

Acercamientos de Investigación para una Terapia de Distrofia Muscular Duchenne.

Actualizado en Marzo y Abril del 2008

Éste es un nuevo tipo de informe de investigación, que yo, *Günter Scheuerbrandt*, un bioquímico en Alemania, he escrito para usted, niños y jóvenes con Duchenne y sus familias, que desean saber cómo el trabajo de científicos y especialistas en varios laboratorios de investigación del mundo esta progresando hacia terapias eficaces para distrofia muscular Duchenne. Mis informes anteriores, y especialmente los últimos tres de los encuentros del Parent-Project en Cincinnati en Julio del 2006, en Londres en el 2006, y en Filadelfia en el 2007 (www.duchenne-information.eu), contenían los resúmenes algo detallados de los resultados de investigación presentados en esos encuentros. Pero como también otra investigación científica importante es realizada sin haber sido mencionado en los encuentros, ahora he acertado prácticamente todos los resúmenes de los tres últimos informes para este informe, los actualicé con nueva información, principalmente del encuentro de ActionDuchenne en Londres en Noviembre del 2007, y he añadido nuevos resúmenes de importantes publicaciones recientes. Referencias para algunas de las publicaciones más importantes son dadas al final de algunos resúmenes.

Éste ahora es un texto básico, que está actualizado hasta Marzo y Abril del 2008. Lo actualizaré repetidamente con nueva información, la primera vez después del próximo encuentro del Parent-Project en Filadelfia en Julio del 2008; estará disponible en inglés, español, y alemán algunos meses después. Como antes, todos mis informes y éste, también, no son publicaciones científicas con muchas palabras difíciles, porque he tratado de escribirlo para usted en una manera que lo dejará comprender qué esta ocurriendo en los laboratorios.

Este informe, como los anteriores, contiene los resúmenes de solamente los resultados de investigación científica. Sin embargo, trataré de incluir también los resúmenes sobre los nuevos procedimientos de manejo médico y social en nuevas ediciones de este informe, sobre la base de futuras presentaciones y publicaciones.

En los resúmenes, estoy dando solamente los nombres de los jefes de laboratorios, aunque tienen colegas y postdoctorados y estudiantes que trabajaban como un equipo en los proyectos reportados aquí, pero es imposible mencionar todos sus nombres. Todos los directores del laboratorio, cuyo trabajo es resumido aquí en este informe, han tenido la oportunidad ver los borradores de mis textos y corregirlos, si era necesario, y casi todos lo han hecho. Por lo tanto, no debe haber, o pocos, errores dejados en este informe.

Si usted tiene preguntas con respecto a investigación, por favor escríbame un correo electrónico en inglés, alemán, español, o italiano. Trataré de responder a todos ellos, pero solamente en inglés o alemán.

Introducción

¿Cómo hacen proteínas los genes? Los **genes** son unidades funcionales de material genético de **ácido desoxirribonucleico, ADN**. Su estructura parece una escalera de mano entrelazada, la *doble hélice*. Los niveles de esta escalera de mano constan de cuatro moléculas pequeñas diferentes, las **bases**: *adenina, guanina, timina, y citosina* (abreviadas A, G, T, C). Por razones espaciales, los niveles pueden contener solamente dos tipos de combinaciones de bases, los **pares de bases** A-T y G-C. Si GGCTTAATCGT es la secuencia de estas bases en una de las cadenas, la secuencia de la cadena opuesta debiera ser CCGAATTAGCA por lo tanto ambas secuencias son *complementarias* una de otra:

```
-GGCTTAATCGT-  
| | | | | | | | | |  
-CCGAATTAGCA-
```

Esta secuencia de bases, o de "letras genéticas", es la **información genética** para el desarrollo y mantenimiento de un organismo viviente que es pasada de una generación a la próxima.

La mayoría de los genes llevan las instrucciones para la construcción de **proteínas**. En el núcleo de la célula, la instrucción genética de genes activos es **expresada**, es copiada, y **transcrita**, a otra sustancia genética, el **ácido ribonucleico pre-mensajero** o **ARNpre-m**, también llamada la *transcripción*. La mayoría de los genes constan de regiones activas, los **exones**, que contienen

la información para la creación de las proteínas, y los a menudo más largos **intrones**, los cuales no contienen solo "basura genética", como una vez se pensó, sino una importante información para el control de las actividades del gen. Después de la transcripción, los intrones son retirados del ARN pre-mensajero, y los exones son **empalmados** para formar el **ARN mensajero**, **ARN_m**, que se traslada entonces a los **ribosomas**, la estructura sintetizadora de proteínas fuera del núcleo. Los ácidos ribonucleicos, los **ARNs**, usan la base U, *uracilo*, en lugar de la similar base T del ADN. Los **sitios de empalme** son secuencias específicas dentro de los exones y en los bordes de los exones e intrones que son esenciales para el retiro correcto de las secuencias sin codificación del intrón del ARNpre-m. El empalme por sí mismo es logrado por los **spliceosomas**, un complejo de muchas proteínas y pequeños ARN's.

En el ARN mensajero, tres bases consecutivas, un **codón**, *tripleta*, o "*palabra genética*", especifican, con tres excepciones, uno de los 20 **aminoácidos** diferentes, de acuerdo con el **código genético**. No hay ningún espacio entre los codones. En los ribosomas, el código de palabras genéticas del ARN mensajero es leído y *traducido* en el lenguaje de las proteínas, las cuales están construidas de muchos, a menudo miles, de aminoácidos, sus componentes de construcción. Las tres excepciones mencionadas son las tripletas UAA, UAG, y UGA, que son **codones de parada**, donde el ensamblaje de la proteína se detiene.

El gen y la proteína distrofina: Las distrofias musculares Duchenne y Becker son causadas por una **mutación** o daño del **gen de la distrofina** que lleva la información para las diferentes formas de la proteína **distrofina**. Con una secuencia de 2,220,223 bases, es con mucho el gen humano conocido más grande. Solamente 11,058 bases, el 0.5 %, en los 79 exones del gen de la distrofina específica la secuencia de los 3,685 aminoácidos de la proteína distrofina "normal" en las células musculares.

El tamaño del gen y la proteína distrofina: La estructura de doble hélice del gen de la distrofina tiene 0.75 mm de largo. Junto con los otros cerca de 25,000 genes humanos, está empacado en un núcleo celular de un diámetro de cerca de 0.01 mm solamente porque el material genético está empacado muy apretadamente. Una molécula de distrofina de extensión completa es mucho más corta que su gen, de 125 nm (= 0.000125 milímetros) de largo, 80,000 de ellos colocados extremo con extremo en una línea recta cubriría sólo un centímetro. Y en un gramo de músculo, hay 114 mil millones de moléculas de distrofina. Esto puede ayudar a apreciar la tarea de los científicos: parar detener la enfermedad, para hacer que los músculos funcionen otra vez, al menos cerca del 30% del número normal de las distrofinas tienen que aparecer otra vez después que el gen dañado no puede hacerlas más. Las nuevas distrofinas no tienen que tener la misma forma exactamente, pueden ser más pequeñas, pero deben poder trabajar apropiadamente. ¡Y eso quiere decir que miles de millones de nuevas distrofinas tienen que volver a cada gramo de

músculo, y un niño tiene muchos kilogramos de ellos!

El papel de distrofina: La distrofina es necesaria para la estabilidad mecánica de las células musculares. Está ubicada en el interior de las membranas de la célula muscular. Uno de sus extremos, la **terminal-C**, está unido a un grupo de otras proteínas en la membrana, el **complejo distrofino-glicoproteico**, y el otro extremo, la **terminal-N**, se conectan a las estructuras contráctiles dentro de las células musculares. La parte central de la distrofina, **dominio de varilla (rod domain)**, consta de cadenas de aminoácidos enroscadas que se doblan sobre sí mismas varias veces. Si el movimiento de contracción de la célula muscular fuerza a la proteína distrofina a cambiar su longitud, su estructura doblada permite que ella actúe como un resorte o como un *absorbedor de choques*. Por lo tanto, la distrofina transmite la energía mecánica producida por el "*aparato de contracción*" de actina-miosina hacia las membranas de la célula muscular y las estructuras fuera de los músculos, el tejido conectivo y los tendones, en una manera equilibrada que no los somete a demasiado esfuerzo.

La distrofina tiene más papeles: organiza la compleja estructura del complejo distrofino-glicoproteico y la ubicación de muchas otras proteínas. También regula procesos complicados como el mantenimiento de la cantidad correcta de calcio en las células y aquellas sustancias que controlan el crecimiento de los músculos. Muchos detalles de estas interacciones intrincadas entre numerosos componentes en una célula viviente todavía son desconocidos.

Los chicos Duchenne no tienen o tienen muy poca distrofina en sus fibras musculares. Cuando sus efectos protectores y organizadores están faltantes, la contracción del músculo causa la ruptura de las membranas musculares, y esto permite que cantidades grandes de calcio circulen en las fibras. El excesivo calcio activa enzimas como la *calpaína* y otras proteasas que deshacen las proteínas musculares e inician programas de muerte celular, apoptosis. Las consecuencias son una cadena de los eventos como la inflamación y la activación de fibroblastos que resultan en **fibrosis**, tejido cicatrizante, que disminuye la velocidad de regeneración del músculo y causa los típicos síntomas de los pacientes con Duchenne mayores.

Los chicos con distrofia Becker de progresión más lenta mayormente tienen cantidades menores a lo normal de distrofina y a menudo también más corta de lo normal. Esta todavía puede cumplir su papel, pero no trabaja tan eficazmente como la versión normal.

Pero no solamente los músculos esqueléticos sufren cuando la distrofina está faltante, sino también los músculos lisos y cardíacos. El daño para los músculos de corazón causa *cardiomiopatía*, y la debilidad de los músculos lisos tiene muchas consecuencias, entre otros la habilidad reducida de los vasos sanguíneos a relajarse cuando el flujo de sangre aumenta resultando en problemas respiratorios y otros, y también el tracto gastrointestinal es afectado cuando la motilidad de los intestinos es reducida. Así que el cambio en sólo un gen puede afectar todo el cuerpo.

Las mutaciones del gen de la distrofina: Hay tres tipos

de mutaciones del gen de la distrofina: **deleciones**, si uno o mas exones enteros del gen están faltantes, **duplicaciones**, si partes del gen están repetidas, y **mutaciones puntuales**, si un solo par de bases esta cambiado, eliminado o añadido. Otras son inversiones y mutaciones en los intrones que modifican los patrones normales de empalmado.

Como los codones de tres letras del ARN mensajero son leídos en los ribosomas uno después de otro sin interrupción, este **marco de lectura** no es alterado, cuando la mutación elimina o añade codones enteros de tres pares de bases por vez. En este caso, el marco de lectura se mantiene **en orden** y la distrofina puede ser hecha todavía pero esta será más larga o más corta de lo normal.. Si este cambio afecta solamente estructuras no-esenciales de la distrofina, puede ser en parte funcional y por lo tanto, da lugar a **distrofia Becker** menos severa.

Sin embargo, si la mutación cambiara el marco lectura por uno o dos pares de bases, el marco de lectura **pierde su orden**. Entonces, un número de aminoácidos incorrectos son incorporados en la proteína empezando en el sitio de la mutación hasta que finalmente un nuevo y **prematureo codón de parada** es alcanzado. La distrofina incompleta no puede cumplir su función normal, desaparece y la **distrofia muscular Duchenne** se desarrolla.

La distrofina en el cerebro. La distrofina no sólo esta presente en las fibras musculares sino también en otros órganos como el cerebro y la retina de los ojos. La distrofina en el músculo con un peso molecular de 420 kd, kilodaltons (420,000 veces más pesado que un átomo de hidrógeno) es la más grande de cinco *isoformas* (proteínas de tamaño diferente). En el cerebro, esta distrofina normal,

asi como también las cuatro más pequeñas, son encontradas predominantemente en las sinapsis, donde las células nerviosas se conectan unas con otras, y en las paredes de los vasos sanguíneos en el cerebro, en la asi llamada barrera sanguínea-cerebral. Esto significa que estas distrofinas son importantes para la comunicación entre los nervios y también para la correcta actividad de la barrera sanguínea-cerebral que deja pasar solamente aquellas sustancias que son necesarias para la función normal del cerebro.

El gen de la distrofina tiene siete **promotores**, las secuencias de bases en las que la biosíntesis de proteína es iniciada. Los primeros tres promotores al principio del gen controlan la síntesis de la proteína normal, los otros cuatro están más dentro del gen. El promotor más cerca al final del gen produce una distrofina mas corta. Esto significa, que las mutaciones que han ocurrido antes de ese promotor en particular no afectan la producción y la estructura de la proteína iniciadas por ese promotor. Por ejemplo, los chicos con Duchenne con mutaciones en la primera mitad de su gen todavía pueden producir sus isoformas acortadas de distrofina para el cerebro, en contraste con aquellos con mutaciones en las últimas regiones del gen, cuyas distrofinas cerebrales estarán entonces también ausente. Este explica por qué algunos niños con Duchenne tienen significantes dificultades de aprendizaje y comportamiento, y otros niños solamente algunos o ningunos en absoluto.

Ya que isoformas diferentes de distrofina también han sido encontradas en la retina del ojo, la ubicación de la mutación al parecer es responsable de las dificultades de visión del color de algunos niños con Duchenne.

Comunicado por Prof. *Francesco Muntoni* del Colegio Imperial en Londres.

Omisión de Exón (Exon skipping)

La omisión de exón no es una cura. La técnica de *omisión de exón* (exon skipping, salto de exón) trata de disminuir la velocidad de la rápida distrofia Duchenne a una distrofia Becker mucho más leve. *Esta no cambia al gen mismo con su mutación*, pero afecta cómo es leído y procesado el gen defectuoso. La omisión de exón *no será una cura para distrofia Duchenne*, solo debe reducir la gravedad de sus síntomas, es solamente *una terapia*.

Si una mutación, una deleción, duplicación o mutación puntual, altera el marco de lectura del ARN mensajero, ARNm, y causa por lo tanto distrofia Duchenne, el marco puede ser restaurado retirando artificialmente del ARNm uno o mas exones con *oligorribonucleótidos en antisentido*, AONs. Son pequeños trozos de ARN cuyas secuencias son diseñadas en tal manera de que se unen por si mismos precisamente a la secuencia complementaria del ARNpre-m dentro del exón a ser retirado o en sus regiones fronteras, y *en ningún otro lugar*. Estos AONs por lo tanto interfieren en la maquinaria de empalmado con el propósito de que el exón o exones seleccionados no sean más incluidos en el ARNm, son *omitidos*.

Como a este ARNm es más corto de lo normal, la proteína distrofina es también más corta, contiene menos aminoácidos. Si los aminoácidos faltantes son parte de regiones no-esenciales, como el dominio de varilla (rod

domain), la proteína más pequeña puede a menudo todavía realizar su papel estabilizador en la membrana celular del músculo. El resultado sería el cambio de los síntomas de Duchenne severos en los síntomas mucho más leves de distrofia muscular Becker.

Para las primeras pruebas de omisión de exón, dos clases de AONs químicamente protegidos son usadas. Tienen que ser protegidos porque son destruidos lentamente en las células musculares por enzimas destructoras del ácido nucleico. Los dos tipos de AONs son los *2'O-metil-fosforotioatos*, también llamados *2O-metilos* y los *morfolinis*.

