células normales donadas pueden ser usadas bajo supresión inmune.

Por lo tanto, como próximo paso hacia una aplicación humana, El equipo del Dr. Cossu aisló mesoangioblastos de perros normales y distróficos, los multiplicó en cultivos y los inyectó en una arteria de la pata de los perros distróficos. Antes de la inyección, el gen, el ADNc, de una micro-distrofina fue transferido con un vector viral lentiviral en los mesoangioblastos distróficos.

Hasta cinco inyecciones mensuales de mesoangioblastos tanto normales, como distróficos corregidos resultaron en nueva proteína distrofina en muchos músculos en los perros distróficos. En un animal, las células fueron administradas por un catéter en la aorta. Esto permitió la diseminación más extendida de los mesoangioblastos. Los resultados de las inyecciones de células madre eran dramáticos: este último animal exhibió una mejora notable en su distrofia y caminaba bien cinco meses después de la inyección final; los otros animales se recuperaron en un grado menor. En general, los perros que recibían células donadas de animales normales mejoraron más, que aquellos que recibían mesoangioblastos corregidos de los mismos perros. Algunos músculos en los perros inyectados tenían niveles casi normales de distrofina, e incluso los músculos con solo niveles moderados de distrofina indicaban una mejora

significativa en la estructura y función.

Con experimentos adicionales, los investigadores pudieron incrementar la eficacia terapéutica de los mesoangioblastos tratándolos en el cultivo de células o con DETA-NO o IMN, dos compuestos bien conocidos que producen gas óxido nítrico, NO, en el entorno del cultivo. El óxido nítrico actúa como una hormona, su efecto principal es la dilatación de los vasos sanguíneos. Después de la inyección sistémica de los mesoangioblastos tratados con NO en las arterias de los ratones con LGMD sin alfa-sarcoglicano, estas células madre tenían una habilidad significativamente mejorada para emigrar a los músculos distróficos, para resistir su ambiente destructor de células y fusionarse con las fibras musculares regenerantes. Esto resultó en una recuperación importante de la producción de alfa-sarcoglicano. Este tratamiento por lo tanto pudo limitar el daño muscular de los ratones distróficos.

En vista del objetivo final de desarrollar una terapia para Duchenne, los científicos tenían la idea de buscar un fármaco que no sólo pueda generar NO sino también tuviera propiedades anti-inflamatorias similares a la prednisolona. El fármaco escogido fue el HCT 1026, un derivado del flurbiprofeno, INN, uno de los fármacos no-esteroidales anti-inflamatorios más potentes. El HCT 1026 produce NO y no muestra los efectos secundarios a menudo severos de los corticoesteroides. Es un conocido y seguro fármaco, ya aprobado su uso humano, y eficaz en administración oral. Por lo tanto, es apropiado para el tratamiento a largo plazo. El efecto anti-inflamatorio del HCT 1026 no corrige el defecto genético de la distrofia Duchenne, pero su habilidad de generar NO, que había sido demostrado estimula el efecto de los mesoangioblastos, indica que una combinación de estos dos enfoques podría ser especialmente prometedora.

Por lo tanto, *Giulio Cossu* y su colega *Emilio Clementi* y sus equipos probaron el efecto del HCT 1026 solo, y con mesoangioblastos sobre los dos modelos animales de distrofia muscular, el ratón negativo de alfa-sarcoglicano y mdx en una prueba a largo plazo durante un año. El HCT 1026 solo, disminuyó dramáticamente el progreso de la enfermedad y mantuvo la integridad del músculo y su función. Era significativamente más potente que la prednisolona y no produjo efectos secundarios detectables. Además, los tratamientos combinados del fármaco y células madre incrementaron hasta 4 veces el número de fibras positivas de distrofina en ratones mdx y por lo tanto, mejoraron significativamente el potencial terapéutico de los mesoangioblastos incrementando su emigración y fusión con fibras de músculo distrófico. Estos resultados abren una ventana a una terapia eficaz para distrofia muscular Duchenne.

## Acercamientos Farmacológicos.

**Utrofina para reemplazar la distrofina:** *Kay Davies* de la Universidad de Oxford es una de los "Gigantes" que en los 1980s trabajó como *Louis Kunkel* para encontrar el gen que causa la distrofia muscular Duchenne cuando se inactiva por una mutación. Ellos tienen desde entonces y todavía están en una competencia amistosa para encontrar un tratamiento, cambiándose a estudiantes y, como es usual entre científicos con el mismo objetivo, se reúnen a menu-

do, hablan de su trabajo, sus ideas y planes y así estimulan el trabajo de los otros. El campo de investigación de la distrofia muscular ha producido resultados remarcables en los últimos años así que habrá algunos tratamientos efectivos para esta terrible enfermedad.

Aquí hay cuatro grandes desafíos que tienen que ser conocidos por alguien que trata de encontrar una terapia para distrofia Duchenne: (1) La distrofina es una proteína

inmensa cuya función tiene que ser restituida; (2) para hacer una diferencia, al menos 20% del nivel normal de distrofina tiene que reaparecer otra vez, o si no es esta proteína, entonces otra como la utrofina que puede reemplazarla; (3) esto debe ocurrir en todos los músculos esqueléticos, y en aquellos del corazón y los pulmones, también; y (4), cualquier respuesta inmune en contra de una nueva proteína tiene que ser evitada.

Cuando la Dra. Davies y sus colegas trataron de encontrar el gen Duchenne, en vez de eso encontraron esta otra proteína, la *utrofina*, y su gen, y empezaron a usar simples compuestos como fármacos para aumentar la baja cantidad de esta proteína en el tejido muscular. Tales fármacos podrían tener efectos secundarios pero debido a que son moléculas pequeñas y no proteínas, no producen problemas inmunes, y serán fáciles de entregar en la circulación sanguínea para alcanzar todos los músculos.

La utrofina es una proteína con una estructura y función muy similar a la distrofina. En seres humanos, su gen está ubicado en el cromosoma 6, tiene 75 exones, y es aproximadamente un millón de pares de bases de largo. La proteína utrofina es aproximadamente 7 % más pequeña que la distrofina. Como la distrofina, conecta la estructura F-actina en las células con el complejo de proteínas en las membranas similar al complejo asociado a la distrofina. La utrofina está presente en varios tejidos del cuerpo, también en el músculo, pero allí está concentrada en las regiones donde los nervios motores hacen contacto con las membranas del músculo, la *unión neuromuscular*.

¿Si la utrofina y la distrofina son tan similares, por qué la naturaleza no usa utrofina cuando la distrofina está faltante en los pacientes con Duchenne? Hay señales, que la naturaleza trata de hacer esto realmente. En pacientes con Duchenne, la utrofina empieza a extenderse de las uniones nervio-músculo a las membranas del músculo. Cuanta más utrofina un paciente tiene, más tarde usará una silla de ruedas. Ésa es una señal de que el aumento de la utrofina haría la distrofia Duchenne más benigna. Durante el desarrollo a las 12 semanas, los músculos tienen ambas, utrofina y distrofina, luego la utrofina desaparece de las membranas celulares, quedándose solo en las uniones neuromusculares, y en el nacimiento, la distrofina solo queda en las membranas. Por lo tanto, la utrofina es una forma fetal de la distrofina. Esto quiere decir, que si uno pudiera reactivar el programa de desarrollo para la utrofina, uno conseguiría un tratamiento para distrofia Duchenne.

Los ratones mdx cuyo gen de la utrofina fue *inactivado* experimentalmente, por lo que no tienen ni distrofina ni utrofina en sus músculos, tienen síntomas como de Duchenne y se mueren tempranamente en contraste con los ratones mdx "normales" cuyos músculos muestran un daño menos severo.

En otros experimentos con ratones mdx transgénicos que tenían mini-genes de la utrofina en su línea germinal, introducidos por una técnica que no puede ser usada en humanos, podía ser mostrado, que la utrofina, si está presente en grandes cantidades, puede reemplazar la distrofina. Incrementando la cantidad de utrofina por un factor de tres a cuatro, el desarrollo de síntomas distróficos podía ser prevenido y esto resultó en una recuperación funcional completa.