Prueba de omisión de exón en Holanda. La primera prueba en humanos con la técnica de omisión de exón fue realizada en Holanda entre enero del 2006 y marzo del 2007. Fue diseñada para proveer solamente una *prueba de principio* y no un beneficio terapéutico a los niños tratados. Fue un *estudio local* sobre un área pequeña de un solo músculo, el músculo de la espinilla *tibialis anterior*, que fue tratado con un oligorribonucleótido en antisentido 2'O-metilo, AON, contra el exón 51 llamado *PRO051*. Con este tipo de AON químicamente protegido, los investigadores holandeses habían trabajado en experimentos pre-clínicos por varios años y fueron capaces de omitir los exones de la distrofina con éxito en fibras musculares no

sólo en cultivos de células, sino también en ratones y perros vivos después de inyecciones locales y sistémicas.

Antes del inicio de esta primera prueba clínica de omisión de exón, pruebas clínicas y genéticas moleculares fueron llevadas a cabo en cada niño para asegurarse de que el procedimiento de omisión de exón en los niños produjera distrofina acortada tipo Becker de la estructura esperada. Cuatro chicos, que ya usan silla de ruedas, participaron en este estudio de método abierto. Tienen entre 10 y 13 años de edad y habían demostrado delecciones de los exones de la distrofina 50, 52, 48-50, y 49-50. Fueron tratados en secuencia, esto significa que solo después de que los resultados en un chico eran positivos y no mostraban ningún efecto secundario serio, el próximo chico era tratado. Cada chico recibió cuatro inyecciones de 0.2 mg de PRO051 disuelto en 0.2 ml de solución salina (0.9% NaCl) bajo anestesia local, en una región pequeña de 1.5 cm de extensión del músculo tibialis anterior.

Después de cuatro semanas, tejido muscular fue obtenido por una biopsia del sitio de la inyección y se probó para buscar el ARNm omitido y distrofina acortada esperada. Estas pruebas mostraron que el 64%, 85%, 97%, y 73% de las fibras musculares todavía presentes en el músculo distrófico, contenían nueva distrofina en sus membranas después de este tratamiento de 4 semanas. En comparación con la laminina $\alpha 2$, una proteína no afectada por el proceso distrófico, el contenido de distrofina fue de 33%, 35%, 17%, y 25%. Esta comparación tiene en cuenta la extensión de la degeneración muscular. Sin este ajuste el chico de 13 años con mucho tejido conectivo y grasa en sus músculos tenía solamente 3% de la cantidad normal de distrofina, mientras que el chico con los músculos menos afectados tenía 12%. Los métodos moleculares de secuenciación probaron que la nueva distrofina tenía exactamente la estructura esperada con un marco de lectura restaurado. Fue imposible determinar si la cantidad de nueva distrofina habría sido capaz de disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad en el músculo entero, porque el volumen de tejido muscular tratado era demasiado pequeño.

Estos resultados significan que un tratamiento de omisión de exón, cuando este disponible, debe empezar cuando la mayoría de los músculos todavía están intactos, esto es, apenas la mutación precisa de la distrofina sea conocido causa un cambio del marco de lectura.

Los investigadores holandeses ahora han empezado una fase-I/II de estudio clínico para explorar el efecto, seguridad, tolerancia y posibles efectos secundarios de inyecciones *sistémicas* del AON PRO051 en la circulación sanguínea, para que así pueda alcanzar todos músculos, incluyendo aquellos del pulmón y corazón. Esta prueba es realizada en colaboración con la Universidad de Leuven en Bélgica, el Centro Médico de la Universidad de Leiden y el Hospital Infantil Reina Silvia en Suecia. Los pacientes son ahora enrolados.

Las inyecciones serán hechas subcutáneamente (bajo la piel) porque ha sido mostrado con ratones y monos que este tipo de aplicación causa omisión de exón sin efectos secundarios serios en todos los músculos probados, también en el corazón y el diafragma, y porque no requeriría visitas frecuentes a los consultorios médicos y hospitales si tratamientos repetidos son necesarios.

Esta técnica de omisión de exón con los AONs 2'O-metilol fue desarrollada en la Universidad de Leiden por el Prof. **Gertjan van Ommen**, la Dra. **Judith van Deutekom** y su equipo, pero para la organización y realización de las pruebas clínicas, la compañía *Prosensa B.V.* en Leiden con su presidente Dr. **Gerard Platenburg** es ahora responsable. La Profa. van Deutekom es ahora jefa de investigación de Prosensa.

El estudio sistémico será hecho en doce niños con Duchenne de 5-15 años y durará cinco semanas con una inyección subcutánea cada semana. Debido a que no ha sido probado que las dosis de AON usadas en los estudios animales serán seguras de usar en niños, uno empezará la prueba sistémica con una dosis muy baja que será incrementada lentamente para acercarse a un nivel óptimo, de inicialmente una inyección de 0.5 mg/kg, a un máximo de 10 mg/kg.

Prosensa ya ha producido grandes cantidades del AON contra el exón 51 en calidad grado clínico para la próxima prueba. También, AONs con estructuras optimizadas en contra de los exones 43, 44, 45, 46, 50, 52 y 53 han sido preparados. Estos AONs juntos, incluyendo el AON anti exon 51, permitirán el tratamiento de más del 65% de todos los pacientes con delecciones. Pero, por razones financieras, Prosensa está desarrollando actualmente solamente los AONs contra los exones 44, 51 y 52 hacia la aplicación clínica completa y mercadeo.

La compañía necesita más capital de inversión para el desarrollo de otros AONs y aprecia la financiación cuantiosa recibida de las organizaciones de padres como los Parent Projects Holandés y Alemán, la asociación de distrofia muscular francesa AFM y otras.

Van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, et al. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med* 2007; 357; 2677-86.

Hoffman, EP. Skipping toward personalized molecular medicine. *N Engl J Med* 2007; 357; 2719-22.

Prueba clínica de omisión de exón en el Reino Unido.

Otra prueba clínica de omisión de exón está siendo realizada en el R.U. por el *Consortio MDEX* bajo la dirección del Prof. **Francesco Muntoni** del Colegio Imperial de Londres. El consorcio MDEX, financiado por el departamento de Salud, agrupa a nueve investigadores así como las sociedades benéficas ActionDuchenne, Muscular Dystrophy Campaign, y Duchenne Parents Support Group.

Ocho oligos en antisentido diferentes, AONs, fueron probados en cultivos de músculo humano normal y con Duchenne y en ratones no distrofosos los cuales tenían genes de la distrofina humana. Los mejores resultados fueron obtenidos con el AON *morfolino H51A* desarrollado por Prof. **Steve Wilton**, en Perth (Australia) y mostrado por Prof. **Dominic Wells** en Londres que era suficientemente estable para un tratamiento a largo plazo. Este AON morfolino está siendo fabricado en grado clínico por la compañía *AVI BioPharma Inc.* en Portland, Oregón, y es llamado AVI-4658.

Tres grupos de tres chicos con Duchenne cada uno, de 12 a 18 años de edad y que no pueden caminar mas, recibirán Tres dosis diferentes: 0.09, 0.297, y 0.9 mg de AON morfolino en 0.9 ml de solución salina, con nueve inyecciones directamente en los músculos *extensores*

brevis digitorum en el exterior de un pie. Este músculo fue seleccionado porque es muy accesible y puede ser retirado sin serias consecuencias si algunos efectos secundarios inaceptables ocurrieran. El músculo del otro pie recibe inyecciones de solución salina para pruebas de control. Chequeos clínicos extensivos incluyendo biopsias serán hechos antes y 30 día después de las inyecciones.

Después de que la aprobación fue dada por todas las tres autoridades reguladoras del R.U. después de un largo proceso de aplicación, el primer niño recibió sus inyecciones de AON el 18 diciembre del 2007. Los resultados del estudio entero se espera sean informados durante el 2008.

Tan pronto como esta primera prueba muestre resultados prometedores, un estudio sistémico, que está ya en un estado de planificación avanzado, empezará con inyecciones subcutáneas del AON AVI-4658 en la circulación sanguínea. Uno de los más decisivos experimentos animales pre-clínicos para la preparación de esta prueba, fueron siete inyecciones semanales de AON en el vena de la cola de ratones mdx que resultaron en más del 50 % de la cantidad normal de distrofina en la mayoría de sus músculos, que estaba presente durante al menos 14 semanas.

En esta prueba sistémica, se planea tratar a cuatro grupos de niños con Duchenne ambulantes con inyecciones sistémicas subcutáneas semanales, empezando con una dosis baja de AON de aproximadamente 600 mg e incrementándose a aproximadamente 3 gramos, calculado para un niño de aproximadamente 10 años. En pruebas clínicas previas para otras enfermedades, dosis de AON de hasta 300 mg/kg/día fueron bien toleradas, así que la dosis de inicio en esta prueba de Duchenne era muy baja. Los objetivos de la prueba son hacer pruebas para seguridad y tolerabilidad y también cambios de la función muscular y fuerza. Y es esperado que con una dosis baja pueda ser determinado si inducirá suficiente omisión de exón mientras sea bien tolerado por los niños sin efectos secundarios serios.

La descripción de la prueba clínica local puede ser vista en <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00159250>

Arechavala-Gomez V, Graham IR, Popplewell LJ, et al. and Muntoni F. Comparative analysis of antisense oligonucleotide sequences for targeted skipping of exon 51 during dystrophin pre-mRNA splicing in human muscle. *Human Gene Therapy*, 2007; 18; 798-810.

Omisión de Exón con transferencia de gen U7: Los investigadores en el Instituto Génethon en Evry cerca de París, el Prof. **Luis García** y la Dra. **Auréli Goyenvalle** (ahora en la Universidad de Oxford) están tratando de combinar la omisión de exón con terapia génica al ordenar a las células musculares que produzcan los *oligorribonucleótidos en antisentido*, AONs, para que no tengan que ser inyectados repetidamente. Esto puede ser conseguido transportando dentro los músculos ARNsn's-U7 modificados conteniendo la información genética para la construcción de los AONs. Los *ARNsn's-U7* son ARN's nucleares pequeños, que tienen una estructura similar a los factores empalme. Con un segundo programa de investigación, los científicos franceses han desarrollado una nueva técnica de omisión de exón más general que también usa la transferencia viral de genes U7.

Para probar el primer enfoque, un gen modificado para el ARNsn-U7 fue construido añadiendo secuencias complementarias de ADN para dos AONs que son necesarios para omitir el exón 23 de ratones mdx. Estos ARNsn's, como todos los otros ARN's, también son "hechos" por genes. Este gen-U7 modificado, U7 SD23/BP22, junto con secuencias de control, fue insertado en los vectores AAV tipo 2 e inyectado primero a nivel local en músculos solos de ratones mdx y luego sistémicamente en su circulación sanguínea. Esto resultó en la aparición de distrofina sin los aminoácidos determinados por el exón 23 en hasta 80 % de las fibras musculares tratadas, esta nueva y acortada distrofina migro a su normal posición debajo de las membranas celulares del músculo, y fue estable por más de un año sin causar alguna reacción inmune. Los procesos distróficos en los músculos mdx, esto es, su acelerada degeneración y regeneración, fueron interrumpidos totalmente. Los ratones mdx sistémicamente tratados que fueron físicamente estresado corriendo sobre una cinta rodante cuesta abajo, no desarrollaron el daño muscular usual encontrado en ratones mdx sin-tratar.

Esta técnica de transferencia del gen-U7 fue aplicada luego para tratar el perro clínicamente distrófico perdigue-ro dorado *GRMD*. Estos perros tienen una mutación en el sitio de empalme del exón 7 y puede ser "reparado" omitiendo los exones 6 y 8. Usando un vector U-7 modificado que contiene estructuras en antisentido en contra de los exones 6, 7, y 8, distrofina acortada en casi el nivel normal fue obtenida dos meses después de una sola inyección local en un músculo. Una inyección sistémica regional en una pata con la circulación bloqueada resultó en grandes cantidades de nueva distrofina que todavía estaba presente seis meses después.

En el segundo enfoque basado en la transferencia del gen U7, la omisión de exón será mediada por un nuevo y casi "universal" vector ARNsn-U7, que trae una secuencia de ADN complementaria al exón y una cola libre que tiene sitios de unión para las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas A1/A2 (hnRNP), proteínas que inhiben el proceso de empalme para todos los exones. La secuencia complementaria del gen transferido, una vez transcrito en un ARN pequeño, se unirá al exón a ser omitido, y vendrá con la estructura atrayente de los hnRNPs, que inducirá la omisión de exón porque estas proteínas interfieren con el complejo de proteínas de empalme, los spliceosomas, asentándose en los extremos de este exón en particular en el ARNpre- m. Por lo tanto, esta clase de omisión de exón no es provocado por los AONs usuales si no por estas proteínas "universales" que hacen la misma inhibición del empalme de todos los exones. Este método ya ha sido probado con éxito en el laboratorio para la omisión del exón 51 en mioblastos aislados de pacientes con Duchenne.

La razón para este enfoque es acortar considerablemente el largo proceso de aprobación posiblemente requerido para muchos o incluso todos los AONs usados por las técnicas normales de omisión de exón, porque el nuevo enfoque usa solamente la estructura "universal" de cola en adición con la secuencia complementaria de ADN de la secuencia del exón a ser omitido.

Goyenvalle A, Vulin A, Fougousse F, et al, and Garcia L, y Danos O. Rescue of dystrophic muscle through

U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 2004; 306; 1796-99.

Multi omisión de exón en perros distróficos. Cerca del 50% de todas las distrofias Duchenne causadas por deleciones, duplicaciones, y mutaciones puntuales necesitarán omitirse dos o más exones para restaurar el marco de lectura. Ya que los perros distróficos necesitan una omisión doble de exón, los experimentos con ellos abrirían el camino para el desarrollo de la multi omisión de exón para los chicos con Duchenne con estas mutaciones más difíciles. Por consideraciones teóricas todavía se ha predicho que una omisión simultánea de los 11 exones del 45 a 55 produciría una distrofia Becker con síntomas muy leves en hasta el 63 % de chicos con Duchenne con deleciones.

El Prof. **Terence Partridge** del Centro Médico Nacional Infantil en Washington y sus colegas, han empezado a desarrollar multi omisión de exón en perros perdigueros dorados distróficos, GRMD. En contraste con los ratones mdx con síntomas distróficos leves, estos perros son físicamente incapacitados, así que los experimentos con ellos darían resultados que podrían ser probablemente similares a los resultados de estudios clínicos con pacientes de Duchenne. Y experimentos duraderos de varios años pueden ser realizados con perros, porque viven mucho más tiempo que los ratones.

Estos perros distróficos tienen una mutación en el sitio de empalme del exón 7 en el gen de la distrofina que causa la deleción del exón 7 en el ARNm, y un cambio del marco lectura con un codón de parada prematuro pronto después. Omitiendo los dos exones 6 y 8 flanqueantes se restauraría el marco de lectura.

En un primer estudio *local*, los investigadores inyectaron dosis diferentes de un cóctel de tres AONs morfolinos, dos diferentes de ellos en contra del exón 6 y un tercero en contra del exón 8, en el músculo tibialis-anterior de perros GRMD adultos jóvenes. Dos semanas después, tejido alrededor de los sitios de la inyección fue obtenido por biopsias, el cual contenía distrofina nueva y acortada en todas las fibras musculares que tenían una estructura casi normal. Pero en adición a los dos exones 6 y 8 seleccionados, el exón 9 también fue omitido; sin embargo, esto no afecta el marco de lectura. En experimentos preliminares en cultivos de tejido, los exones 6-9 fueron omitidos en presencia de morfolinos directamente solo contra el exón 6, pero esto no ocurrió cuando los morfolinos fueron inyectados directamente en los músculos; el cóctel de morfolinos en contra de los exones 6 y 8 era necesario para omitir estos tres exones en el músculo del animal vivo. Así que, los resultados de la omisión de exón en cultivos de tejido no pronostican fiablemente qué ocurrirá en el músculo en el animal vivo o la persona.