Por lo tanto, para una posible terapia para Duchenne, uno debe tratar de aumentar la baja cantidad de utrofina *aumentando* la actividad de su gen. El gen es ahora bien

conocido, pero hace 20 años, tardó dos años encontrarlo y caracterizarlo, hoy eso podría haber sido hecho en dos semanas. El gen tiene dos sitios de inicio diferentes, las secuencias de promotores, a las que compuestos señaladores se unen para iniciar la síntesis de la proteína utrofina. Un promotor induce la producción de una forma de utrofina, la forma-A, en las regiones de las uniones neuromusculares. El otro promotor empieza a hacer la otra forma, utrofina-B, en los vasos sanguíneos capilares. Una parte de la secuencia del promotor, la N-box, contiene un trecho de seis nucleótidos, TTCCGG, que al parecer es responsable de limitar la utrofina-A a las uniones músculo-nervio. Los investigadores están ahora tratando de interferir con este proceso de señalamiento con el propósito de que más forma-A de utrofina sea hecha y dirigida a las membranas de las células musculares donde posiblemente ocuparía los sitios desocupados por la distrofina en chicos con Duchenne.

Incluso antes que todos estos detalles moleculares de la biología de la utrofina fueran aclarados, el trabajo empezó a encontrar una sustancia que podía aumentar la utrofina y dirigirla apropiadamente a las membranas. Eso no podía ser hecho en un laboratorio de la universidad. Así que *Kay Davies* buscó una compañía farmacéutica que estuviera interesada en esta tarea difícil y costosa, y como no pudo encontrar una, ella misma fundó una nueva: VASTox plc. en Abington cerca de Oxford.

*Jon Tinsley* de esta compañía informó en una presentación separada que tanto ha sido hecho para encontrar un fármaco potencial para utrofina: Hasta ahora, 13,000 compuestos químicos han sido analizados para su habilidad de aumentar la actividad del gen de la utrofina en ratones mdx. La enzima productora de luz, luciferasa de las luciérnagas, fue usada en un sistema reactivo para probar la presencia de utrofina. Más de 100 sustancias prometedoras fueron encontradas que podían incrementar la baja concentración de utrofina tres a cuatro veces. Están ahora siendo optimizadas y evaluadas en cultivos de células musculares y en ratones mdx vivos con el objetivo de aumentar su eficiencia todavía más y garantizar que la utrofina es suficientemente aumentada en todos los músculos de los animales.

Uno de los compuestos más activos, el VOX185, ya ha sido probado sistémicamente en ratones por inyecciones en el abdomen. Este reacciona solo con el promotor de la forma-A de la utrofina, que está presente en el músculo. La utrofina-A en todos los músculos esqueléticos de los ratones probados pudo ser aumentada dos a tres veces, pero no es conocido aún, que tanto la utrofina en los músculos cardíacos es aumentada también. Después de 12 semanas de inyecciones sistémicas semanales, los animales mostraron una recuperación importante de su función muscular.

Este y otro compuesto activo están siendo ahora optimizados más con modificaciones químicas. Pruebas clínicas con pacientes con Duchenne están siendo preparadas ahora y podrían empezar en el 2008.

**Terapias con corticoesteroides, prueba clínica internacional:** en su segunda presentación, *Kate Bushby* habló del uso de corticoesteroides en distrofia Duchenne y la prueba clínica internacional planeada con prednisolona.

Durante cerca de los 20 años pasados, los corticoesteroides *prednisona*, la muy similar *prednisolona* y la nueva forma *deflazacort* han mostrado efectos positivos en chicos con Duchenne: El uso diario de estas medicinas con-

serva el caminar de los chicos durante varios años hasta aproximadamente mediados de la adolescencia; ellos aumentan su energía, la función y fuerza de los pacientes marcadamente, de modo que ellos puedan participar mejor en actividades sociales; reduciendo la necesidad de corrección quirúrgica de la escoliosis, la curvatura de la columna; ellos conservan significativamente la capacidad vital, la función pulmonar; ellos parecen ser cardioprotectores, significando que ellos tienen también un efecto positivo en el corazón; y los resultados más positivos han sido vistos en los chicos más jóvenes. Las dosis usuales son de 0.75 miligramos/kg /día para prednisona y prednisolona, y 0.9 miligramos/kg/día para deflazacort. Sin embargo, estos fármacos también podrían tener efectos secundarios: aumento de peso porque los fármacos pueden hacer a los chicos hambrientos y conduciendo a características Cushingoides, una cara redonda; debilitamiento de huesos con un riesgo aumentado de fracturas; cataratas, una leve opacidad de los lentes del ojo, especialmente con el deflazacort; y reducción de la altura disminuyendo la velocidad de su crecimiento.

Aunque los efectos médicos principales de los corticosteroides en otras enfermedades son una reducción de la inflamación y un efecto en el sistema inmune, esto no parece ser una explicación de por qué la prednisona, prednisolona, y deflazacort tienen efectos positivos en mejorar la fuerza en la mayoría de los chicos con distrofia muscular Duchenne. Y debido a que los efectos secundarios desaniman a muchas familias de usar estos fármacos, al menos 15 métodos de aplicación diferentes, que se supone minimizan los efectos secundarios, son usados mundialmente en los centros de salud. La Dra. Bushby ahora trabaja en este campo de los últimos 17 años, y se da cuenta de que la situación todavía es "Caótica" y que una prueba clínica grande, si es posible internacional, es necesaria para determinar de una vez por todas los detalles de un régimen de tratamiento optimizado.

Por lo tanto, en el R.U., 19 centros se han inscrito para tomar parte en el *Proyecto North-Star* que está trabajando para un consenso en el uso de estos fármacos corticoides teniendo en cuenta todos los conocimientos acumulado con los años sobre los efectos positivos y negativos a largo plazo de la prednisona y sus otras formas para mantener los músculos de chicos con Duchenne. Los resultados de esta cooperación proveerán los datos básicos para la planeada gran prueba clínica internacional que ya tiene un nombre: FOR-DMD.

Más de 50 centros en 12 países realizarán esta prueba durante los próximos años con al menos 300 chicos con Duchenne bajo la supervisión del *Grupo Directivo de Prueba del FOR-DMD* en el que participarán varios científicos y médicos internacionalmente conocidos. Los objetivos más importantes de la prueba serán: (1) Evaluar la prednisona/prednisolona diaria contra deflazacort diario contra regímenes intermitentes de prednisona/prednisolona, en la hipótesis de que la aplicación diaria sería más eficaz en el mantenimiento a largo plazo de la respiración, el tiempo para levantarse del piso, y la satisfacción del paciente; (2) determinar la tolerancia de los diferentes regímenes y sus efectos secundarios; e (3) iniciar estudios adicionales de perfilado de proteína y polimorfismo para encontrar por qué funcionan los corticoides. Los Institutos Nacionales de Salud, NIH, en EUA probablemente financiarán este estudio internacional. El Grupo Directivo archi-

vará el informe de subvención completa en el 2007 después de una reunión planeada en Holanda.

A pesar de sus efectos secundarios, todavía tienen un papel muy importante los corticoides en distrofia Duchenne. Aunque los enfoques de terapias genéticas estarán disponibles en el futuro cercano, un tratamiento optimizado con corticoides será el estándar dorado contra el que otros tratamientos pueden ser juzgados. Y debido a que los fármacos genéticos serán costosos y no fácilmente asequibles en los países en vías de desarrollo, los muchos más baratos fármacos corticoides tendrán que ser usados por muchos más años allí.