Para un tratamiento *sistémico*, realizado en colaboración con el Dr. **Shin'ichi Takeda** en la Instalación General de Investigación Animal en Tokio, tres perros de dos meses de edad fueron tratados inyectando los tres AONs en sus venas de la pata que también resultaron en la omisión de los cuatro exones 6-9. Después de dos meses, un gran porcentaje de los músculos esqueléticos habían producido la distrofina acortada predicha en una manera dependiente de la dosis. Ninguna nueva distrofina apareció en los músculos del corazón, porque, como es sabido de los experi-

mentos iniciales, los AONs morfolinos no entran en el corazón.

Basados en varias pruebas de función muscular, el estado físico de los perros fue estabilizado al mismo nivel de como era antes que el tratamiento empezara, mientras los perros sin tratar degeneraron considerablemente durante ese tiempo. Así que, el tratamiento sistémico parece haber interrumpido su degeneración muscular. Pruebas de resonancia magnética nuclear (NMR) fueron hechas para analizar la estructura de los músculos. Esta técnica no invasiva puede ser tan informativa como las pruebas en tejido muscular de las biopsias. Esto será importante para las pruebas clínicas con niños con Duchenne porque las biopsias repetidas podrían ser minimizadas.

Por lo tanto, los AONs morfolinos trabajan bien en un mamífero grande con una estructura de cuerpo similar a los seres humanos. No son tóxicos, y no causan rechazo inmune. Sin embargo, tendrán que ser aplicados repetidamente, porque su efecto no es permanente, pero esto permitiría interrumpir el tratamiento si problemas ocurrieran. Y son solamente eficaces en los tejidos, como en músculo donde el gen de la distrofina es transcrito en ARNpre-m. Los detalles de estos resultados muy prometedores serán publicados en un futuro próximo.

Bérout C, Tuffery-Giraud S, Matsuo M, et al. Multi-exon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Human Mutation* 2007; 28(2); 196-202.

Omisión de exón con ácidos nucleicos péptidos. Dos tipos de oligorribonucleótidos en antisentido (AONs) para la omisión de exón ya son usados en las pruebas clínicas con chicos con Duchenne, los 2'O-metil-fosforotioatos (2'O-metilios) en Holanda, y los *morfolinos* en el R.U. Otro grupo de AONs, los *ácidos nucleicos péptidos* (PNAs), están ahora también siendo investigados por sus propiedades de omisión de exón. Los ácidos ribonucleicos (ARN's) y los ácidos nucleicos péptidos (PNAs) tienen diferentes columnas vertebrales: Cadenas de unidades alternantes de fosfato y ribosa son la columna vertebral del ARN, mientras que cadenas de aminoácidos forman la columna vertebral de los PNAs. Debido a sus puentes péptidos no-iónicos entre las unidades de aminoácidos, los PNAs se parecen a las proteínas con electricidad neutra en sus propiedades. Son solubles en agua, muy estables, pueden ser modificados fácilmente y diseñados para llevar las bases usuales de ADN y ARN en la correcta configuración espacial con cualquier secuencia deseada, para que ellos puedan unirse con alta afinidad a las secuencias de bases complementarias de ARN o ADN. Así que, cortas cadenas de PNA en antisentido con 20 a 30 bases están ahora siendo usadas para experimentos de omisión de exón como las otras dos clases de AONs.

El Dr. **Matthew Wood** y sus colegas en la Universidad de Oxford empezaron a trabajar con los PNAs en antisentido hechos de unidades del más simple aminoácido, la glicina, para omitir el exón 23 de ratones mdx. Experimentos en cultivos de células, e inyectándolos en músculos solos tibialis anteriores de ratones mdx vivos jóvenes y viejos, mostraban que tres semanas después de una sola

inyección varias fibras musculares contenían nueva distrofina que fue estable para más de ocho semanas.

Para mejorar la entrega en el tejido muscular, los PNAs fueron "conjugados", unidos a otros péptidos y proteínas como péptidos sintéticos ricos en arginina, al dominio de transducción de la proteína TAT del virus HIV, y al dominio funcional de la cubierta del AAV. Los resultados positivos de omisión de exón con estos PNA conjugados podían aun mas ser mejorados, al menos en el cultivo de

células, con un nuevo PNA en antisentido cuya columna vertebral consiste en unidades alternadas del aminoácido prolina con otro ácido que también, como la prolina, tiene una estructura de anillo de cinco átomos.

Los detalles de estos experimentos no pueden ser informados aquí porque no han sido publicados aún. Son muy alentadores y pueden llevar a fármacos en antisentido que podrán producir omisión de exón con alta eficiencia.

Transferencia del gen de la distrofina

Transferencia del gen de la distrofina, con un virus vector. La transferencia de un gen de la distrofina modificado con *virus adeno-asociados* (AAV) como vectores (como transportadores del gen) en las células musculares, es una de las estrategias para una terapia de distrofia muscular Duchenne. Experimentos exitosos con ratones y perros distróficos han ayudado al desarrollo por la compañía *Asklepius* en Chapel Hill, Carolina del Norte, de la nano partícula biológica *Biostrophin*TM, un vector AAV de serotipo 2.5 para la primera prueba clínica de este método de terapia génica.

Estos virus algo pequeños no pueden ser multiplicados por las células que infectan porque la mayoría de sus genes son retirados. Esto hace espacio para las secuencias de codificación de un gen terapéutico a ser transportado que no sea más largo de aproximadamente 5,000 pares de bases. Por lo tanto, los vectores usados en esta prueba están llevando una construcción de gen de la distrofina sin los intrones (un ADNc) y sin partes del exón 17 y todos los exones del 18 al 59 y del 70 a 79 eliminados. La transferencia de tal *micro-gen* por lo tanto no curaría la distrofia muscular Duchenne, pero la transforma en una forma de Becker de progresión mucho más lenta. La nueva distrofina Becker esperada será de aproximadamente un tercio de larga de la proteína normal. En 1990, un paciente de Becker de 61 años fue diagnosticado quien todavía era capaz de caminar y tenía esta clase de distrofina acortada en sus músculos. Aunque el resultado clínico será similar a una futura terapia de omisión de exón, *no será específica a la mutación*: Todos los pacientes de Duchenne podrían beneficiarse de este método de transferencia génica cuándo este completamente desarrollado.

Después de pruebas de seguridad y toxicología del vector de mini-distrofina en animales de laboratorio, una fase-Ia de prueba clínica con método doble-ciego con seis niños con Duchenne mayores a cinco años, fue realizado en el 2006 y 2007 bajo la dirección del Prof. *Jerry Mendell*, en el Hospital Infantil Nacional y la Universidad de Ohio State en Columbus, Ohio. Los niños recibieron las inyecciones de *Biostrophin* en tres sitios, con 0.5 cm. de separación, en su músculo bíceps de un brazo, mientras los bíceps del otro brazo recibió solo solución salina. Dos dosis diferentes fueron usadas para cada grupo de tres pacientes. Muestras de tejido muscular del sitio de la inyección fueron obtenidas por biopsias de cuatro niños a las cuatro semanas, y de dos niños a las doce semanas después de las inyecciones. Durante la prueba, ningunos eventos adversos relacionados a la terapia génica fueron observados, indicando que el procedimiento es bien tolerado. Los resulta-

dos completos serán publicados tan pronto como todos los datos sean valorados.

Ningún beneficio terapéutico es esperado en los chicos en esta primera prueba, cuyo objetivo principal es proveer la *prueba de principio* de que este tipo de terapia génica no solo trabaja en un músculo esqueléticos de ratones y perros, si no también en un músculo humano sin efectos secundarios inaceptables como una respuesta inmune contra la nueva mini-distrofina o el material del vector.

Para la preparación del próximo paso, experimentos adicionales en animales fueron realizados con el objetivo de encontrar las condiciones para una primera *prueba clínica de entrega vascular* con niños con Duchenne: Los vectores serán entregados regionalmente en la circulación sanguínea de las piernas, debido a que los vectores pueden solo ser producidos en cantidades limitadas y esto evitaría la distribución de los virus en todo el cuerpo entero, pero sería suficiente para prolongar la ambulación.

Una sola inyección de ambos vectores de mini-distrofina AAV tipo-6 o tipo-8 en la circulación sanguínea temporalmente obstruida de una pata trasera de ratones mdx, produjo micro-distrofina en más del 80 % de las fibras en los músculos de la pata y una mejora significativa de su función por hasta un año.

Estos experimentos fueron repetidos con monos macacos cuya estructura de cuerpo y peso son similares a los niños pequeños. Pero estos animales no eran distróficos, por lo tanto, tenían su propia distrofina. Los vectores llevaron proteína fluorescente verde, una señal artificial de proteína que era fácil detectar por su luz fluorescente. Los resultados fueron otra vez muy positivos: 60 a 80 % de las fibras en los músculos de la pata contenían la proteína fluorescente verde transferida.

Este resultado prometedor de las pruebas con ratones y monos animó a los investigadores a preparar la próxima, así llamada, fase-Ib de prueba con niños con Duchenne que empezara en el 2008 o 2009. Después de esta prueba de la técnica de entrega regional, los niños participantes pudieran caminar más tiempo que sin el tratamiento y así obtener una mejora importante de su calidad de vida.

Rodino-Klapac LR, Janssen ML, et al. and Mendell JJ. A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Translational Medicine*, 2007;5;45.

Transferencia del gen de la distrofina con plasmidos.

En cooperación con la Asociación Francesa de Distrofia Muscular (AFM), la compañía Transgène en Estrasburgo

empezó en 1995 a probar la transferencia del gen de la distrofina con plásmidos vectores. Este trabajo fue dirigido en ese tiempo por el Dr. **Serge Braun**, quien es ahora Director Científico de la AFM. Para esta técnica, el ADN combinado de los 79 exones del gen de la distrofina normal, su ADNc y sus estructuras controladoras, fueron insertadas en el material genético de plásmidos. Los plásmidos son pequeñas estructuras circulares de ADN sin proteínas, *ADN desnudo*, dentro de las bacterias, a las que otorgan principalmente resistencia contra los antibióticos.

Después de experimentos preliminares exitosos en cultivos de células de músculo, y con ratones y perros distróficos, una primera prueba clínica empezó a finales del 2000 con 9 pacientes con Duchenne y Becker, eran todos mayores de 15 años porque tuvieron que dar su consentimiento informado. La solución de plásmidos 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 plásmido, 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 plásmido 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.

Tan pronto como suficientes plásmidos vectores con material genético de distrofina estén disponibles, una prueba clínica con pacientes con Duchenne que usara este nuevo sistema de entrega será empezada, debido a que este acercamiento de plásmido de distrofina de largo completo necesita ser desarrollado adicionalmente para pacientes que no son elegibles para la omisión de exón.

Transferencia de células miogénicas. El Prof. **Jacques Tremblay** y sus colegas en la Universidad Laval en Québec City, Canada, están continuamente trabajando con la técnica de transferencia de mioblastos, ahora llamada *transplante de células miogénicas*.

Regeneración muscular con células madres embrionarias diferenciadas. Durante el desarrollo de un embrión, los precursores de los músculos esqueléticos aparecen muy temprano como *somitas*, estructuras mesodermales en ambos lados del tubo neural embrional. Bajo la influencia de factores de transcripción (proteínas que controlan la actividad génica - en particular el Pax3), las células de los somitas se diferencian (dando lugar a células más especializadas) para formar, entre otras estructuras, el miotoma que se desarrolla más adelante en mioblastos, miotubos y finalmente fibras musculares. Si fuera posible preparar de somitas no-distróficos aquellas células que están destinadas a volverse el miotoma, podrían ser multiplicadas y

En una prueba clínica con 9 pacientes con Duchenne, 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 inyecciones fueron hechas en una distancia de solo 1 a 2 mm entre sí en una área pequeña del músculo de la espinilla, el *tibialis anterior*.

Este tipo de transplante celular 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 tratamientos farmacológicos; y (4), más importante, también podría ayudar a los pacientes con Duchenne más viejos.

Ya que son necesarias cerca de 100 inyecciones por centímetro cuadrado en la superficie del músculo, la técnica primero ha sido realizada en varios monos sin problemas, antes de que fuera usada en dos pacientes de Duchenne de más de 18 años. Ambos pacientes recibieron inyecciones bajo anestesia local en uno o varios músculos enteros. Uno de estos pacientes tenía 26 años en el momento del transplante celular. Dieciocho meses después, 34 % de las fibras de músculo en una biopsia muscular estaban expresando distrofina originaria del donante. En este paciente, el transplante de células miogénicas permitió duplicar la fuerza del músculo que controla el pulgar (el único músculo todavía capaz de mover este paciente). Sin embargo, debido a que el paciente sabía que había sido inyectado con células en este músculo, es posible que parte del aumento de la fuerza sea atribuible a un efecto de placebo. El segundo paciente de 18 años de edad, recibió células miogénicas solo en un músculo involucrado en mover la muñeca. Tuvo un aumento pequeño de la fuerza después de 3 meses pero no fue observado aumento de la fuerza después de 6 meses. Ninguna fibra positiva de distrofina fue observada en la biopsia muscular de este paciente después de 6 meses y señales de rechazo celular fueron detectadas. Ambos pacientes dijeron que aceptarían recibir inyecciones adicionales en otros músculos sin titubeo.

El Dr. **Tremblay** y sus colegas están tratando ahora de bloquear la miostatina en combinación con el transplante de células miogénicas, y también están desarrollando una técnica tolerigénica para evitar el uso a largo plazo de fármacos inmunosupresores.

Células madre

luego usarse para regenerar las células de músculo distróficas, porque traerían consigo el gen de la distrofina intacto.

La Profa. **Rita Perlingeiro** y su equipo en el Centro Médico de la Universidad Southwestern de Texas en Dallas, trataron de aislar tales células tempranas, células somitas, de células madre embrionarias en cultivos de células. Ellos descubrieron que para obtener entre ellas células miogénicas (formadoras de músculo), las células madre embrionarias diferenciadas necesitaban el factor de transcripción Pax3, cuyo gen pudo ser introducido en el cromosoma-X de las células madre por técnicas genéticas. Usando citometría de flujo (un método de clasificación

celular), los investigadores pudieron aislar células miogénicas de estas células madre embrionarias inducidas por el Pax3 que se había diferenciado durante cinco días. Las células que tenían el receptor alfa-PDGF y no el receptor Flk-1, generaron una población de células que produjo solamente fibras musculares sin el riesgo de la formación de cáncer.

Células con estas propiedades, fueron multiplicadas y luego inyectadas localmente en el músculo tibialis anterior y en la circulación sanguínea de ratones mdx. Nueva distrofina apareció en 11 % a 16 % de todas las fibras musculares y estaba acompañada de un aumento importante en la fuerza muscular. Ya que, como ha sido mostrado en otros experimentos de terapia génica con ratones mdx, no todas las fibras en un músculo tienen que contener distrofina para un efecto terapéutico importante, los resultados de este enfoque de células madre podrían resultar en una terapia eficaz de distrofia Duchenne.

Darabi R, Gehlbach K, Bachoo RM, et al. and Perlingeiro RCR. Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nature Medicine*, 2008;14:134-143.

Regeneración muscular con células madre de músculo.