*Kate Bushby* terminó su presentación diciendo que la mayoría de los chicos tratados con prednisona mostraban un beneficio en conjunto de usar los fármacos y que la historia natural de la condición ha cambiado desde que el uso de corticosteroides se ha vuelto extendido. Junto con el cuidado ortopédico, cardíaco, y respiratorio ya disponible, el uso de corticoides en un régimen optimizado con cuidadosa atención a los posibles efectos secundarios, continuará haciendo una diferencia inmensa y positiva en la vida de los chicos con Duchenne.

**Lectura a través de los codones de parada prematuros con PTC124.** *Richard Finkel* del Hospital Infantil de Filadelfia, e Investigador Principal del estudio del PTC124, presentó los datos preliminares de los estudios Fase-IIa. En su presentación, el Dr. Finkel actualizó la información dada tres meses antes por el Dr. *Langdon Miller*, Jefe Médico Oficial de *PTC Therapeutics*, en South Plainfield, NJ, en la reunión del Parent-Project en Cincinnati. Por lo tanto, algo del siguiente resumen usa partes del texto dado en el informe sobre la reunión de Cincinnati.

Cerca del 15 % de los chicos con Duchenne tienen una mutación puntual en su gen de la distrofina que transforma un codón para un aminoácido en uno de los tres codones de parada, TGA, TAG y TAA. En el ARNm, estos codones se vuelven UGA, UAG, y UAA y causan que la síntesis de proteína se finalice prematuramente, antes que la nueva proteína, en este caso distrofina, sea completamente ensamblada. Estas mutaciones son llamadas mutaciones sin-sentido porque no conducen en la producción de una cadena de aminoácido de la proteína distrofina. Estas mutaciones son también conocidas como mutaciones de parada o codones prematuros de terminación.

El PTC124 es un fármaco oral diseñado para pasar por encima de estas mutaciones sin-sentido. Ha sido desarrollado en un programa de búsqueda de fármaco dirigido por PTC Therapeutics. Es un fármaco nuevo, primero en su clase, que no es como cualquier otro fármaco. Este ayuda a que la maquinaria celular supere una de las causas genéticas de la distrofia Duchenne, pero no es terapia génica u omisión de exón. Aunque el antibiótico gentamicina mostró actuaba de manera similar, el PTC124 no se relaciona con lo gentamicina y no es un antibiótico. El PTC124 no está todavía disponible comercialmente, todavía está bajo desarrollo en pruebas clínicas. Es un polvo blanco cristalino que es mezclado con agua, leche o jugo.

Debido a que el PTC124 se centra en la mutación sin-sentido en el ARNm, no en el gen, tiene el potencial de tratar otras enfermedades hereditarias, entre ellas la fibrosis quística. PTC Therapeutics está dirigiendo también una fase II de estudios en fibrosis quística. Dado que el efecto del PTC124 no es específico a la enfermedad, si no a la

mutación, no es solo un fármaco potencial para distrofia Duchenne, si no un fármaco potencial para todos los trastornos genéticos por una mutación sin-sentido.

Solamente aquel 15 % de los chicos con Duchenne que tienen el desorden por una mutación sin-sentido pueden potencialmente beneficiarse del tratamiento con PTC124. Por lo tanto, es necesario saber la mutación exacta de un chico con Duchenne con el fin de determinar si es una mutación sin-sentido. Solo cuando eso es verdad, el PTC124 podría ser un fármaco para él.

Para determinar si el PTC124 podía ser un fármaco para Duchenne, experimentos preclínicos fueron hechos en cultivos de células y ratones mdx. Distrofina de largo completo apareció en animales vivos después de la dosis oral, con un efecto positivo en la resistencia de la fibra muscular para el daño inducido por estiramiento. En experimentos hechos en ratas y perros, ninguna lectura a través de los codones de parada normales fue detectada. Los estudios de toxicidad en ratas y perros dándoles altas dosis del fármaco no han mostrado generalmente serios efectos secundarios agudos. Estos datos mostraban que pruebas clínicas en pacientes con Duchenne estaban justificadas.

En la primera prueba clínica del PTC124, dos fases-I de pruebas fueron realizadas en 61 voluntarios adultos sanos de 18 a 30 años de edad. En estos estudios, el fármaco parece ser seguro y demostró pocos efectos secundarios. Dosis de hasta 100 mg/kg/día fueron bien toleradas por estos adultos sanos, una dosis que es más grande que la planeada a ser dada a chicos con Duchenne. Estos resultados respaldaron la iniciación de una prueba clínica de 2da fase.

La parte inicial de esta fase-IIa prueba clínica en 26 chicos con Duchenne, entre 5-13 años de edad, ha sido ahora terminada. Seis chicos recibieron una dosis de 16 mg/kg/día y los otros 20 chicos 40 mg/kg/día del fármaco en tres porciones por día. Tenían mutaciones de parada diferentes: 19 tenían el codón de parada UGA, 5 el UAG, y 2 el UAA, distribuidos entre los exones 6 a 70. Los pacientes fueron valorados clínicamente por más de 21 días antes del tratamiento, entonces recibieron el fármaco diariamente durante 28 días y finalmente exámenes de seguimiento después durante 28 días adicionales. Las biopsias de músculo fueron realizadas antes y después del tratamiento en los *extensor digitorum brevis*, EDB, músculos del pie para buscar la restauración parcial de la producción de distrofina de largo completo. Otras pruebas químicas y funcionales también fueron hechas para medir el efecto terapéutico y monitorear la seguridad.

Los datos muy preliminares mostraban que en el cultivo de células musculares obtenidas del material de la biopsia inicial, luego expuesta directamente al PTC124, distrofina de largo normal esperada fue detectada. Las biopsias musculares realizadas después de tomar el fármaco durante 28 días, mostraban un leve aumento visible de distrofina en algunos de los chicos. En este estudio, como antes en la fase-I de prueba, ningunos efectos secundarios serios fueron observados. Pero el nivel de la nueva distrofina todavía era demasiado bajo para causar un suficiente y confiable efecto terapéutico. Sin embargo, algunos padres y profesores observaron que, después del tratamiento, los chicos mostraron mayores actividades, aumento de resistencia, y menos fatiga que antes del tratamiento. Éstos no son realmente resultados científicos, tienen que ser valorados en más detalle.

Una de las razones por la que la nueva distrofina no fue encontrada en todos los chicos podría ser que la concentración de PTC124 en la sangre estaba debajo del rango de concentración esperado de 2 a 10 microgramo/ml de plasma, debido a una posible degradación más rápida del fármaco en niños comparada con adultos. La exposición más larga del fármaco podría ser también necesaria para conseguir mejor expresión de distrofina. Por lo tanto, la 2da Fase de prueba ha sido modificada para reclutar a 12 chicos con Duchenne adicionales, que recibirán 80/kg/día de PTC 124 durante 28 días, buscando una concentración de al menos 2 a 10 microgramos/ml de plasma sanguíneo. Los datos finales serán informados en el 2007. PTC Therapeutics planea iniciar estudios a mayor plazo durante tres a seis meses a fines del 2007.

**Aumento del IGF-1:** *Nadia Rosenthal* del Laboratorio de Biología Molecular Europeo en Monterotondo cerca de Roma, describió la influencia del factor de crecimiento natural IGF-1 en los músculos y el papel que podría tener como un agente terapéutico para chicos con distrofia muscular Duchenne.

El IGF-1, factor de crecimiento similar a la insulina, es una proteína de aproximadamente 70 aminoácidos en una cadena con tres puentes estabilizadores, con una forma similar a la insulina. Existe en múltiples formas con estructuras ligeramente diferentes. Los efectos de algunas de estas formas diferentes dependen en gran parte de donde son producidas en el cuerpo. Una de estas también llamadas isoformas, la mIGF-1, que promueve el crecimiento de células en el tejido muscular, es de interés para un posible uso terapéutico en chicos con Duchenne.

El mIGF-1 promueve la regeneración muscular muy bien y ayuda a formar músculo funcional porque activa la síntesis de nueva proteína. El daño local de músculo resulta en un estallido de producción de mIGF-1, por lo tanto, es un buen candidato para una combinación con otras posibles terapias para Duchenne. Podría mantener los músculos en buena forma mientras el daño genético está siendo arreglado por técnicas genéticas.

Para responder a la pregunta de qué ocurriría cuando la cantidad de mIGF-1 en los músculos es incrementada encima del nivel normal, ratones transgénicos "normales" fueron creados, que no tenían distrofia pero tenían genes de IGF-1 adicionales en los núcleos de sus células musculares. Estos ratones *no-distróficos* con concentraciones altas de mIGF-1 mostraban una fuerte hipertrofia muscular, fibras agrandadas, después de 14 meses. Algunos otros efectos eran una disminución de la grasa, mantenimiento ampliado de la masa y fuerza muscular en animales viejos, y una acelerada curación del daño muscular. El mIGF-1 adicional no produjo problemas cardíacos, no promovió el cáncer, y no tenía ningunos efectos secundarios patológicos. Ratones mdx *distróficos*, también transgénicos con genes adicionales de IGF-1 fueron producidos, mostrando reducción de la inflamación y fibrosis, y una muy reducida degeneración muscular. Por lo tanto, el mIGF-1 mejora el ambiente local para la regeneración muscular eficiente.

La cuestión era ahora, que tanto una de la otras isoformas del IGF1 trabaja mejor que el mIGF-1. La secuencia de codificación del IGF-1 es relativamente pequeña, sus pocos que exones se reacomodan al crearse su ARNm por empalmado alternativo, produciendo péptidos de diferente extensión (E). La isoforma del mIGF-1 contiene una vari-

ante Ea, que está principalmente activa en el músculo esquelético y cardíaco. Ea significa que esta forma tiene una extensión de péptido de señalización de aproximadamente 35 aminoácidos adicionales. Un estudiante en el equipo de la Dra. Rosenthal trabajó tres años, para hacer animales transgénicos con cada una de las cuatro isoformas más importantes. Solamente las formas con el péptido EA adicional, aumentaron la masa muscular y promovieron fuertemente la regeneración. Las pruebas con las isoformas que contenían otros péptidos E, mostraban que solamente mejoraban la regeneración. Eso significa, uno tenía que inducir un aumento de masa muscular para poder mejorar y mantener la regeneración muscular. Los péptidos E son muy importantes para la regeneración mediada por el IGF-1 - una forma artificial que carecía de un péptido E no tenía ningún efecto benéfico sobre el músculo.

Así que el sistema de regulación muscular, en que el IGF-1 participa, es mucho más complicado de lo que originalmente se creía. Posiblemente hay proteínas así llamadas de unión en el exterior de la célula muscular que estabiliza el mIGF-1. Si el péptido EA está presente, el mIGF-1 promueve el crecimiento de la masa muscular y su regeneración. Si el péptido EA está ausente, entonces todavía hay regeneración pero no aumento de la masa muscular. Sin embargo, los detalles de este proceso todavía no son totalmente comprendidos. Sin embargo, el completo conocimiento del mecanismo de acción será sumamente importante antes de que el IGF-1 pueda volverse un fármaco terapéutico para niños con distrofia Duchenne.

Pero será siempre una terapia adjunta, porque no está actuando en la causa genética de la enfermedad. Uno tendrá probablemente que combinar la terapia de factor de crecimiento con células madre, AONs, inhibidores de miostatina, u otras moléculas pequeñas. Si uno pudiera sintetizar el mIGF-1 en el laboratorio con un péptido EA estable, eso podría resultar en un enfoque terapéutico apropiado. Idealmente, la entrega de esta forma más eficaz en los músculos podría ser conseguida sin tener que transferir su gen, es decir sin procedimientos genéticos. Sólo inyectar el compuesto purificado en la circulación sanguínea o directamente en los músculos, o comer una mezcla indeterminada de las diferentes formas como se ofrece en Internet, será inefectivo o incluso peligroso.

Una entrevista con *Nadia Rosenthal* sobre la esperanza que los padres no deben perder mientras esperan una terapia genética, puede ser vista en mi informe de la reunión en Mónaco en enero del 2005 en mis páginas de Internet [www.duchenne-research.com](http://www.duchenne-research.com).

**Inhibición de la miostatina:** Este resumen empieza con una introducción del conocimiento previo sustancial sobre la naturaleza y acción de la miostatina - como se describió en mis informes anteriores - y luego resumiré el nuevo trabajo hecho por *Ian Graham* en el laboratorio de *George Dickson* en el Centro para Ciencias Biomédicas, Royal Holloway, de la Universidad de Londres.

La *miostatina* es producida en el músculo y otros órganos y circula en la sangre como una proteína inactiva constando de 375 aminoácidos. Para volverse biológicamente activa, los primeros 266 aminoácidos, llamado 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 retirado

y degradado rápidamente cuando el complejo se une a su receptor *activina* en el exterior de la membrana de la célula muscular. Este complejo de *miostatina-activina* entonces inicia en el otro lado de la membrana, dentro de la célula, una serie de reacciones químicas, una cascada de señales, que finalmente interrumpen la regulación genética que de otra forma resultaría en la biosíntesis de nuevas proteínas musculares. Por lo tanto este proceso impide el crecimiento muscular. Así que inactivando la miostatina, la regeneración de las fibras musculares de chicos con Duchenne podría posiblemente ser estimulada con el fin de que no sean destruidas tan rápido o podrían aumentar incluso de tamaño.

Ratones no-distróficos cuyo gen para miostatina fue desactivado por métodos genéticos, tuvieron músculos esqueléticos hasta tres veces más grandes, con significativamente más fibras de un diámetro mayor de lo normal, han tenido una *hipertrofia*. Hay un ganado vacuno, la *Raza Azul Belga*, que es muy musculosa porque su gen de la miostatina fue desactivado por una mutación hace siglos. Y en Berlín, un niño de ahora 8 años de edad fue identificado cuyos músculos esqueléticos son cerca de dos veces más grandes que en un niño normal. Debido a que una mutación en esta familia ha cambiado el normal empalmado de los tres exones de la miostatina, el niño tiene un muy bajo nivel de miostatina en sus músculos. Ésta es una indicación poderosa de que la inactivación de la miostatina resultaría en un aumento del crecimiento muscular en niños con Duchenne también.

La compañía *Wyeth Research* en Collegeville cerca de Filadelfia desarrolló un anticuerpo específico, el MYO-029, contra la miostatina que había sido demostrado en estudios animales incrementaba significativamente la masa muscular. En seres humanos, no causa rechazo inmune porque la estructura de proteína del anticuerpo es una humana, esta "humanizado". Este puede ser inyectado en la circulación o bajo la piel. En cooperación con *Kathryn Wagner* en Baltimore y *Lee Sweeney* en Filadelfia, Wyeth ahora ha probado en una fase I/II de prueba clínica este fármaco de anticuerpos potencial en 108 pacientes con enfermedad muscular adulta, entre ellos algunos pacientes de Becker. La prueba está ahora completa, los resultados, que parecen ser positivos, serán publicados en la primavera del 2007.

*George Dickson* y sus colegas, en colaboración con Wyeth han iniciado otro acercamiento para inhibir la miostatina. Después de que el propéptido es liberado cuando la parte activa de la miostatina se une al receptor, esta cadena aislada de 266 aminoácidos es inestable, es degradada en el flujo sanguíneo con una vida media de solo dos horas. Los científicos entonces tuvieron la idea de transferir el gen para el propéptido en los músculos, con el objetivo de mantener permanentemente en un nivel alto este inhibidor natural de la acción de la miostatina. Probaron este acercamiento con ratones normales y descubrieron que el mejor vector por esta transferencia génica era el virus adeno-asociado tipo-8, AAV8, que puede contagiarse células musculares que no se dividen. Después de la inyección local de la construcción del vector en el músculo tibialis anterior de estos ratones no-distróficos, obtuvieron un aumento de masa muscular de 30 % a las 4 semanas, el cuál subió a 40 % a las 10 semanas. La inyección sistémica en la circulación sanguínea incrementó la masa en los mismos ratones normales un 25 %, y este aumento fue mantenido durante 10



semanas. La fuerza muscular también fue mejorada, incluso en las fibras musculares lentas. Si estos resultados pudieran ser reproducidos en chicos con Duchenne, este método mantendría el caminar más tiempo.