Las células madre a ser usadas para una terapia de Duchenne deben tener las siguientes propiedades: (1) Deben ser fáciles de aislar de material biológico humano como tejido muscular; (2) deben ser fáciles de multiplicar en el laboratorio a las cantidades necesarias para un tratamiento sistémico de chicos; (3) debe ser posible transferir las secuencias del gen de la distrofina "sanas" en ellos con vectores virales; (4) la entrega sistémica en la circulación sanguínea debe ser posible; (5) tienen que ser capaces de emigrar de la circulación sanguínea a los músculos; (6) deben dar a lugar a cantidades grandes de células musculares funcionales con distrofina y con células satélite funcionales dentro del tejido del músculo distrófico, y (7) no deben producir ningunos efectos secundarios serios, especialmente ningún cáncer. Dos tipos de células han sido identificadas que al parecer tienen estas propiedades y que son células madre adultas y no embrionarias: Los *mesoangioblastos* y *pericitos*, que se localizan en el exterior de vasos sanguíneos pequeños dentro del tejido muscular de donde pueden ser aislados.

Después de experimentos positivos preliminares con mesoangioblastos en ratones que carecían de la proteína *alfa-sarcoglicano*, el Prof. **Giulio Cossu** y sus colegas en el Instituto de Célula Madre del Hospital San Raffaele en Milán aislaron células similares llamadas *pericitos* de las paredes de vasos capilares (pequeños vasos sanguíneos) dentro de tejido muscular humano normal y distrófico, y los inyectaron sistémicamente en ratones mdx cuyo sistema inmunológico fue desactivado. Antes de que los pericitos distróficos fueran inyectados, fueron tratados con vectores virales que contenían mini-genes de la distrofina. En ambos casos, muchas fibras musculares de los ratones mdx tenían nueva distrofina y su función muscular fue mejorada significativamente.

Como próximo paso hacia una aplicación humana, el equipo del Dr. Cossu trató a cuatro perros distróficos sistémicamente con células de su propio tejido muscular (un tratamiento autólogo) en las que el gen para micro-distro-

fina humana fue transferido, y a seis perros con células de perros sanos (un tratamiento de heterólogo) que contenían distrofina normal, pero que requerían inmunosupresión con ciclosporina. Los resultados eran mucho mejores después del tratamiento heterólogo, que después del tratamiento autólogo. Un perro que recibió las células por un catéter en la aorta estaba caminando bien cinco meses después del final de cinco tratamientos semanales. Los otros cinco perros se recuperaron más despacio.

Experimentos autólogos en perros están ahora siendo repetidos con células madre que contienen secuencias del gen de la distrofina más largas. Algunos experimentos de control también se realizaron para determinar el efecto solo de la ciclosporina, y para ver si las células satélite sobre las nuevas fibras musculares son también funcionales. Después de pruebas a largo plazo adicionales, otra vez con perros, y la preparación de células en grado clínico, una fase I de prueba clínica con pacientes de Duchenne será iniciada para checar la seguridad y apariencia de al menos algo de la nueva distrofina.

Regeneración muscular con células madre genéticamente tratadas con omisión de exón.

Los equipos de investigación del Prof. **Luis García** en el Instituto Génethon en Évry cerca de París y el Prof. **Yvan Torrente** en el Laboratorio de Célula Madre de la Universidad de Milán, trabajaron en conjunto para una nueva terapia de distrofia Duchenne: aislaron células madre de músculos de pacientes con Duchenne, repararon su gen de la distrofina con un método genético de omisión de exón, las transfirieron en ratones mdx donde regeneraron sus fibras musculares y mejoraron los síntomas distróficos significativamente.

Lo siguiente es un resumen breve muy simplificado de una estrategia de investigación muy complicada que necesitaba muchos controles bioquímicos y experimentos de actividad, y pruebas adicionales también biológicas para la función muscular.

Las células madre, principalmente células satélite, fueron obtenidas del material de músculo biopsiado de niños con Duchenne cuyo gen de la distrofina tenía una delección de los exones 49 y 50. Para sus experimentos, los investigadores Franco-italianos usaron solamente aquel cerca de 1% de células que contenían la proteína marcadora CD133 en sus membranas: Estas células había sido demostrado antes, son capaces de reparar las células musculares y formar nuevos tejidos en el músculo dañado. Las células positivas de CD133 fueron multiplicadas en cultivos de células en el laboratorio, y luego tratadas con un vector transformante de lentivirus que llevaba en su material genético genes de dos oligorribonucleótidos en antisentido para omitir el exón 51, en una manera similar a lo hecho (y descrito en la página 5) para la omisión genética del exón 23 en ratones mdx.

Veinticuatro horas antes de los experimentos con ratones scid/mdx de dos meses, que no tenían ni distrofina, ni un sistema inmune funcionando, los animales fueron fatigados por ejercicio de natación para intensificar su proceso de degeneración-regeneración muscular. Veinticuatro de estos ratones recibieron de 20,000 a 40,000 de las células madre humanas manipuladas genéticamente de un niño con Duchenne a nivel local en un músculo tibialis anterior con tres inyecciones. Seis otros ratones fueron tratados

sistemicamente por la inyección de 500,000 de estas células madre en la arteria femoral de una pata. A los 21 y 45 días después de estas inyecciones locales y sistémicas, muchas pruebas fueron realizadas para valorar el resultado de esta terapia génica complicada.

Los resultados indicaban una mejor regeneración muscular, una gran cantidad de la distrofina esperada en las fibras regeneradas sin los aminoácidos determinados por los exones 49, 50 y 51, una mejora morfológica (su estructura) del músculo, y restauración significativa de la función muscular.

Esta técnica que está relacionada con el enfoque directo de omisión de exón genética como se menciona en la pa-

na 5, porque usa el mismo sistema U-7, abre una nueva estrategia para una terapia de Duchenne. Sin embargo, antes de que pruebas clínicas puedan ser consideradas, el mecanismo exacto de omisión de exón con vectores lentivirales tiene que ser comprendido completamente, porque estos virus con su carga entran en el material genético de las células musculares en una manera aleatoria, y posiblemente pueden alterar otros genes o aun producir tumores.

Benchaouir R, Merigalli M, Farini A, et al. and García L, Torrente Y. Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Stem Cell* 2007; 1; 646-657.

Enfoques Farmacológicos

Tratamiento con Corticoesteroide. En la reunión anual de ActionDuchenne en Londres en Noviembre del 2007, el Prof. *Adnan Manzur* del Hospital Hammersmith en Londres dio una visión general del estado actual del tratamiento con corticoides, actualmente el único tratamiento farmacológico probado capaz de preservar o mantener los músculos de chicos con Duchenne por un tiempo limitado. Este tipo de tratamiento es ahora considerado el "estándar de oro" al que los otros tratamientos en desarrollo son comparados.

Hasta ahora, 47 estudios clínicos han sido realizados en muchos países, pero solamente seis de ellos eran estudios doble-ciego científicamente importantes con resultados completamente publicados. En la mayoría de los estudios, la aplicación diaria de los fármacos fue investigada, pero algunos otros regímenes, como 10 días con medicación seguido de 10 días sin ella ("10 días con, 10 días sin"), o medicación durante solamente 10 días consecutivos cada mes también fueron probados. Algunos de los resultados más importantes son:

Los primeros de los estudios doble-ciego fueron realizados en 1991 por *Fenichel* et al. en los EUA con 99 niños que recibieron 0.75 mg/kg/día de prednisona durante dos años. Los resultados mostraban por primera vez de manera científicamente segura, que este tratamiento mejoró y estabilizó la fuerza muscular de niños con Duchenne durante cerca de tres años. Pero 73 % de los niños tenían efectos secundarios, mayormente aumento de peso excesivo.

En un estudio doble-ciego en Alemania por *Reitter* et al. en el 2000, los dos fármacos corticoides prednisona y deflazacort fueron probados en 100 niños. El aumento de peso era significativamente más alto en los niños tratados con prednisona que en aquellos tratados con deflazacort. Pero el deflazacort resultó en mucho más cataratas (turbiedad en los lentes del ojo) algo benignas que la prednisona. Este estudio no ha sido publicado completamente.

En el 2006 *Biggar* et al. en Canadá publico los resultados de un estudio a largo plazo pero abierto con 74 chicos entre 10 a 18 años de edad, 40 de ellos fueron tratados diariamente con 0.9 mg/kg/día de deflazacort por un tiempo promedio de 5.5 años. Los 34 niños no-tratados perdieron su caminar a los 9.8 años. De los niños tratados, 81 % todavía podían caminar a los 12 años, 76 % a los 15 años, y 30 % a los 18 años. La función respiratoria y del corazón se mantuvo significativamente mejor, y la escoliosis

(deformación de la columna vertebral) se desarrolló menos a menudo en los niños tratados.

King et al. en EUA reviso en el 2007 la historia clínica de 143 chicos, 75 de ellos fueron tratados diariamente principalmente con deflazacort durante un promedio de 8 años, y 68 no fueron tratados. Los chicos tratados podían caminar 3.3 años más tiempo y tenían un riesgo significativamente reducido de escoliosis que aquellos sin tratar. Pero tenían un riesgo aumentado de fracturas vertebrales y de miembro inferiores, atribuibles a la osteoporosis comparado con los chicos sin tratar.

El Dr. Manzur concluyó su análisis con el siguiente mensaje: El uso a largo plazo de los corticoides prednisona (y la muy similar prednisolona) y deflazacort mejora la fuerza y función muscular, y prolonga el caminar durante varios años, mejora la función respiratoria y del corazón, baja el riesgo de escoliosis y aumenta la calidad de vida. Los efectos positivos parecen ser más pronunciado si el tratamiento es empezado temprano, cerca de los cuatro años, y si los fármacos son dados diariamente. Los efectos secundarios, especialmente de la prednisona, son apetito aumentado que puede resultar en aumento de peso excesivo y cara cushingoide (cara de luna), a menos que una dieta rica en proteínas y baja en grasas y carbohidratos sea seguida estrictamente desde el inicio del tratamiento. Ambos fármacos resultan en crecimiento reducido y riesgo incrementado de fracturas de huesos, y algunos cambios conductuales. El deflazacort da lugar a algunas cataratas algo benignas que no necesitan ser tratadas.

Como investigación adicional es necesitada, la *red clínica North Star*, una colaboración de 15 centros en el R.U. con las organizaciones británicas de padres Muscular Dystrophy Campaign y ActionDuchenne, planea optimizar y estandarizar la terapia con corticoides de niños con Duchenne ambulantes creando una base de datos clínica nacional, y ofrecer el tratamiento con corticoides diario e intermitente a todos los niños con Duchenne de cuatro años edad hacia adelante, o incluso más temprano, con revisiones científicas y clínicas e investigaciones antes, durante y después del tratamiento.

TREAT-NMD, la red neuromuscular Europea, ha publicado 8 páginas de recomendaciones preliminares para estándares del cuidado en distrofia muscular Duchenne, entre ellos el uso de corticoesteroides. Este texto puede ser visto en la Internet en www.treat-nmd.eu/soc/eng/dmd/.

Fenichel GM, Florence JM, Pestronk A, Mendell JR, et al. Long-term benefit from prednisone therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 1991;12; 1874-1877.

Biggar WD, Harris VA, Eliasoph L, Alman B. Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade. *Neuromuscular Disorders* 2006; 16; 249-255.

King WM, Ruttencutter R, Nagaraja HN, et al. Orthopedic outcome of long-term daily corticoid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 2007; 68; 1607-1613.

Prueba clínica con prednisona y ciclosporina: Una prueba clínica con prednisona y ciclosporina está siendo realizada en Alemania bajo la dirección del Prof. **Rudolf Korinthenberg** en el Hospital Infantil de la Universidad de Friburgo con el objetivo de reducir posiblemente los efectos secundarios causados por la prednisona sola. La ciclosporina es un fármaco que reduce las reacciones inmunes.

Esta prueba ha empezado en 15 centros clínicos alemanes en el 2004 en la cuál 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 con un placebo en lugar de ciclosporina. Cada paciente es tratado por 15 meses. Con el fin de valorar el estudio correctamente, al menos 150 pacientes son necesitados. Han sido todos inscritos y la mayoría de ellos han terminado su tratamiento ahora.

Debido al diseño doble-ciego, ningún resultado sobre los efectos combinados de ciclosporina y prednisona estarán disponibles antes de que los datos sean analizados completamente. Sin embargo, el estudio funciona muy bien y ningún efecto secundario severo ha aparecido. La publicación de los resultados es esperada al final del 2008.

Aumento de la utrofina para reemplazar la distrofina.

La utrofina es una proteína con una estructura y función muy similar a la distrofina. En humanos, su gen está ubicado en el cromosoma 6, tiene 75 exones, y es aproximadamente de un millón de pares de bases de largo. La utrofina está presente en varios tejidos del cuerpo, también en el músculo humano, pero está concentrada en las *junciones neuromusculares*, donde los nervios motores hacen contacto con las membranas del músculo. Durante el desarrollo fetal del niño a las 12 semanas, las membranas musculares contienen ambas, utrofina y distrofina, luego la utrofina desaparece hasta que en el parto solamente la distrofina queda. Por lo tanto, la utrofina es una forma fetal de la distrofina.

Los ratones mdx cuyo gen de la utrofina fue inactivado experimentalmente, que no tienen ni distrofina ni utrofina en sus músculos, tienen síntomas como de Duchenne y se mueren temprano, en contraste con "la normalidad" de ratones mdx cuyos músculos indican un daño menos severo a pesar de la ausencia de distrofina. Incrementando la cantidad de utrofina por un factor de tres a cuatro veces con técnicas genéticas, que no puede ser usada en humanos, el desarrollo de los síntomas distróficos algo ligeros de los ratones mdx podían ser prevenidos. En pacientes con Duchenne, la utrofina empieza a extenderse de las *junciones neuromusculares* a las membranas musculares, y cuanta

más utrofina un paciente tiene, él más tarde debe usar una silla de ruedas. Esto significa que la activación del gen de la utrofina pudiera llevar a un tratamiento para distrofia Duchenne.

La utrofina existe en dos formas similares, pero solo la *utrofina-A* se localiza exclusivamente en cantidades algo pequeñas en las junciones neuromusculares de todas las células musculares. Los investigadores empezaron a buscar sustancias que podían activar el gen de la utrofina-A, y luego dirigir esta proteína a las membranas celulares de músculo donde ocuparía los sitios desocupados por la distrofina en niños con Duchenne.

Este trabajo de investigación y desarrollo fue empezado por la Profa. Dama **Kay Davies** de la Universidad de Oxford, y ahora está siendo continuado por la compañía *Summit plc* cerca de Oxford bajo la dirección del Dr. **Jon Tinsley**. a finales del 2007, más de 30,000 compuestos químicos habían sido analizados por su habilidad de aumentar la actividad del gen de la utrofina en los cultivos de tejido de ratones mdx. Un número de compuestos activos fueron identificados y los más prometedores están ahora siendo optimizadas y evaluados en ratones mdx vivos con el objetivo de incrementar la cantidad de utrofina-A suficientemente en todos los músculos de los animales.

Pruebas de búsqueda adicionales con el pez cebra distrófico están en curso que posiblemente identificaran otros fármacos para tratar la distrofia Duchenne. Los embriones del pez cebra son muy pequeños (2-3 mm), transparentes y completamente desarrollados en 24 horas. La estructura del músculo puede ser vista fácilmente y analizada bajo el microscopio cuando se ve bajo luz polarizada. La patología muscular (la estructura muscular afectada) de los embriones sin distrofina es muy similar al músculo con Duchenne.