Todos estos resultados fueron obtenidos en experimentos preliminares con ratones normales. Tienen que ser ahora repetidos con ratones mdx. Pruebas clínicas con pacientes podrían seguir si los resultados con ratones y otros animales continúan siendo positivos. Sin embargo, una terapia inhibitoria de miostatina no podría influir en la causa genética de la enfermedad, pero podría probablemente, en combinación con tratamientos genéticos más básicos como la transferencia del gen de la distrofina y omisión de exón, aumentar sus efectos terapéuticos.

**SNT-MC17/idebenona en desarrollo clínico:** *Thomas Meier*, Jefe Científico Oficial en Santhera Pharmaceuticals en Liestal cerca de Basilea, no pudo venir a la reunión en Londres. El envió el siguiente resumen:

El SNT-MC17/idebenona es una molécula que protege las mitocondrias, las centrales de energía en las células donde el portador universal de energía, el adenosin trifosfato, ATP, es hecho por fosforilación oxidativa. Este compuesto SNT-MC17, o *idebenona*, ha completado recientemente con éxito una prueba clínica en EUA en colaboración con los NIH, demostrando eficacia en los aspectos neurológicos de la Ataxia de Friedreich, otra enfermedad neuromuscular devastadora. Una fase-III de prueba clínica para Ataxia de Friedreich ya está en curso en Europa. La Ataxia de Friedreich es una enfermedad neuromuscular rara que junto con los síntomas neurológicos es frecuentemente asociada con cardiomiopatía, una enfermedad grave del músculo del corazón.

El SNT-MC17/idebenona es un potente antioxidante con una estructura química obtenida de la coenzima Q10 natural. La estructura química optimizada tiene una mucho más corta y diferente cadena lateral que resulta en que un perfil farmacocinético mejorado que permite que la molécula entre más fácilmente en las células musculares que la coenzima Q10. El SNT-MC17/idebenona también ha demostrado facilita la producción de ATP en las mitocondrias. Puede ser dado de forma oral como una pastilla.

La ausencia de distrofina también afecta la fosforilación oxidativa negativamente en las mitocondrias de los músculos del corazón de los pacientes con Duchenne, y probablemente en sus músculos esqueléticos también. Una fase-IIa de prueba clínica bajo el método doble-ciego controlado por placebo con SNT-MC17/idebenona está actualmente en marcha en Bélgica bajo el liderazgo del Dr. *Gunnar Buyse*. El estudio ha reclutado en total a 21 chicos con Duchenne entre 8 a 16 años de edad. El objetivo principal es determinar el efecto del SNT-MC17/idebenona sobre la función muscular del corazón. Varias pruebas diferentes adicionales serán realizadas para detectar un posible beneficio funcional sobre la fuerza muscular en chicos con Duchenne tratados con SNT-MC17/idebenona. Los chicos están recibiendo la medicación del estudio tres veces al día en forma de pastillas que contienen 150mg de SNT-MC17/idebenona o placebo por 12 meses.

Esta prueba es llamada Estudio de Eficacia en Duchenne en Protocolo a Largo Plazo de Dosis Elevada de Idebenona, DELPHI abreviado en inglés. Sus resultados estarán disponibles en la segunda mitad del 2007.

**Prueba clínica con prednisona y ciclosporina:** Bajo la dirección de *Rudolf Korinthenberg* en el Hospital Infantil de la Universidad de Freiburg, que no estaba en Londres, se está realizando una prueba clínica con prednisona y ciclosporina en Alemania.

Actualmente los dos preparados de cortisona, prednisona y deflazacort, son los únicos fármacos que se sabe causan una mejora notable en chicos con distrofia Duchenne. Pero el tratamiento de prednisona tiene efectos secundarios. Por lo tanto, algunos médicos en varios centros musculares alemanes han decidido reducir la dosis total de prednisona, dando una dosis normal no de forma constante, sino solamente 10 días seguidos y luego interrumpen el tratamiento durante 10 días, con el propósito de tener un efecto protector pero evitando por lo menos algo los efectos secundarios. Sin embargo, se noto que el efecto terapéutico era algo más pequeño que cuando la prednisona es dada constante y diariamente. Para mejorar esta situación, fue sugerido combinar el tratamiento de prednisona con ciclosporina. La ciclosporina es un fármaco que reduce las reacciones inmunes. Esta tiene un mecanismo de acción diferente al de la cortisona. También tiene efectos secundarios, pero durante un tratamiento a largo plazo, son algo más favorables que los de la prednisona.

La prueba clínica con los dos fármacos empezó en Alemania a principios del 2004, en la que una mitad de los pacientes recibieron 3.5 - 4 mg/kg/día de ciclosporina combinada con 0.75 mg/kg/día prednisona, y la otra mitad la misma dosis de prednisona pero sola. Cada paciente participa en el estudio por 15 meses. Por el momento, en enero del 2007, 150 pacientes están siendo tratados o ya han terminado su tratamiento. Algunos más serán añadidos durante febrero. Un mínimo de 150 pacientes fueron necesitados para evaluar el estudio correctamente. El estudio continuará a través del 2007 y parte del 2008 para que los resultados puedan ser analizados el próximo año.

Ningunos resultados de los efectos combinados de ciclosporina y prednisona están aún disponibles, porque la prueba es un estudio doble-ciego, p.e., ni los pacientes ni los científicos saben si un chico en especial ha recibido ciclosporina o un placebo, una sustancia neutral, junto a la prednisona. Pero podemos decir que el estudio está funcionando muy bien y que ningunos efectos secundarios severos han aparecido. De los 150 pacientes, solamente dos tuvieron que dejar el estudio, uno, porque perdió la ambulación relativamente pronto, y el otro, porque manifestó una diabetes que no habíamos descubierto antes de su reclutamiento.

**Estrés oxidativo y distrofia Duchenne:** *Joe McCord* de la Universidad de Colorado y la compañía *LifeVantage Corp.* en Denver habló de una nueva forma de control terapéutico del estrés de oxidativo. El estrés oxidativo es un componente importante de más de 100 enfermedades, entre ellas distrofia Duchenne.

Cada célula, también cada célula muscular, contiene muchas mitocondrias. Estos son organelos de forma oval típicamente de 0.002 mm de longitud y 0.0005 mm de diámetro, del tamaño de una bacteria. Son las centrales de energía de la célula porque sintetizan el compuesto rico en energía adenosin trifosfato, ATP, por el proceso de fosforilación oxidativa. Los productos finales de esta producción de energía son dióxido de carbono y agua. Pero cerca de 1-2 % del oxígeno consumido no es convertido en agua,

sino en el *radical libre superóxido*. Tiene un número impar de electrones que lo hace especialmente reactivo. La célula se defiende contra este producto tóxico con dos muy eficientes enzimas. Una es la *superóxido dismutasa*, SOD, que convierte al radical en peróxido de hidrógeno, que es menos reactivo pero todavía es un oxidante. La otra enzima es la *catalasa*, que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, que son totalmente no tóxicos.

Cuando la producción de los radicales de superóxido sobrepasa el límite normal de 2%, las células experimentan un *estrés oxidativo*. Esto ocurre cualquier vez que una célula es dañada. Las células musculares se vuelven distróficas cuando grandes cantidades de iones de calcio entran a través de la membrana celular hacia el interior donde causan que las mitocondrias se hinchen, alterándolas, con la consecuencia de que más radicales de superóxido de lo normal sean hechos, más de los que la célula puede destruir. Este exceso de radicales puede oxidar lípidos, oxidar proteínas, modificar enzimas, dañar el ADN y causar incluso cáncer. Estos también colaboran en el proceso de envejecimiento.

Otra fuente de estrés oxidativo es la inflamación. Los glóbulos blancos son las únicas células que hacen radicales libres intencionalmente para matar y digerir microbios y virus invasores. Pero este proceso también daña las células del anfitrión, y causa que las células musculares derramen proteínas en la circulación sanguínea, por ejemplo, creatina kinasa. La inflamación también cambia los procesos señalización y podría causar apoptosis, la destrucción de sí mismas de las células. También la fibrosis es disparada por el estrés oxidativo, la formación de tejido cicatrizante en enfermedades con inflamación crónica, entre ellas la distrofia Duchenne donde tejido muscular elástico es reemplazado por tejido conectivo inflexible.

Hace veinte años, fue descubierto que los productos más habituales del estrés oxidativo, los lípidos peroxidados, están aumentados un promedio de 35 % en chicos con Duchenne. Solamente hasta muy recientemente, era imposible restituir el balance oxidativo cuando, en el 2006, *Werner Boecker* y sus colegas en Alemania mostraron que en los pacientes con Duchenne y Becker, las fibras musculares y la vasculatura, los vasos sanguíneos, pasan por un masivo estrés oxidativo resultando en una reducción del bioactivo óxido nítrico, ON, un radical libre "bueno". Esta hormona gaseosa es producida por la enzima ON sintasa, ONS, y regula, entre otros procesos, la elasticidad de los vasos sanguíneos, el tono vascular. La enzima ONS esta aumentada en el tejido muscular que trata de normalizar la cantidad de ON, pero este proceso es insuficiente debido a la degeneración muscular, y también porque el ON reacciona con los radicales de superóxido. El producto de esta reacción es el peroxinitrito, ONOO<sup>-</sup>, otro oxidante reactivo que intensifica el estrés oxidativo.

En los más tempranos experimentos de laboratorio, fue mostrado que la adición de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa a corazones perfundidos aislados, podía bloquear el estrés oxidativo destruyendo el exceso de radicales libres y prevenir el derrame de la enzima creatina kinasa. En otros estudios, la superóxido dismutasa demostró reducía los niveles elevados de la proteína del factor

TGF-beta que es una señal para que los fibroblastos causen fibrosis.

Los músculos de los chicos con Duchenne funcionan relativamente bien hasta aproximadamente los tres años de edad. Después de ese momento, las consecuencias del estrés oxidativo superan más y más la regeneración muscular normal. Estas consecuencias son inflamación crónica, fibrosis y también disfunción cognitiva. Para una terapia para distrofia Duchenne, debería ser importante interrumpir estos procesos en esta edad o antes.

Se creía que una manera fácil de hacer esto sería la ingestión de antioxidantes conocidos, vitaminas E y C. Pero ha sido mostrado en muchos estudios, que cantidades grandes de estas vitaminas no tienen un efecto sobre el estrés oxidativo. También comer 600 gramos de frutas y verduras al día no tenía ningún efecto sobre el daño oxidativo del ADN. Las vitaminas "antioxidantes" son importantes por otras razones, pero no reducen el estrés oxidativo. La otra posibilidad es incrementar el nivel de las dos enzimas superóxido dismutasa y catalasa que, como se menciona, pueden destruir la cantidad excesiva de radicales libres. Después de todo, una molécula de vitamina C puede eliminar dos moléculas de radicales libres, pero no más, mientras que una molécula de superóxido dismutasa puede eliminar un millón de radicales libres cada segundo y mantener esta actividad por mucho tiempo.

Por lo tanto, el Dr. McCord con la compañía LifeVantage desarrolló un suplemento dietario conteniendo compuestos "adaptogénicos" de cinco especies de planta para inducir eficazmente que las dos enzimas antioxidantes reduzcan el estrés oxidativo, principalmente la peroxidación de lípidos. Este suplemento de nombre comercial *Protandim*®, contiene extractos de las plantas *Bacopa monnieri*, *Silibum marianum* o cardo lechero, *Withania somnifera* también conocida como ashwagandha, *Curcuma longa* de la cual deriva la especie cúrcuma, y *Camellia sinensis* o té verde. La última suministra uno de los ingredientes activos del té verde, (-)-epigallocatechin gallate o EGCG, que había sido mostrado antes por *Urs Rüegg* en Ginebra tenía un efecto beneficioso en distrofia Duchenne.

En el 2006, *Protandim* fue probado clínicamente en 29 personas sanas en una edad entre 20 a 78 años. Varios parámetros fueron medidos al principio del estudio y después de 30 y 120 días de suplementación diaria con *protandim*, entre ellos la superóxido dismutasa y catalasa. El aumento medio después de 120 días era de 30% para superóxido dismutasa y 54% para catalasa, y la peroxidación de lípidos estaba significativamente inhibida. Importante para el aumento relacionado con la edad del estrés oxidativo fue el hecho que después de 30 días con *Protandim*, el aumento relacionado con la edad de la peroxidación de lípidos desapareció prácticamente, y su nivel medio cayó un 40%.

En conclusión: Mientras la distrofia muscular Duchenne es causada por un defecto genético específico, hay pruebas abundantes de que el estrés oxidativo se vuelve un factor cada vez más importante en la evolución de la enfermedad. Los nuevos desarrollos en un manejo eficaz del estrés oxidativo justifican la consideración inmediata de pruebas clínicas con pacientes con Duchenne.

## Diagnósticos y registro.

**¿Por qué debe uno hacer pruebas de las variaciones, las mutaciones, en el gen de la distrofina?** *Stephen Abbs* es el Director del laboratorio de ADN del Hospital Guy en Londres. La cuestión en el título de su presentación es prácticamente la misma usada por *Kevin Flanigan* en la reunión del PPM en Cincinnati en julio del 2006. Por lo tanto, el primer párrafo y la descripción del método MLPA son casi los mismos de los del resumen de la presentación de Kevin Flanigan en el informe sobre la reunión de Cincinnati:

La mutación exacta de un chico que parece tener distrofia Duchenne debe ser conocida para confirmar que tiene realmente distrofia Duchenne, y no alguna otra enfermedad muscular, p.e., una de las muchas distrofias de cinturas (Anillo Óseo) que pueden mostrar síntomas similares a Duchenne. Este principio es el mismo usado hace 20 años, cuando roturas de cromosoma y deleciones, supresiones, en una región particular del brazo corto del cromosoma X, fueron encontradas en pacientes con distrofia muscular Duchenne y no en individuos no-afectados. Esto era evidencia de que estas variantes causaban la distrofia muscular y permitió que *Louis Kunkel* y sus colegas identificaran y caracterizaran el gen de la distrofina.

Este mismo principio es ahora aplicado a pacientes individuales, ya que si uno puede identificar una variante patogénica en el gen de la distrofina, esto ahora confirma el diagnóstico clínico de distrofia muscular Duchenne o Becker. El tipo de mutación no siempre distingue correctamente la distrofia muscular Duchenne de la Becker. Pero si la mutación muestra que el marco de lectura de la distrofina está cambiado, es mucho más probable sea distrofia muscular Duchenne. Entonces, en la mayoría de los casos, una biopsia de músculo puede ser evitada. Igualmente importante, saber la mutación exacta permite el asesoramiento genético confiable de la familia del niño y sus parientes maternos, entre ellos las portadoras genéticas de Duchenne pueden ser detectadas. Además, las diagnósticos prenatales y preimplantación son solamente posibles cuando sabemos qué gen es el responsable del desorden. La única manera de confirmar esto es identificando la mutación exacta en la familia. Finalmente, las nuevas terapias, como los métodos de omisión de exón y los fármacos de lectura a través del codón parada requieren conocer la mutación específica dentro del gen de la distrofina del paciente.