Después de la optimización, uno de los compuestos más activos, el SMT C1100, condujo al recobramiento de la función muscular en ratones mdx, porque su degeneración, fibrosis, deposición de grasa, e inflamación crónica fue reducida significativamente. Después de las inyecciones diarias durante 28 días, ningún efecto secundario apareció. Si la toxicología y manufactura preclínica en curso son exitosas, pruebas de seguridad con voluntarios sanos podrían empezar en el 2008, seguido de pruebas con pacientes con Duchenne en el 2009.

Aumento de la utrofina con biglicano. Durante el desarrollo, la proteína biglicano está presente en el exterior de los músculos esqueléticos y del corazón, y conecta con sus dos extremos a las proteínas alfa- y gama-sarcoglicano, que son dos componentes del complejo distrófico-proteico en las membranas celulares del músculo. El biglicano es importante para la regulación de muchas proteínas señaladoras y estructurales de las membranas. Experimentos hechos por el Prof. **Justin Fallon** y sus colegas en la Universidad Brown en Providence, Rhode Island, con ratones no-distróficos cuyo gen para el biglicano fue desactivado, mostraban que en ausencia del biglicano muchas proteínas del complejo distrófico habían desaparecido. Tratando a estos ratones con inyecciones locales y sistémicas de biglicano recombinante humano, artificialmente hecho, resultó en la reaparición de la proteína beta-sintrofina y alfa-distrobrevina, que era un indicativo de que el complejo dis-

trófino fue restituido. El descubrimiento más sorprendente fue que dos a tres semanas después de inyecciones sistémicas solas de biglicano humano en ratones mdx, su normal nivel bajo de utrofina en el músculo tratado fue aumentado aproximadamente cerca de 2.5 veces. Después de tres meses de repetidas inyecciones sistémicas con biglicano humano, los músculos de estos ratones sin distrofina eran mucho más resistentes al daño causado por alargamiento forzado y contracciones.

Como las dos proteínas a las que el biglicano se une, están solamente presente en los músculos esqueléticos y cardíacos, el biglicano puede estar activo principalmente en estos dos tipos de músculos, y por lo tanto tendría efectos secundarios mínimos. No se espera un rechazo inmune sea un problema porque el biglicano está presente en el desarrollo en humanos. Debido a que actúa fuera de las células musculares, no tiene que cruzar las membranas del músculo cuando se usa como un agente terapéutico.

Los experimentos con animales continuarán para optimizar las condiciones de tratamiento. Y después que suficiente biglicano humano de pureza grado clínico este disponible, una fase I de prueba clínica podría ser empezada en cerca de dos años.

Transferencia del gen de la utrofina. El Prof. *George Karpati* y sus colegas de trabajo en la Universidad McGill en Montreal, Canadá, transfirieron el gen entero de la utrofina con una sola inyección de un sistema vector de adenovirus en el músculo tibialis anterior de ratones mdx recién nacidos y adultos. Después, 58 % de las fibras del músculo inyectado en los recién nacidos y 35 % en los ratones adultos contenían utrofina en los lugares debajo de las membranas normalmente ocupadas por la distrofina en ratones sanos. Las proteínas del complejo asociado con la distrofina fueron restituidas por hasta un año.

La nueva utrofina en las membranas celulares previno la necrosis (el daño distrófico) del músculo inyectado en los ratones mdx recién nacidos, y la paró en los adultos. Pruebas fisiológicas mostraban que la función del músculo entero tratado fue mejorada. Como la utrofina está normalmente presente en las uniones nervio-músculo, ninguna respuesta inmune apareció contra la nueva utrofina.

Sin embargo, la cantidad aumentada de utrofina en los ratones adultos, pero no en los ratones recién nacidos, disminuyó con el tiempo. Ésta es una señal de que tal tratamiento genético, si pudiera ser repetido con éxito en niños, debe ser aplicado tan temprano como sea posible en pacientes con Duchenne.

Deal JR, Danialou G, Laroche N, et al., and Karpati G. Successful compensation for dystrophin deficiency by a helper-dependent adenovirus expressing full-length utrophin. *Molecular Therapy* 2007; 15; 1767-74.

Leer a través de los codones de parada prematuros con PTC124. Cerca del 13 a 15 % de los pacientes con Duchenne tienen una mutación sin sentido en su gen de la distrofina. Este tipo de mutación es un cambio de un solo punto que resulta en la introducción de un codón de parada prematuro en el ARNm de la distrofina. Tal codón de parada prematuro causa que la síntesis de la proteína se detenga prematuramente antes que la nueva distrofina sea ensamblada completamente. La distrofina incompleta es de-

masiado corta para cumplir su función normal, es destruida, y la distrofia muscular Duchenne se desarrolla.

PTC Therapeutics en South Plainfield, Nueva Jersey, bajo la dirección del Dr *Langdon Miller* - desarrolló el fármaco, *PTC124*, que permite al sistema creador de proteína en la célula leer a través de tal codón de parada prematuro en el ARNm, para que la proteína de largo completo pueda ser hecha. Tal tratamiento es diferente de la terapia génica u omisión de exón. Para determinar si un niño con distrofia muscular Duchenne puede beneficiarse del *PTC124*, la presencia de una mutación de parada prematura debe ser demostrada por análisis genético.

Detalles sobre este nuevo fármaco, incluyendo su estructura molecular, han sido publicados en la revista *Nature* en Mayo del 2007 con un comentario. El *PTC124* es un polvo cristalino blanco que puede ser tomado por vía oral después de mezclarse con agua o leche. El *PTC124* fue descubierto usando un programa automático de búsqueda, en el que cerca de 800,000 compuestos de bajo peso molecular se probaron por su habilidad de leer a través. Uno de los más eficaces entre los compuestos activos, el *PTC124*, fue optimizado químicamente y luego extensamente probado en el laboratorio. En los experimentos pre-clínicos en cultivos de músculo, distrofina fue producida. En ratones mdx, que tienen un codón de parada prematuro en su exón 23 de su gen de la distrofina, fue mostrado que el *PTC124* inducía la producción de distrofina de largo completo, resultando en la reducción del daño durante la contracción muscular, y reducción de la actividad de la creatina kinasa en la sangre. Por lo tanto, el *PTC124* puede ayudar a las células de musculares para superar una de las causas genéticas de la distrofia muscular Duchenne.

El *PTC124* no lee a través de los codones de parada normales que tienen un ambiente estructural diferente comparado con los codones de parada prematuros. Los estudios de toxicidad en ratones, ratas, y perros con dosis altas del fármaco han indicado un perfil aceptable para el desarrollo clínico continuado del fármaco.

Una fase I de prueba clínica con el *PTC124* fue realizada en 61 voluntarios adultos sanos de 18 a 30 años de edad quienes recibieron el fármaco 3 veces al día durante 2 semanas. Con este tratamiento, concentraciones de plasma de 2 a 10 microgramos/ml pudo ser mantenida como se sabía era activa en ratones mdx. Dosis de hasta 100 mg/kg/día fueron toleradas bien por estos adultos sanos sin efectos secundarios serios. Esta es una dosis mayor que la planeada a ser dada a niños con Duchenne.

Estos resultados respaldaron el inicio de una fase-II de estudio clínico con chicos con Duchenne, el cuál fue realizado entre diciembre del 2005 y mayo del 2007, y donde participaron 38 chicos, de 5 a 17 años. Eran un grupo representativo de pacientes, 33 todavía podían caminar, 29 recibían corticoides, 26 tenían el codón de parada UGA, 6 el UAG, y 6 el UAA entre los exones 6 a 70. La prueba no fue diseñada para producir ningún beneficio terapéutico. Seis niños recibieron 16 mg/kg/día de *PTC*, 20 niños 40 mg/kg/día, y 12 niños 80 mg/kg/día divididos en 3 porciones por día. Los pacientes fueron valorados clínicamente por más de 21 días antes del tratamiento, entonces recibieron el fármaco por 28 días y finalmente seguían exámenes durante 28 días.

Biopsias musculares fueron realizadas antes y después del tratamiento en los músculos del pie *extensor digitorum brevis* (EDB) para buscar la restauración de la producción de distrofina de largo completo. Antes del tratamiento, el tejido muscular de su biopsia inicial fue tratado con PTC 124 en el laboratorio. Los aumentos esperados dependientes de la dosis en la cantidad de distrofina de largo completo fueron detectados en los tejidos de todos los niños cuando se probaron en el laboratorio.

Los análisis del tejido muscular de las biopsias después del tratamiento detectaron en 19 de los 38 niños, aumentos cualitativos de nueva distrofina expresados en niveles bajos. Las razones principales por qué nueva distrofina no fue encontrada en todos los chicos y no en grandes cantidades, podría ser que el período de tratamiento fue demasiado corto y que el músculo EDB no era probablemente el mejor a ser analizado porque tenía tal nivel bajo de la degeneración y la regeneración. Sin embargo, todos chicos mostraron una reducción del nivel de CK sanguíneo durante el tratamiento. La CK sanguínea aumentó otra vez después del tratamiento como era esperado para un fármaco que tenía que ser tomado constantemente.

Algunos padres y profesores observaron que 2 a 4 semanas después del algo corto tratamiento, los niños mostraron mayor actividad, incrementaron la resistencia, y menos fatiga que antes del tratamiento. Mientras estos resultados anecdóticos deben ser considerados cautelosamente, el tiempo del curso de los cambios sintomáticos indicaba un efecto del fármaco. Algunos efectos adversos leves o regulares fueron observados, pero éstos no eran claramente causados por el PTC124 y no son clínicamente relevantes.

Para comprender el riesgo a largo plazo y los beneficios del PTC124, una prueba clínica fase-IIb a largo plazo controlada aleatoriamente está siendo empezada ahora. Esta prueba inscribirá a 165 pacientes que al menos tengan 5 años de edad y todavía caminen (capaz de recorrer más de 75 metros). Niños que están con corticoesteroides serán permitidos para continuar ese tratamiento. Los participantes serán seleccionados aleatoriamente en uno de 3 grupos de estudio: alta dosis de PTC124, baja dosis de PTC124, o placebo. El tratamiento continuará durante 48 semanas. El resultado de medición principal será la distancia en la que los niños pueden caminar 6 minutos, comparando los resultados antes del tratamiento con la misma medición durante el tratamiento. Habrá 10 mediciones de resultado secundarias adicionales. Después del término de la prueba, todos los pacientes, incluyendo éstos que estaban con placebo, recibirán terapia a largo plazo con la dosis más alta de PTC124.

Para esta prueba, un comité directivo internacional ha sido establecido que organizará y supervisará la colaboración de muchos centros clínicos en Europa, Australia, Israel, Canadá y los Estados Unidos. La Dra. *Kate Bushby* y *Thomas Voit* son los expertos europeos en distrofia muscular Duchenne que están participando en el comité directivo. La prueba está en curso en los EUA y será pronto abierta en otros países. Si esta prueba grande fase-IIb indica buenos efectos terapéuticos, la aprobación de comercialización será pedida a las agencias reguladoras FDA en los Estados Unidos y EMEA en Europa.

Welch EM, Barton ER, Zhuo J. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 2007; 447;87-91.

Schmitz A, Famulok M. Ignore the nonsense. *Nature* 2007;447;42-3.

El Proyecto Catalyst es un programa de *PTC Therapeutics* para descubrir y desarrollar compuestos químicos pequeños como fármacos para una terapia de distrofia muscular Duchenne.

El Proyecto Catalyst, dirigido por la **Dra. Ellen Welch**, se creó en mayo del 2004 para identificar con métodos de búsqueda automática entre varios cientos de miles de compuestos aquellos que podían aumentar o disminuir la producción, la *expresión*, de cuatro objetivos biológicos en las células musculares y así, mantener y mejorar la estructura y función muscular en pacientes de Duchenne. La disminución de la *miostatina* y el aumento del *factor de crecimiento similar a la insulina* IGF-1 promoverían el crecimiento y regeneración muscular. El aumento de la *utrofina* e *integrina-alfa7* estabilizaría la membrana muscular y mejoraría la función muscular por lo tanto.

Los métodos de búsqueda automática para encontrar estos fármacos potenciales para Duchenne, usan un nuevo procedimiento de prueba desarrollado que mide la intensidad de luz de una proteína reportera, la enzima luciferasa de luciérnagas. Un pequeño número de compuestos con al menos algunas de las propiedades deseadas han sido ahora optimizados en el laboratorio. Adicionalmente, trabajo fue iniciado en otra proteína objetivo, el retículo sarcoplásmico Ca^{2+} ATPasa (SERCA2a) para ayudar mantener la correcta función contráctil del corazón. Estos fármacos potenciales muy prometedores serán optimizados más adelante para que una fase I de estudio clínico con niños con Duchenne pueda empezar en un futuro próximo.

Inhibición de la miostatina. La *miostatina* es producida en las células musculares como una proteína inactiva que consta de 375 aminoácidos. Circula en el flujo sanguíneo como una molécula inactiva. Cuando el así llamado *pro-peptido* es degradado, la *miostatina* es activada y se une a una proteína receptora, llamada *activina tipo II*, en la membrana celular del músculo. La unión con el receptor de la *miostatina* inicia una cadena (una cascada) de reacciones químicas que alcanza el núcleo de la célula muscular y bloquea los genes formadores de músculo. Por lo tanto, la *miostatina* limita el crecimiento de los músculos.

Hay un ganado vacuno, la raza Azul Belga, y perros, los bully whippets, que son muy musculosos porque su gen de la *miostatina* fue desactivado por una mutación. Y en Berlín, un niño físicamente muy fuerte sin *miostatina* fue identificado en 1999, cuyos músculos esqueléticos son dos veces mas grandes de los de un niño normal.

Bloquear la miostatina con un anticuerpo. Ratones mdx adultos con el gen de la *miostatina* desactivado, que además de no tener distrofina tampoco podían hacer *miostatina*, tenían fibras musculares más normales, menos fibrosis (tejido cicatrizante), y regeneraron sus músculos más rápido que los ratones mdx "normales", como mostró la Profa. **Kathryn Wagner** del Centro Wellstone de Distrofia Muscular en la Universidad Johns Hopkins en Baltimore y su equipo de investigación. Esto y los casos antes

mencionados indican que la reducción o inhibición de la miostatina estimularía la regeneración de las fibras musculares de chicos con Duchenne, con el fin de que no degeneren tan rápido o podrían aumentar incluso de tamaño.

La compañía *Wyeth Pharmaceuticals* en Collegeville cerca de Filadelfia, en cooperación con la Dra. Wagner, recientemente publicó una fase I/II de prueba clínica con Myo 029, un *anticuerpo humano* específico contra la miostatina que es inyectado sistémicamente. La prueba fue dirigida en 116 adultos con distrofia muscular, incluyendo pacientes de Becker, quienes recibieron MYO-029 intravenoso en cuatro dosis entre 1 y 30 mg/kg cada dos semanas durante 24 semanas, seguido de 12 semanas de supervisión clínica. El objetivo de esta fase I/II de prueba clínica era valorar la seguridad y probar alguna eficacia. Los resultados mostrados fue que el MYO-029 era seguro en dosis estudiadas y se deseaba alcanzar el objetivo intencional de aumentos en la masa muscular en la población de Becker. Sin embargo, la mejora en la función muscular no fue mostrada en este estudio de seis meses. Pruebas clínicas adicionales con otros inhibidores de miostatina son planeados por algunas compañías farmacéuticas en los EUA.