Cerca del 60% de las mutaciones de la distrofina son deleciones o supresiones de exones enteros, cerca del 10 % son duplicaciones de exones enteros, cerca del 30 % son mutaciones puntuales que involucran el cambio de solamente 1 a 4 nucleótidos, y cerca del 1 % son reversiones, complejos reordenamientos, o mutaciones profundas en los intrones.

Para detectar las deleciones y duplicaciones, la técnica analítica ahora ampliamente usada es el método de *amplificación múltiplex con sonda dependiente de ligado*, MLPA, desarrollado hace algunos años por el Dr. *Jan Schouten* de la compañía *MRC-Holanda* en Ámsterdam. Para dar una descripción muy breve del procedimiento: 158 oligodesoxirribonucleótidos con secuencias especialmente diseñadas para unirse en dos sitios de cada uno de los 79 exones de la distrofina son usados. Si un exón está presente, los dos nucleótidos diseñados para su secuencia en

especial se unirán en dos sitios y entonces son conectados, ligados, unos con otros. Los nucleótidos ligados sirven como una plantilla para la amplificación con PCR, un método de multiplicación. El producto amplificado puede entonces ser leído después de la separación por electroforesis como picos en una gráfica. Si un exón en especial no está presente porque está eliminado, los dos nucleótidos para este exón no pueden unirse a la secuencia del exón y por lo tanto no pueden reunirse entre sí, así que el pico máximo correspondiente está faltante en la gráfica.

Esta técnica detecta las deleciones y las duplicaciones de todos los 79 exones del gen de la distrofina en pacientes con Duchenne, pero no detecta mutaciones puntuales. Pero porque es un método cuantitativo, deleciones y duplicaciones también pueden ser detectadas fiablemente en sólo uno de los dos genes de la distrofina de mujeres portadoras con Duchenne, incluso si la deleción o duplicación en el paciente emparentado es desconocida. Ésta es una de las ventajas más importantes del uso extendido de este método.

Si ninguna mutación puede ser encontrada con la prueba MLPA, el paciente tiene probablemente una mutación puntual, que involucra sólo uno o algunos de los dos y medio millones de nucleótidos en el gen. Hay dos enfoques generales para identificar estas mutaciones. Uno es realizar un análisis preliminar en todos los 79 exones, para buscar cualesquiera exones que indiquen resultados diferentes comparado con los resultados normales, y entonces sólo los exones que muestren cualquier diferencia pueden ser secuenciados para encontrar si la causa de la diferencia es una variación normal dentro del gen, un polimorfismo que no causa enfermedad, o si es la mutación que causa distrofia muscular. El método alternativo es secuenciar todos los 79 exones a la vez, que es un enfoque más costoso.

Debido a que el gen es tan grande, muchos métodos para analizar los exones han sido desarrollados. El Dr. Abbs menciona 9 diferentes. Uno que ha sido más usado en su laboratorio fue desarrollado por su colega *Emma Ashton*, y es llamado *electroforesis capilar sensitiva por conformación múltiplex fluorescente*, FM-CSCE. Un proceso similar está ahora siendo desarrollado en el hospital de Guy por *Annabel Whibley* y es llamado *electroforesis capilar de gradiente de temperatura*, TGCE. Los instrumentos para el desarrollo del método TGCE fueron financiados por el Departamento de Salud del R.U. para acelerar la evaluación genética en el R.U.

El método de FM-CSCE usa 12 sondas múltiplex fluorescentes de PCR que amplifican 84 fragmentos de ADN que representan todos los 79 exones. Entonces los productos del PCR del ADN del paciente son mezclados con los productos del PCR correspondientes del ADN de un individuo no-afectado para generar dúplex, una pareja. En la mayoría de los casos, el ADN del paciente será el mismo del ADN normal, así que ambas cadenas de ADN apareadas de tal dúplex tienen la misma estructura; son *homoduplexes*. Si la cadena que viene del paciente tiene una mutación puntual, las secuencias de nucleótidos en este dúplex no concordarían completamente y el dúplex de ADN tendrá una protuberancia en ese sitio; sería un *heteroduplex* y emigrará a una velocidad diferente en una electroforesis comparado con un *homoduplex*. Esta migración diferente permite que los heteroduplexes sean identifica-

dos, y cualquier exón del ADN de un paciente que resulta en tal heteroduplex puede ser entonces secuenciado para determinar el cambio que está causando el heteroduplex. El cambio en la secuencia entonces tiene que ser interpretado para determinar si es la mutación que causa la distrofia muscular, o si es una diferencia normal, un polimorfismo.

Si ni deleciones, ni duplicaciones, ni mutaciones puntuales son encontradas en un chico con típicos síntomas de Duchenne, entonces podría tener una mutación que es difícil de identificar y puede involucrar un complejo reordenamiento, una reversión, o tal vez una mutación en uno de los intrones del gen. Estas clases de mutaciones, que se piensa están presentes en aproximadamente el 1 % de pacientes con DMD, no serán generalmente detectadas en el ADN, y el ARN debe ser usado para detectarlas. Para encontrar estas raras mutaciones en el gen de la distrofina, su ARNm tiene que ser aislado del material de la biopsia e investigado. *Steve Abbs* mencionó un ejemplo donde un nuevo exón con 71 nucleótidos estaba insertado entre los exones normales 44 y 45 porque el gen tenía una mutación puntual lejana dentro del intrón 44 que, con sus 250,000 nucleótidos, es uno de los más grandes intrones del gen de la distrofina. Esta mutación estaba ubicada cerca de 9,000 nucleótidos separada del exón 45, y debido a que el análisis estándar de mutaciones del ADN puede solo eficazmente incluir aproximadamente 50 nucleótidos de los intrones a cada lado de los exones, el método de FM-CSCE no encontró esta mutación inusual en el ADN del gen.

El Dr. Abbs habló también de un nuevo enfoque para diagnóstico genética preimplantación, PGD, desarrollado en su laboratorio, llamado *haploescritura genética preimplantación*, PGH. La diagnóstico genética preimplantación, autorizada en el R.U. por la Autoridad de Fecundación Humana y Embriología, HFEA, es un método donde una sola célula es retirada de embriones después de la fecundación artificial, y evaluada para excluir embriones afectados antes de su implantación en el útero.

El enfoque PGH para PGD implica analizar los embriones para varios marcadores genéticos polimorficos en el gen de la distrofina para determinar qué genes paternos han sido heredados. Este método puede ser aplicado a todas las familias, sin tener que desarrollar pruebas específicas para las diferentes mutaciones presentes en las familias individuales. Un ejemplo fue presentado donde 8 embriones fueron evaluados de la madre, quien tenía una deleción de los exones 12 a 16 de la distrofina. El análisis PGH mostraba que 7 de los embriones habían heredado el gen de la distrofina materno normal y fue predicho que eran 4 mujeres y 3 varones no-afectados, pero un embrión femenino había heredado el cromosoma-X mutado de la madre portadora y por lo tanto se desarrollara en una niña portadora.

Este ejemplo indica el valor de la PGH en permitir a los padres asegurarse que su próximo niño no es un chico afectado de Duchenne, ni una niña portadora de Duchenne. Aunque la prueba de PGH no implicaba actualmente analizar los embriones para la deleción de los exones 12 a 16 del gene de la distrofina, todavía era esencial saber la mutación en esta familia, en otras palabras el análisis PGH podía haber estado buscando el gen equivocado en los embriones.

El Dr. Abbs termino su presentación diciendo que estas

herramientas diagnósticas modernas están ahora resultando en las diagnosis precisas del 98 % de los chicos con síntomas clínicos de Duchenne, y del 93 % de los chicos con síntomas de Becker. Los chicos restantes probablemente tienen otras enfermedades neuromusculares, y en aproximadamente la mitad de esos casos una mutación del gen FKRP es encontrada, que resulta en una distrofia muscular congénita.