Wagner KR, Fleckenstein JL, Amato AA, et al. and Mendell JR. A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann. Neurology* 2008; March 11

Detener la miostatina con su propéptido. El Prof. *Keith Foster* en la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad de Londres y sus colegas, usaron un propéptido estabilizado para unirse a la miostatina y así desactivarla. Transfirieron el propéptido con plásmidos (ADN desnudo) localmente en un único músculo de ratones no-distróficos, o sistémicamente con un vector AAV8 en su circulación sanguínea. En ambos casos, después de diez semanas, el tamaño de las fibras musculares y la función muscular aumentaron cerca de 20-30 %, predominantemente en los músculos lentos. Sin embargo, el mismo tratamiento en ratones mdx no resultó en incremento muscular y mejor función. Una transferencia viral simultánea de propéptido y micro-distrofina no mostró tampoco beneficio en ratones mdx. Pero esta combinación podría ser una futura estrategia terapéutica para producir nuevas fibras e incrementarlas al mismo tiempo. Los ratones mdx probablemente necesitan dosis más altas, porque producen más miostatina que los ratones no-distróficos. Esto está siendo investigado actualmente.

Incrementar la masa y fuerza muscular deteniendo la miostatina con follistatina. La *follistatina-344* es una proteína similar a una hormona que consta de una cadena de 344 aminoácidos que es activada por la follistatina-315, cortándole 29 aminoácidos de su extremo carboxilo. La follistatina-315 junto otras dos proteínas similares, la proteína relacionada a la follistatina (FLRG) y el factor de crecimiento y diferenciación asociado con la proteína-1 (GASP-1) del suero, están involucradas en la regulación de la actividad de la miostatina directamente bloqueando la activina, su receptor, e indirectamente también otras, todavía desconocidas vías de reacción.

El Prof. Asist. *Brian Kaspar* del Hospital Infantil Nacional y la Universidad de Ohio State en Columbus, Ohio, y sus colegas, transfirió los tres genes de la follistatina-

344, FLRG y GASP-1 humanos con vectores AAV-tipo-1 localmente en los músculos solos, cuádriceps y tibial anterior, de ratones normales y mdx. Para la comparación, proteína fluorescente verde fue transferida bajo las mismas condiciones. La inyección de 100 mil millones (10^{11}) de vectores AAV1 en ratones normales de 4 semanas resultó, después de 725 días (casi 2 años), en un aumento de la masa corporal con una observable mejora gruesa de los músculos, no sólo aquellos inyectados, sino también en otros como los tríceps, lo que significa que este tratamiento algo local también podía afectar otros músculos. La fuerza muscular general del animal entero fue incrementada, medida por la prueba de fuerza de agarre funcional.

Para evaluar un enfoque más significativo para un tratamiento posterior de chicos con Duchenne, experimentos similares fueron hechos con ratones mdx usando dosis únicas de 10 o 100 mil millones de partículas de virus. Estos ratones distróficos tenían tres semanas cuando los inyectaron y luego valorados después de cinco meses, o - y esto es muy importante para una aplicación posterior de esta técnica para pacientes de Duchenne más viejos - fueron inyectados una vez cuando tenían 210 días de edad (siete meses), cuando ya tenían síntomas importantes de su enfermedad, y luego eran observados hasta que tenían 560 días de edad (aproximadamente 1 año $\frac{1}{2}$). 60 días después de la inyección, mostraron aumento de la fuerza muscular que persistió hasta el final del estudio.

En todos estos experimentos, ningún problema de seguridad obvio apareció con el material del virus o con las proteínas terapéuticas, la follistatina y las otras dos. El resultado era músculos robustos con el tamaño de la fibra muscular aumentado, la inflamación reducida, y menos fibrosis comparado con ratones mdx no-tratados de control.

El equipo del Prof. Kaspar terminó su publicación con las palabras: "La habilidad sorprendente de la follistatina de proveer mejoras funcionales a largo plazo a músculos de animales distróficos envejecidos justifica su consideración para el desarrollo clínico para tratar enfermedades músculoesqueléticas, incluyendo pacientes de Duchenne más viejos".

Haidet AM, Rizo L, Handy C, et al. and Mendell JR, Kaspar BK. Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sciences* 2008; 105; 4318-4322.

Inhibición del TGF-beta. El factor de crecimiento transformante beta (TGF β) es una proteína que inhibe a las células satélite (células madre de músculo) de regenerar tejido muscular. Los ratones mdx y también los niños con Duchenne tienen incrementadas las cantidades del TGF β , y esto resulta en fibrosis (tejido cicatrizante), que es causado por la producción excesiva de tejido conectivo y su deposición entre las fibras musculares reemplazando por vez las fibras degradadas y perdidas. Bajo circunstancias normales, tejido conectivo mantiene las fibras musculares juntas, pero niveles aumentados resultan en rigidez del músculo y contracturas. El tejido conectivo consta principalmente de la proteína colágeno, una molécula poco elástica que es generada por los fibroblastos. Por lo tanto, inhibir la actividad del TGF β con fármacos podría ser una manera

posible de reducir la fibrosis.

El Prof. **Andrew Hoey** de la Universidad de Southern Queensland en Toowoomba, Australia, y sus colegas evaluaron la *pirfenidona*, que es una medicación aprobada para el tratamiento de la fibrosis en los pulmones. A ratones mdx de ocho meses de edad se les administró este fármaco y después de siete meses el tratamiento, mostró niveles reducidos del TGF β y restauró la función del corazón casi a la normalidad, pero la fibrosis no era reducida en estos ratones mdx viejos. La posibilidad de que el fármaco sea más eficaz en ratones más jóvenes será revisada en futuros experimentos.

Van Erp C, Irwin NG, Hoey AJ. Long-term administration of pirfenidone improves cardiac function in mdx mice. *Muscle Nerve* 2006, 34; 727-734.

Losartan y TGF β . El Dr. **Ronald Cohn** y sus colegas en la Escuela de Medicina de la Universidad Johns Hopkins en Baltimore, están tratando de modificar la enfermedad bloqueando el TGF β y su vía de señalización que resulta en fibrosis. Empezaron su trabajo con ratones mdx viejos que tenían una distrofia muscular más progresiva que los más jóvenes. Una inyección de veneno cardiotoxic de serpiente en músculos únicos no-distróficos los dañaba; estos entonces se regeneraban dentro de dos a tres semanas. En músculos mdx, esta regeneración está significativamente reducida. El tratamiento de ratones mdx con un anticuerpo contra el TGF β mejoro el tiempo de regeneración.

Como este anticuerpo no está comercialmente disponible, los investigadores empezaron a evaluar que tanto el *Losartan*, un fármaco aprobado contra la presión alta, podía tener el mismo efecto porque bloquea el receptor de la angiotensina-II, que juega un papel en un paso más abajo en la vía de señalización que es iniciado por el TGF β . Efectivamente, pudo ser mostrado que ese tratamiento en ratones mdx de tres meses de edad con Losartan por más de un año atenuó muchos de sus síntomas distróficos, como la fibrosis en el músculo y desarrollo de fatiga en pruebas de función muscular. Los ratones no fueron curados por este tratamiento, estaban solo menos enfermos. Por lo tanto, el tratamiento con Losartan, si los resultados con niños con Duchenne pudieran mostrar ser similares a aquellos con ratones, podría ser una estrategia terapéutica similar a otros tratamientos farmacológicos que reducen los síntomas sin influir en la causa genética de la enfermedad.

El Dr. *Cohn* y su equipo están ahora preparando una prueba clínica doble-ciego con Losartan. Cerca de 100 chicos con Duchenne participaran, quienes tendran entre 5 y 15 años de edad y todavía pueden caminar. La mitad de los chicos serán tratados por un año con Losartan. La otra mitad recibirá un placebo por seis meses y luego por los siguientes seis meses también serán tratados con Losartan. Todos los chicos en ambos grupos deben continuar tomando corticoides si los hubieran tomado con regularidad antes de la prueba. La medida de resultado primaria, es decir la prueba principal para un efecto del tratamiento, será el tiempo en que caminan 30 pies (cerca de 10 metros). Los cambios en su calidad de vida y su función respiratoria estarán entre muchas otras medidas de resultado secundarias.

Los investigadores esperan empezar la prueba en algún momento del 2008. Los resultados estarán entonces disponibles cerca de dos años después. Si los resultados indican un efecto terapéutico importante, una recomendación para tomar el fármaco será hecha pública sin demora. Sin embargo, es importante enfatizar que *hasta entonces, los padres no deben dar Losartan a sus niños enfermos*, pero deben continuar su actual manejo incluyendo tratamiento con corticoides y todos los aspectos adicionales para mantenerlos en el mejor estado físico posible.

Cohn RD, van Erp C, Habashi JP, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nature Medicine* 2007; 13; 204-210.

Bloquear los agentes inflamatorios. La degradación y muerte de células musculares en la distrofia muscular causa que las células inflamatorias entren al tejido muscular a limpiar los residuos celulares. Los corticoides pueden suprimir la inflamación, y esto es probablemente una de las razones por el qué la *prednisona*, su forma activa *prednisolona*, y el relacionado *deflazacort* pueden incrementar la masa y fuerza muscular y reducir la respuesta inmune, sin embargo a menudo con algunos efectos secundarios incómodos. La Profa. **Melissa Spencer** de la Universidad de California en Los Angeles y su equipo realizan los experimentos para así encontrar las maneras de reemplazar los corticoides con fármacos para contrarrestar la inflamación y la respuesta inmune, sin sus efectos secundarios severos.

Estudios han indicado que algunas células del sistema inmune aceleran la evolución de la enfermedad. Estas segregan citocinas, moléculas que promueven la inflamación y el desarrollo de fibrosis, en músculos mdx y Duchenne. En personas sanas, éste es un proceso normal de curación de una herida que estabiliza el tejido débil y promueve la curación. En niños con Duchenne, este proceso de curación no se detiene y los músculos entran en un estado continuo de curación. Por lo tanto, se hipotetiza que la inhibición de las células inmunes y las citocinas activas pudiera disminuir la velocidad de degradación y fibrosis de músculos distróficos. Varios fármacos anti-inflamatorios aprobados por la FDA ya existen los cuales posiblemente también actúen contra estas células inmunes en distrofia Duchenne. Probando fármacos que ya están aprobados por la FDA, el tiempo de llevar estos fármacos a pruebas clínicas en Duchenne será acortado comparado con nuevos compuestos.

Tres de estos fármacos usados contra otras enfermedades están siendo en el laboratorio de la Dra. Spencer con ratones mdx: *Galectin-1*, *Remicade*®, y *Enbrel*®, todos contra la artritis reumatoide y el *Anti-asialo GM1*, un anticuerpo usado en el Mal de Parkinson.

La *osteopontina* es una proteína que tiene muchas funciones en biología ósea, regulación inmune, supervivencia celular, inflamación y metástasis del cáncer. Su concentración esta aumentada en la sangre y también en los músculos de ratones mdx. La Dra. Spencer ha estado examinando la osteopontina como un objetivo terapeutico potencial para distrofia Duchenne. Los ratones mdx sin osteopontina tienen mejor fuerza muscular, valores de CK menores, y fibrosis reducida. El trabajo está ahora en curso para en-

contrar un fármaco que inhiba la osteopontina en chicos con Duchenne y volverse un candidato para una terapia de Duchenne.

Idebenone. La ausencia de distrofina no solo debilita a las membranas celulares, si no también afecta negativamente a las mitocondrias en las células musculares de pacientes con Duchenne. En estas "centrales de energía" de las células, el portador de energía biológico universal, adenosin trifosfato (ATP), es generado por la fosforilación oxidativa. El compuesto sintético *Idebenone*, desarrollado por la compañía *Santhera Pharmaceuticals* en Liestal cerca de Basilea bajo la dirección del Dr. **Thomas Meier**, su Jefe Científico, es químicamente semejante a la coenzima Q10 natural. El idebenone no sólo es un antioxidante fuerte si no, aun mas importante, facilita la generación de energía celular. Además, el Idebenone ha sido optimizado químicamente con el propósito de que puede entrar en las células fácilmente, incluyendo células musculares.

La eficacia del Idebenone ha sido antes demostrada en pacientes con ataxia de Friedreich. En esta enfermedad neuromuscular el Idebenone demostró mejorar la función neurológica. Además, el Idebenone también pudo aminorar la cardiomiopatía hipertrofica (aumento del corazón), que en esta enfermedad neuromuscular es una complicación que pone en riesgo la vida.

Más recientemente, científicos en la Universidad de Leuven en Bélgica, liderados por el Prof. **Gunnar Buyse** en colaboración con Santhera, empezaron a determinar si el Idebenone sería también beneficioso en distrofia Duchenne. Primero, trataron a ratones mdx deficientes de distrofina por 10 meses - poco después del nacimiento hasta la edad adulta - con Idebenone o placebo en un estudio doble-ciego. En este estudio la disfunción cardiaca de estos ratones distróficos fue mejorada significativamente. Particularmente, la mortalidad atribuible a estrés cardíaco inducido experimentalmente disminuyó de 58 % a 19 %. Además, el desempeño a largo plazo en la rueda de correr (una prueba de función muscular general) mejoro significativamente en ratones mdx en tratamiento con Idebenone. El informe científico detallado de este estudio excitante e inovativo será publicado pronto.

Estos resultados animaron a los investigadores a reallizar una fase II de prueba clínica doble-ciego, controlada por placebo, con 21 chicos con Duchenne entre 8 a 16 años de edad dirigida en la Universidad de Leuven, también bajo dirección del Prof. Gunnar Buyse. Trece chicos fueron tratados por 12 meses con una dosis diaria de 450 mg de Idebenone, administrado como pastillas de 150 mg, mientras que ocho pacientes recibieron placebo. El objetivo primario de este estudio fue determinar el efecto del Idebenone sobre la medición de la función del músculo del corazón, como cambios en la tensión radial sistólica máxima de la pared inferolateral del ventrículo izquierdo, la región del corazón que en DMD se afecta temprano y más seriamente. Los pacientes con Idebenone mejoraron notablemente en esta prueba cardiaca funcional comparado con el placebo. Medidas de resultado secundarias de este estudio incluían pruebas de función respiratoria. Los pacientes tratados con Idebenone mejorados en el flujo máximo durante el período de estudio de 52 semanas, mientras que esta función respiratoria continuó deteriorándose en pa-

cientes con placebo. Estas indicaciones poderosas de una mejora en las funciones cardiacas y respiratorias con Idebenone son particularmente alentadoras, ya que esos problemas causan complicaciones muy severas a pacientes con distrofia Duchenne. Los resultados de este estudio serán presentados por primera vez a la comunidad médica en el congreso anual de la Academia Americana de Neurología del 2008.

En resumen, esto es la primera señal de la eficacia clínica del Idebenone en funciones cardiaca y respiratoria en pacientes con Duchenne. Los resultados proveen la base para planear estudios clínicos de desarrollo adicionales con Idebenone. Después de estos resultados positivos, Santhera ha decidido continuar el desarrollo de Idebenone, que ya recibió la designación de fármaco huérfano, a una terapia eficaz para distrofia Duchenne.

Protandim para evitar el estrés oxidativo: El portador de energía de la energía biológica que cada célula necesita es el adenosin trifosfato, ATP, que es sintetizado en el gran número de mitocondrias dentro de la célula. Ellas son tan pequeñas como una bacteria, y usan el oxígeno para sintetizar este ATP rico de energía, que también suministra energía a las contracciones musculares. Pero cerca del 1% a 2% del oxígeno consumido es convertido en el muy reactivo *radical libre superoxido*. La célula normal se defiende contra este producto tóxico con dos enzimas: la *dismutasa superoxido*, SOD, que convierte al radical en peroxido de hidrogeno y la *catalasa*, que convierte el peroxido de hidrogeno en agua y oxígeno.

Las células musculares sin distrofina producen más de la cantidad normal de radicales superoxidos, ellas experimentan *estrés oxidativo*, que entonces contribuye a la degeneración de las fibras musculares porque las dos enzimas son incapaces de destruir el exceso de radicales suficiente rápido antes de que causen inflamación crónica, fibrosis, peroxidación de lípidos, disminuir la regeneración muscular, que son los síntomas de niños con Duchenne cerca de los tres años de edad.

Para una terapia de Duchenne, será importante interrumpir estos procesos en esta edad o antes. El tratamiento con los antioxidantes vitamina E y C no tiene ningún efecto, desafortunadamente. Otra posibilidad es incrementar el nivel de las dos enzimas dismutasa superoxido y catalasa. Y de hecho, los experimentos en laboratorio han mostrado que la adición de estas enzimas en corazones aislados de ratones mdx bloquea el estrés oxidativo, destruyendo el exceso de radicales libres.

Por esta razón, el Prof. **Joe McCord** de la Universidad de Colorado desarrolló, junto con la compañía *Life Vantage Corp.* en Denver, la formulación natural *Protandim*® para reducir el estrés oxidativo por el aumento de las dos enzimas antioxidantes. El *Protandim* contiene extractos de cinco especies de plantas: *Bacopa monnieri*, *Silibum marianum* o cardo de leche, *Withania somnifera* también conocida como ashwagandha, *Cúrcuma longa* obtenida de la especia cúrcuma, y *Camelia sinensis* o té verde.

En una prueba clínica en el 2006, 29 personas sanas, de 20 a 78 años fueron tratadas diariamente durante 120 días. Después del final de la prueba, los dos resultados de prueba más importantes eran que la actividad de la dismutasa superoxido había aumentado un 30 % y de la catalasa un

54 % sobre el promedio, y la peroxidación de lípidos estaba significativamente inhibida.

Ha sido recientemente encontrado que el Protandim actúa vía la inducción del elemento de respuesta antioxidante (ARE), un mecanismo genético que controla no solo la producción de dismutasa superóxido y catalasa del cuerpo, si no también dos docenas de enzimas antioxidantes importantes. Además, los cinco fitoquímicos activos en el Protandim actúan juntos con una sinergia poderosa, de forma que su efecto combinado es muchas veces más grande que la suma de sus efectos individuales.

Nelson SK, Bose SK, et al. and McCord JM. The induction of human superoxide dismutase and catalase: A fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free Radical Biol. & Med.* 2006; 40; 341-347. Velmurugan K, Alam J, McCord JM, and Pugazhenth S. Synergistic induction of heme oxygenase-1 by the components of the dietary supplement Protandim. *Free Radical Biol. & Med.* 2007; 43, Suppl. 1; S97.

Inhibición del NFκB. En la Universidad Still en Kirksville, Missouri, el Prof. *George Carlson* y sus colegas, desarrollaron un método de evaluar el influjo de calcio en fibras seriamente distróficas aisladas del músculo expiratorio *triangularis sterni* (TS) de ratones mdx, para determinar si, como ha sido asumido, una cantidad aumentada de calcio era responsable de los síntomas distróficos. Sin embargo, sus resultados mostraban que este influjo no estaba aumentado en estas fibras estresadas, comparado con el influjo en fibras musculares normales bajo las mismas condiciones. Ya que otros investigadores habían mostrado que el estiramiento pasivo activa la vía de señalización del NFκB (pronunciado NFkappaB) en el músculo, el equipo del Dr. Carlson trató de encontrar si esta activación era responsable del daño de su músculo TS distrófico.

La proteína NFκB está presente en el citoplasma de todas las células, pero es desactivada allí mayormente por otra proteína, la inhibitoria κB (IκB). Los procesos de inflamación, que combaten las infecciones y la también la degeneración celular, activan la vía del NFκB, y esto resulta, a través de una cascada de señales (una cadena de reacciones) que activan muchos genes cuyas proteínas son factores anti-inflamatorios. Estos factores detienen la inflamación cuando no es necesitada más. Sin embargo, si la reducción de estos factores es bloqueado por una mutación genética o situación de estrés, la inflamación continúa y enfermedades crónicas pueden desarrollarse como arteriosclerosis, fibrosis de pulmón, asma, artritis reumatoide, y probablemente también distrofia muscular Duchenne.

Un número de fármacos está disponible que pueden prevenir la activación del NFκB al principio de esta cascada de señales. Uno de estos fármacos es el *ditiocarbamato de pirrolidina*. El Dr. Carlson y sus colegas han evaluado este fármaco en las fibras aisladas del músculo TS de ratones mdx, descubriendo que su diámetro y su función habían aumentado significativamente. Hay otros fármacos que impiden la vía del NFκB que ya han sido aprobados para el tratamiento de otras enfermedades aparte de la distrofia Duchenne. Uno de éstos es la *sulfasalazina*. Este fármaco y otros están siendo evaluados en pruebas preclínicas con el fin de suministrar información para conducir pruebas clínicas con ellos.

Bloqueo del TNFα. Las membranas celulares del músculo de niños con Duchenne, que no están estabilizadas por el complejo distrófico-proteico, son dañadas fácilmente por el estrés mecánico de la contracción muscular. El factor-alfa de necrosis tumoral (TNFα) es una proteína que incrementa el daño al músculo distrófico, promoviendo la inflamación que resulta en necrosis (destrucción) de las fibras musculares incluso en tejido muscular todavía no afectado. Así que, bloquear al TNFα pudiera reducir el proceso de degeneración debido a la ausencia de distrofina.

El Prof. *Miranda Grounds* y sus colegas en la Universidad de Australia Occidental en Perth, uso un anticuerpo, el cV1q, para bloquear al TNFα en un estudio a largo plazo con ratones mdx. Los ratones mdx viejos tienen solo cerca de 5 % de fibras musculares necróticas, y este porcentaje no pudo ser reducido con el tratamiento del anticuerpo contra el TNFα. Por lo tanto, los investigadores dejaron a los ratones correr en ruedas de ejercicio, y esto duplicó la cantidad de fibras musculares necróticas. El tratamiento con anticuerpo a largo plazo por hasta tres meses, durante el tiempo en que los ratones podían correr como quisieran, previno este daño adicional inducido por el ejercicio. Así que, el bloqueo del TNFα redujo el daño muscular, así como los niveles altos de CK normalmente relacionados con ratones mdx ejercitados. También, los ratones voluntariamente ejercitados y tratados con el cV1q corrieron significativamente más que los ratones mdx sin-tratar, indicando que se sentían bien y que sus músculos habían mejorado la función. Pruebas clínicas con este anticuerpo o con otros fármacos conocidos que bloquean al TNFα deber ser considerado.

Aumento del IGF-1. El 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. Una de estas también llamadas isoformas, el IGF-1A, es muy beneficioso para el músculo, porque ayuda a promover el crecimiento y la fuerza y es de interés para un posible uso terapéutico en niños con Duchenne.

El equipo de investigación de la Profa. *Elisabeth Barton*, de la Universidad de Pennsylvania en Filadelfia, trabaja con ratones mdx manipulado genéticamente para que produzcan niveles altos de IGF-I en sus músculos durante toda su vida. Estos *ratones mdx productores de IGF* mostraban un aumento del crecimiento muscular, y sus músculos lucían muy sanos y con mucho menos fibrosis que los ratones mdx "normales".

Ya que este factor de crecimiento interfiere con muchos procesos en otras células además de las musculares, potencialmente efectos secundarios serios no pueden ser excluidos si dosis altas son usadas para optimizar el efecto en los músculos. Por lo tanto, el IGF-I fue unido con una de sus proteínas de unión (IGFBP3) para producir el IPLEX™, un fármaco ya aprobado que estabiliza al IGF-1 en la sangre, y lo libera solamente donde y cuándo es necesitado. Una primera prueba clínica con el IPLEX fue realizada en la Universidad de Rochester con 15 pacientes adultos con distrofia miotónica. Esta estrategia pudo ser muy eficaz en llevar al IGF-I al músculo sin causar los efectos secundarios a otros tejidos.

Otra manera de crear niveles altos de IGF-I en el tejido muscular sería transferir su gen a músculos con vectores AAV, que les ordenarían hacer más IGF-I. Trabajando con esta técnica en el laboratorio de la Dra. Barton, exitosamente incrementaron el nivel de la isoforma más activa IGF-IA 30 a 40 veces después de una inyección intramuscular de los vectores. El IGF-I recién sintetizado se quedó en el tejido muscular, promovió hipertrofia (agrandamiento de las fibras musculares), pero evitó los efectos secundarios causados por la activación en tejidos no-musculares. Tal terapia génica tomará varios años hasta que pueda ser probada en niños con Duchenne.

Beta-agonistas. Los Beta-agonistas son sustancias similares a una hormona, que se unen a proteínas receptoras específicas en el exterior de las membranas celulares y entonces inician una cadena de reacciones químicas, una *vía de señalización beta-adrenergica* o *cascada*, para entregar una señal a los objetivos biológicos dentro de la célula que son importantes para controlar la síntesis de proteína y degradación de proteína. Algunos beta-agonistas son fármacos aprobados como *bronco-dilatadores* para relajar los músculos de vía aérea de pacientes de asma, o usados como agentes anabólicos para mejorar el tamaño y fuerza de los músculos esqueléticos, a veces usados ilegalmente por atletas ("doping").

En el laboratorio del Prof. **Gordon Lynch** de la Universidad de Melbourne, el beta-agonista *formoterol* fue probado con resultados excelentes para su habilidad de revertir el deterioro muscular en ratas viejas, una conclusión con potencial clínico de tratar a personas viejas. Estos resultados positivos indican que tales "fármacos anti-envejecimiento" también podrían ser usados para una terapia potencial de distrofia muscular Duchenne.

De hecho, una pequeña prueba clínica con pacientes con distrofia Duchenne y Becker ya ha sido realizada. Los participantes fueron tratados durante 28 semanas con *albuterol* (8 mg/día), otro beta-agonista que está aprobado para asma. Esta dosis baja fue escogida después de que en otra prueba de un año en pacientes adultos con distrofia FSH (otra enfermedad muscular), había mostrado que en dosis de 16 y 32 mg/día el albuterol resultó en algunos problemas cardíacos inaceptables, como palpitaciones. La dosis reducida en la prueba con pacientes con DMD no causó ningún efecto secundario, pero causó solamente un aumento moderado de la fuerza muscular que fue insuficiente para una terapia eficaz contra el deterioro muscular y debilitamiento.

Para preparar otra prueba clínica con un beta-agonista más fuerte, el Prof. Lynch y sus colegas trataron a ratones mdx con dosis muy bajas (clínicamente-relevantes) de *formoterol* (25 microgramos/kg). Esta dosis baja incrementó el tamaño y fuerza de los músculos rápidos y lentos del ratón mdx, e importantemente no hizo que los músculos se fatigaran más fácilmente. Los efectos en el tamaño del corazón eran también reducidos con el tratamiento de dosis baja.

Como los pacientes con Duchenne no necesitan un aumento de sus corazones, el efecto de este fármaco en los músculos del corazón debe ser evitado mientras mantiene los efectos positivos en los músculos esqueléticos. Separar estos dos efectos todavía es un desafío científico impor-

tante y éste es un enfoque mayor de la investigación del Prof. Lynch es con este compuesto. Otro efecto secundario, la disminución de los receptores para los beta agonistas en las membranas celulares del músculo, que reduce su efecto en músculos esqueléticos, también debe ser evitado antes de que pruebas clínicas para un tratamiento a largo plazo de niños de Duchenne puedan ser empezadas.

Lynch GS, Ryall JG. Role of β -adrenergic signaling in skeletal muscle structure and function: implications for muscle wasting and disease. *Physiological Reviews* 2008; 88: 729-767.

Harcourt LJ, Schertzer JD, Ryall JG, Lynch GS. Low dose formoterol administration improves muscle function in dystrophic *mdx* mice without increasing fatigue. *Neuro-muscular Disorders* 2007; 17: 47-55.

El BBIC inhibe las proteasas. La degradación de proteínas del músculo en la distrofia Duchenne es causada por varias proteasas diferentes (enzimas destructoras de proteínas) entre ellas la enzima *calpaína* y un gran complejo de proteína, llamado el *proteasoma*. En distrofia Duchenne, las membranas celulares del músculo se agujerean, así que los iones de calcio (átomos cargados) pueden entrar a las células y activar la calpaína y también al proteasoma. Los investigadores están tratando de inhibir la actividad de la calpaína y otras y retrasar la degradación de la célula muscular por lo tanto.

El Prof. **Lee Sweeney** y sus colegas en la Universidad de Pennsylvania en Filadelfia están experimentando con uno de estos inhibidores de proteasa, el *inhibidor concentrado Bowman-Birk*, (BBIC), una proteína natural compuesta de 71 aminoácidos, que puede ser aislada de las semillas de soya (soja). Es una sustancia soluble en agua que puede ser tomada de forma oral. Como su molécula es muy grande para entrar en las células musculares, bloquea varias proteasas como las enzimas digestivas tripsina y quimotripsina fuera de las células, e interrumpe vías de señales que pueden producir procesos de inflamación en la distrofia Duchenne. El tratamiento a largo plazo con BBIC incrementa la masa y fuerza muscular en ratones mdx. La actividad de la CK y fibrosis son también reducidas considerablemente. De otras aplicaciones en pacientes con cáncer, es conocido que el BBIC es un fármaco muy seguro.

Una prueba clínica fase I esta ahora siendo preparada junto con el Dr. **Kenneth Fishbeck** en los Institutos Nacionales de Salud de EUA (NIH) en Bethesda acerca de Washington. Si la prueba clínica muestra que resultados similares a aquellos encontrados con ratones mdx pueden ser obtenidos en niños con Duchenne, este fármaco algo benigno puede posiblemente disminuir la velocidad de la degradación muscular. Las semillas de soya también contienen otras proteasas, así que el BBIC debe ser aislado y purificado de ellas. Comer las semillas directamente no tiene ningún efecto.

GAMT y AGAT. Aunque el ratón mdx no tiene distrofina en sus músculos, no muestra los síntomas clínicos severos de la distrofia muscular Duchenne humana. El Prof. **Brian Tseng**, antes en la Universidad de Colorado en Denver y ahora en el Hospital General Harvard de Massachusetts en Boston y su equipo, continúa investigando las maneras de disminuir la velocidad de la distrofia muscular.

Los científicos usaron técnicas de búsqueda para encontrar genes "modificadores" que son activados en ratones mdx pero inactivados en niños con Duchenne. Identificaron dos de tales genes para las enzimas *arginina: glicina amidotransferasa*, AGAT, y *guanidinoacetato metiltransferasa*, GAMT. Ambas son importantes para la síntesis de creatina, que es requerida para la energía biológica en el músculo esquelético. A diferencia de los niños con Duchenne, el ratón mdx puede aumentar ambas enzimas, así que puede hacer su propia creatina en sus células musculares. Es sabido que los niños con Duchenne tienen solamente 20 % de la cantidad normal de creatina encontrada en un músculo sano. En contraste, el ratón mdx tiene 80-90 % de creatina en sus músculos comparado con ratones de control sanos. Un ratón mdx fue creado cuyo gen de la GAMT fue desactivado genéticamente. Este ratón no puede caminar bien, muere temprano, y sus músculos lucen más seriamente afectados, similares a los de niños con Duchenne.