**Registro Duchenne: Robin Sharp** que tiene un chico con Duchenne y es especialista de computadoras del PPUK, describió en detalle el nuevo registro en línea que el Parent Project ha fundado con el objetivo de coleccionar todos los datos diagnósticos y clínicos, de tantos pacientes como sea posible con Duchenne y Becker en el Reino Unido. Este registro tendrá importantes beneficios para los pacientes, sus familias, sus médicos y otros cuidadores, y también para los investigadores que están trabajando en el desarrollo de tratamientos eficaces.

Los beneficios para los pacientes y sus familias son: (1) Tendrán acceso inmediato a la información más actualizada disponible sobre el manejo y procedimientos médicos, con el fin que los pacientes puedan ser mantenidos en el mejor estado posible de salud. (2) Los investigadores tendrán acceso a los datos de un gran número de pacientes, lo que facilitará proyectos de investigación en curso y apoyar el establecimiento de nuevos proyectos en interés de los pacientes. (3) El registro exigirá que todos los datos de un paciente sean registrados y asegurará que los métodos más modernos sean usados, para obtenerlos. (4) La inclusión de los detalles moleculares completos de la mutación será importante para la participación en las pruebas clínicas, y más tarde para la terapia más eficaz.

Los médicos se beneficiarán de la siguiente manera: (1) Tendrán acceso controlado de todos los datos de sus pacientes. (2) El registro suministrará información del tratamiento más eficaz para un paciente individual y por lo tanto, hará óptimo el cuidado y la orientación del paciente. (3) El medico puede sugerir la participación en las pruebas clínicas apropiadas y acompañar al paciente durante la prueba. (4) Así, el medico especializado o incluso el médico familiar puede mantener un papel principal en la atención de su paciente.

Los investigadores también tendrán algunas ventajas: (1) Será fácil reclutar a pacientes con el tipo más adecuado de mutación para pruebas clínicas. (2) También tendrán acceso a un gran número de datos del paciente. (3) Estimulará y mejorará proyectos de investigación, y (4) hará las aplicaciones de subvenciones más eficaces.

Para tener introducidos los datos de un paciente en el registro, la familia debe pedir a la oficina del Parent Project del R.U. que le envíe un formulario. Este también puede ser obtenido en Internet: [www.dmdregistry.org](http://www.dmdregistry.org). Los padres o el paciente mismo llenan toda la información en la parte que pueden proveer cosas como el nombre, fecha de nacimiento, dirección, etc. El formulario es entonces dado al medico quien lo completa con todos los datos médicos y diagnósticos. Es entonces enviado de regreso a la oficina del Parent Project que lo pasa a los genetistas en el laboratorio de ADN del Dr. Steve Abbs en el Hospital de Guy en Londres, quien determina los detalles genéticos del paciente e introduce todos los datos en-línea en el registro. El programa de registro entonces predice opciones de tratamiento como que exones deben ser omitidos o qué otros

tratamientos genéticos o farmacológicos son posibles y disponibles. Los datos de los formularios y las predicciones son devueltos en-línea o por correo a los padres y al médico, a quienes se le pide verificar todas las anotaciones y hagan las rectificaciones si es necesario. El registro también puede mostrar la ubicación geográfica de todos los pacientes registrados en el R.U. y así ayudar reclutar a participantes para pruebas locales y grupos de apoyo de pacientes.

El registro tiene un comité directivo que supervisa el

curso del programa, sugiere cambios, y autoriza a médicos e investigadores para tener acceso a todos o datos seleccionados. Este tiene como sus miembros a los siguientes genetistas y médicos: Steve Abbs, Emma Ashton, Kate Bushby, Francesco Muntoni, Terry Partridge, Federico Roncaroli, Su Stenhouse.

Todos los cerca de los 2,000 pacientes con Duchenne y 500 con Becker en el R.U. deben tener sus datos entrados en el registro. *Y también está abierto a los pacientes en otros países.*

## ¡No olvide la madera para los árboles! Palabras finales por Francesco Muntoni.

Hay desarrollos muy excitantes en el campo de la investigación clínica en distrofia muscular Duchenne. Varios nuevos enfoques terapéuticos experimentales muy alentadores enfocados en la modificación de la expresión de la distrofina (oligonucleótidos en antisentido; PTC124), están siendo probados por primera vez en chicos con Duchenne y ahora hay esperanza real de que podrían tener un impacto sobre la progresión de la condición. Además, otros enfoques farmacológicos experimentales que tienen por objetivo hacer al músculo deficiente de distrofina más "tolerante" al daño en curso, han sido probados recientemente con éxito en modelos animales de DMD y es probable entren a etapa de pruebas clínicas en el futuro.

En esta fase de excitación es totalmente comprensible que familias, pacientes y médicos esperen que una cura

final sea encontrada pronto para DMD; sin embargo, es muy importante darse cuenta de que el tiempo y el impacto que estos nuevos enfoques experimentales tendrán, es actualmente desconocido. Es por lo que es de fundamental importancia asegurarse de que cada chico consiga el mejor nivel de cuidado, con los varios enfoques disponibles hoy para disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad. Los corticoides y fármacos para el corazón no "resuelven" la condición, pero permiten inequívocamente comprar tiempo y prolongar la ventana de oportunidad para un chico de beneficiarse de las futuras terapias experimentales. Así que la mejor manera, hoy, de facilitar a los chicos con DMD de beneficiarse de las futuras terapias, es mantenerlos en buena forma aplicando los acuerdos óptimos estándar de cuidado.

---

Como se menciona al inicio de este informe, he resumido solo las presentaciones más científicas dadas en la reunión en Londres, y la información científica adicional. Sin embargo, había 12 presentaciones más sobre tópicos médicos y sociales, así como legales, que junto a presentaciones similares en las otras reuniones, podría ser resumido en un informe especial en un momento posterior. Pero es importante llamar la atención hacia el nuevo grupo de trabajo del Parent Project:

**Grupo de trabajo del PPUK sobre Comportamiento y Aprendizaje:** En la conferencia de este año, *Veronica Hinton* de la Universidad de Columbia en Nueva York habló en detalle de su investigación relacionada con el comportamiento y problemas de aprendizaje experimentados por chicos con distrofia muscular Duchenne, y lanzo el nuevo equipo de herramientas de Aprendizaje y Comportamiento del PPUK. *Janet Hoskin* una profesora especialista en dislexia en Londres, también introdujo una sesión de maneras de valorar e implementar un programa de lectura y ortografía temprano. Los detalles de la investigación de la Dra. Hinton están ahora publicados en un nuevo paquete de herramientas – *PPUK Learning and Behaviour Toolkit for Duchenne Muscular Dystrophy* publicado por el PPUK. Las copias están disponibles gratuitamente del PPUK llamando al \*44-208-556 9955 (en el Reino Unido).

---

Este informe, escrito en Diciembre del 2006 y Enero del 2007, está también disponible en inglés y alemán. Todos mis informes anteriores en inglés, alemán, y español pueden ser vistos en Internet en [www.duchenne-investigacion.com](http://www.duchenne-investigacion.com). La próxima reunión anual del *Parent Project Muscular Dystrophy* de EUA, PPMD, tendrá lugar en Julio del 2007 en Filadelfia. Ésta será una oportunidad de escribir otro informe sobre todos los nuevos resultados de investigación de Duchenne. Aquellos que deseen recibir mis futuros informes por correo electrónico tan pronto como estén listos, deben por favor mandarme su dirección de correo electrónico.

*Günter Scheuerbrandt*, PhD., Im Talgrund 2, D-79874 Breitnau, Alemania. E-mail: [gscheuerbrandt@t-online.de](mailto:gscheuerbrandt@t-online.de)

### Traducción al español por:

Ricardo Rojas Caballero, Playa Rosarito 319 Fracc. Playa Sur CP 82040 Mazatlán, Sinaloa, México  
E-mail: [distrofiamuscular@yahoo.com.mx](mailto:distrofiamuscular@yahoo.com.mx) Internet: <http://www.distrofia-mexico.org>