Ahora, los investigadores en el laboratorio del Dr. Tseng están trabajando para crear a un ratón mdx sin la otra enzima, la AGAT, que puede ser seriamente incapacitado también. Y están investigando cómo la ausencia de la proteína distrofina al parecer interfiere en el transporte de creatina del flujo sanguíneo a las células musculares, un efecto que puede acelerar la distrofia muscular. Este problema de transporte de creatina no puede ser tan tratado eficazmente con solo creatina dietaria. El equipo del Dr. Tseng también está estudiando los dos genes GAMT y AGAT en niños y hombres con una distrofia muscular atípica, que no tienen ninguna distrofina pero sí síntomas como de Becker y cerca de la fuerza muscular normal.

Con métodos de búsqueda de alto caudal, podría ser posible identificar compuestos, fármacos aprobados, o

"nutriceuticos" (sustancias dietarias eficaces), que puedan aumentar los dos genes "modificadores" GAMT y AGAT en niños con Duchenne. Esto podría hacer sus síntomas severos más como aquellos del difícilmente incapacitado ratón mdx y comprar tiempo mientras los esfuerzos para una "cura real" continúan.

McClure WC, Rabon R, Ogawa H, Tseng BS. Upregulation of the creatine synthetic pathway in skeletal muscles of mature mdx mice. *Neuromuscular Disorders* 2007; 17; 639-650.

L-arginina y ONSn. Otra consecuencia de la falta de distrofina, la cantidad reducida de un componente particular del complejo distrofina- glicoproteico, la enzima *óxido nítrico sintasa neuronal*, ONSn. Esta enzima produce óxido nítrico, ON, del aminoácido L-arginina. Aunque el ON es un gas, actúa como una hormona y regula, entre otros efectos, la dilatación de los vasos sanguíneos lo que es importante para el suministro normal de sangre y por lo tanto de la energía para los músculos. Cuando el ONSn está faltante fibrosis cardíaca se desarrolla y esto contribuye a la fibrosis incrementada en corazones de ratones mdx y también de pacientes con Duchenne.

Prof. **Andrew Hoey** and his colleagues at the University of Southern Queensland in Australia administraron diariamente L-arginina por 6 meses comenzando en ratones mdx de 6 meses de edad. Esto redujo la fibrosis en sus corazones, incrementó el flujo de sangre coronario y mejoró su función del corazón. En experimentos en curso, el mecanismo de este efecto de la L-arginina está siendo investigado antes de que mucho trabajo adicional pueda estar hecho para ver si la L-arginina puede volverse un fármaco para niños con Duchenne.

Algunos pensamientos finales sobre dónde estamos y qué debemos hacer.

Como dije al principio, escribí este informe de investigación y especialmente mis primeros para usted, los chicos y los hombres jóvenes con distrofia muscular Duchenne y sus familias, con el propósito de que usted comprenda mejor qué está siendo hecho para detener esta enfermedad, *terminarla* de una vez por todas. He escogido muchos proyectos de investigación para mis resúmenes, porque son, en mi opinión, los más importantes con los que los científicos en muchos países están tratando de encontrar maneras efectivas y seguras para detener o al menos disminuir la velocidad de la firme desaparición de sus músculos.

Mutaciones buenas y malas. La distrofia muscular Duchenne no es nueva, de la misma manera que el SIDA, porque ha sido vista en ratones, ratas, gatos, y perros, y existe por lo tanto, probablemente en todos los animales con músculos. Así que empezó mucho antes de que nos volviéramos diferentes de nuestros antepasados animales. Es un accidente de la evolución. Sin mutaciones, los cambios aleatorios de la información genética, no estaríamos aquí y el resto de la vida tampoco. Algunas de las mutaciones son "buenas", porque mejoran la vida, pero la mayoría son "malas" y peligrosas, porque causan la muerte y una enfermedad antes o después del nacimiento.

Las mutaciones que causan distrofia muscular Du-

chenne no lo castigan a usted o alguien más por algo, sólo ocurren. Éste no es el lugar para discutir cuestiones religiosas que vienen a la mente fácilmente. Sólo permítame añadir un pensamiento: La naturaleza parece actuar ciegamente sin importar a quién lastima, por otro lado, las buenas mutaciones nos dieron cerebro para encontrar una manera de reparar este efecto secundario terrible de la evolución.

Investigación científica. Si usted ha leído el informe entero, usted se dará cuenta de que los muchos científicos y sus equipos mencionados, están haciendo todo lo que ellos pueden tan rápido como es posible para encontrar una terapia. En 1986/87, cuando el gen de la distrofina y su proteína fueron encontrados, todos pensábamos que la manera estaba finalmente abierta para una cura que podría muy pronto corregir la causa molecular-genética de la enfermedad. Pero ahora, más de 20 años después, todavía estamos esperando esa cura o al menos una terapia que disminuya la velocidad de destrucción de los músculos. Pero no solamente la pelea en contra de *esta* enfermedad mostró ser mucho más difícil de lo que imaginamos primero, el progreso para otras enfermedades genéticas como la fibrosis quística o muchas formas de cáncer, es también muy lento. De hecho, "nuestra enfermedad", la distrofia muscular Duchenne, podría volverse la primera

enfermedad hereditaria infrecuente que tendrá una terapia genética en el futuro no tan distante.

Un paso después de otro. Los enfoques de investigación explicados en este informe todos están basados en resultados científicos confiables, así que la mayoría resultará algún día en técnicas que se materializarán en fármacos que podrán ser comprados. Pero tomará tiempo, porque su desarrollo tendrá que ir paso a paso, y cada uno debe ser cuidadosamente planeado, probado en animales y luego finalmente con pruebas clínicas. Atajos, incluso si parecen posibles en teoría, no son admitidos. Después de todo, nuestros niños tendrán que tomar la mayoría de sus fármacos para Duchenne por el resto de su vida esperanzadamente larga. Así que no pueden tener efectos secundarios que se acumulen y se vuelvan peligrosos con el tiempo. *Tienen que ser completamente seguros.* Los científicos saben esto, y también lo saben las agencias reguladoras como la FDA y EMEA, aunque parece a menudo hacen el trabajo más difícil y disminuyen su velocidad, están ahí para protegerlo. El proceso un paso-después de otro es lento, pero los errores con accidentes que lo lastimen a usted o a otros con otras enfermedades solo disminuirían la velocidad del desarrollo de nuestros y sus fármacos.

Omisión de exón. Una de las técnicas genéticas habladas en este informe es especialmente prometedora: la *omisión de exón*. En una prueba clínica en Holanda, una clase de potenciales fármacos en antisentido, los AONs, ha sido mostrado trabajan en un músculo de cuatro niños con Duchenne. Una prueba similar con otra clase de estos fármacos está siendo realizada ahora en el R.U. Hay esperanza justificada de que sus resultados serán equitativamente positivos. Pruebas sistémicas son ahora planeadas o ya en marcha con la inyección de AONs en la circulación sanguínea, con el fin de que puedan alcanzar todos los músculos. Eso funciona en animales, y todos esperamos que los resultados sean lo mismos en niños.

Los chicos participantes en estas pruebas sistémicas, que necesitan omitir el exón 51, tendrán ese exón retirado en gran parte de los mensajeros genéticos dañados, el ARNm, de su distrofina. Sus músculos ya podrían trabajar mejor al final de la prueba. Por lo tanto, esperamos que este enfoque se vuelva *una terapia eficaz*, incluso si no es una cura completa. No tomará otros 20 años para llegar allí, será mucho antes.

Un tratamiento de omisión de exón tendrá que ser repetido después de poco tiempo, unas semanas o meses. Pero esto tiene la ventaja de que puede ser detenido y reemplazado por algún otro método más efectivo o más permanente. La omisión de exón será una gran ayuda para muchos chicos con Duchenne, pero solo disminuirá la velocidad de progresión de la enfermedad, por lo tanto, será *una terapia eficaz pero no una cura completa*.

Acercamientos farmacológicos. Así que, para muchos de ustedes que todavía son jóvenes y tienen gran parte de su tejido muscular remanente, la omisión de exón no vendrá demasiado tarde. Pero los músculos perdidos no pueden ser reparados por la omisión de exón. Por lo tanto, los más viejos entre ustedes posiblemente se beneficiarán más de los enfoques de investigación farmacológicos que de los genéticos. Algunos de estos fármacos pueden ser abusados para el dopaje de atletas, pero los posibles beneficios para usted con distrofia muscular significa que deben ser permitidos para esta aplicación.

La lista de estos fármacos potenciales es larga, cerca de 30 son discutidos en este informe y más aparecerán en las actualizaciones posteriores. Algunos de ellos están en pruebas clínicas con buenos resultados como el Idebenone. Podrían ser completamente desarrollados más rápido que los métodos genéticos. Y solos o junto con otros, en *cócteles*, pueden mantener y fortalecer los músculos, como los corticoides pero con menos efectos secundarios, y así, *comprar tiempo* mientras usted está esperando una terapia genética más fundamental.

Los ensayos clínicos son los pasos indispensables para el desarrollo completo de una terapia. Pero los experimentos humanos simplemente también pueden ir mal. Y algunos ya han tenido resultados negativos, como el Myodur que no detuvo las proteasas y el Myo 029 que supuestamente inhibiría la miostatina pero no resultó en beneficio clínico. Y la primera de una serie de pruebas clínicas, aquellas fase I, no se espera provean un beneficio clínico. La mayoría trata de tratar solamente un músculo sin importancia, y que no puede mejorar la enfermedad en todos los músculos. ¿Los nuevos fármacos potenciales son seguros? Ésa es la pregunta principal a la que estas pruebas son diseñadas para responder. La participación es importante, pero no vale para venir con grandes costos de lejos a los centros de prueba.

Diagnósticos de mutación. Algunas terapias potenciales son *específicas a la mutación*, lo que significa que la mutación exacta debe ser sabida por el paciente para beneficiarse de estos tratamientos. Ejemplos son la omisión de exón y el PTC124. Los otros, como la sustitución del gen de la distrofina con virus vectores o el aumento de la utrofina son independientes de la mutación. El método MLPA es ahora una técnica ampliamente usada para detectar las deleciones y duplicaciones en chicos y también en mujeres portadoras. Sin embargo, se espera que las nuevas técnica micro-array reemplazarán pronto todos los otros métodos de prueba génica.

Diagnosis de portadoras para mujeres relacionada con la madre de un paciente de Duchenne es importante para su asesoramiento genético, porque puede evitar el nacimiento de niños con Duchenne adicionales en la familia extendida de un paciente. Pero si en una mujer en riesgo puede ser asegurado que *no* es una portadora, esto puede animarla a tener niños sanos sin el miedo de una repetición.

Detección de recién nacidos por alta actividad de CK en puntos de sangre secos, como es ofrecido en Alemania (Friburgo), Gales (Cardiff), y Bélgica (Amberes), para encontrar a niños con Duchenne temprano y poder, a través de asesoramiento genético, evitar el nacimiento de casos secundarios en la misma familia. Dos programas pilotos de detección de CK están ahora en marcha en los EUA en Columbus/Ohio y Atlanta/Georgia.

Registro. Todos los niños y hombres jóvenes con Duchenne deben tener sus datos médicos personales registrados en bancos de datos de Duchenne de su propio país, que deben ser parte de las redes de registro internacionales como ofrece TREAT-NMD (www.treat-nmd.eu/registry) y DuchenneConnect (www.duchenneconnect.org). Esto permitiría encontrar a participantes para pruebas clínicas de terapias para las mutaciones más inusuales, y también garantizaría que los pacientes y sus familias tienen acceso a la información más actualizada sobre resultados de investigación y manejo médico.

Estar juntos. Usted, las familias con chicos con Duchenne y los hombres jóvenes con Duchenne mismos, deben formar parte de la comunidad mundial de Duchenne y trabajar activamente con ella. Usted debe estar con otras familias y pacientes en las asociaciones de distrofia muscular de su propio país y también a nivel internacional. La EAMDA, Alianza Europea de Asociaciones de Distrofia Muscular, es un ejemplo. Juntos usted puede hacer muchas cosas para acelerar el desarrollo de terapias. He aquí algunas sugerencias:

Aprobación más rápida. La FDA y otros organismos reguladores necesitan muchos meses para aprobar pruebas clínicas de las nuevas técnicas. Han finalmente aprobado las pruebas locales de omisión del exón 51, pero les tomo cerca de un año aprobar la prueba británica. Ésa fue la razón por la que los holandeses pudieron terminar su prueba antes que a los británicos les fuera aun permitidos empezar. Ahora verán como los organismos insistirán en aprobar cada uno de los AONs para las muchas delecciones y duplicaciones diferentes. Los científicos tratarán de convencerlos de que solo las secuencias de AONs serán diferentes, pero todo lo demás, incluyendo la química será como el de los primeros para omitir el exón 51. Usted, las familias, deberán trabajar con el PPMD y otras organizaciones y empezar debates públicos con los organismos reguladores. Tales discusiones ya han empezado con la FDA y están avanzando muy bien. Si es exitoso, los muchos fármacos de omisión necesarios para los exones aparte del 51 estarán disponibles en unos meses y no años, después de que el primero para omitir el exón 51 este listo para usted.

Eduque a sus médicos. Materiales educativos están disponibles en DuchenneConnect, TREAT-NMD, PPMD, ActionDuchenne, UPPMD, y otras organizaciones. Es importante utilizar estos materiales, que están a menudo disponibles en-línea y son actualizados frecuentemente, cuando hable con sus médicos. Muchos de sus médicos de atención local o primaria tendrán una pequeña, si tienen alguna, familiaridad con Duchenne. Es importante educarlos para ayudarles a que cuiden a su niño en una manera informada y comprensiva.

Tenga cuidado con medicamentos y tratamientos milagrosos. Debe quedar en claro después de que usted lea este informe y quizás escuchara las presentaciones y discusiones de "nuestros" científicos en las muchas reuniones de Duchenne, que los fármacos terapéuticos y tratamientos que son seguros y eficaces por mucho tiempo solo pueden ser producidos después de un desarrollo cuidadoso con métodos estrictamente científicos. Si usted ve fármacos "milagrosos" en Internet o tiene propuestas de tratamientos milagrosos, y usted considera adquirirlos o aplicarlos en su hijo, por favor pregunte a los proveedores de lo milagroso cuántos niños con Duchenne ya han curado, cómo fueron diagnosticados con qué resultados, cuánto nueva distrofina han encontrado en los músculos, y cuánto ha mejorado la función muscular. Si eso que es ofrecido tiene realmente algún valor, pregúntese a usted mismo por qué no miles de familias van con sus niños enfermos ahí. Tenga cuidado, por lo demás usted perderá mucho dinero y posiblemente lastimará a su niño severamente.

Promueva la concienciación. Usted debe trabajar con sus asociaciones de distrofia muscular activamente en sus países, y deben estar junto a organizaciones internacionales como TREAT-NMD en Europa y PPMD en los Estados Unidos y en algunos otros países. Todos juntos podremos llevar sus problemas diarios y sus esperanzas para un tratamiento, a la atención de sus gobiernos y el público en general, a las otras personas que no tienen idea qué significa la DM Duchenne. Esto podría ser hecho por cabildeo político y con la ayuda de medios de comunicación, periódicos, radio y televisión. Esto abriría los ojos de los organismos de concienciación y sociedades benéficas para poner su dinero de investigación donde es necesitado, y también traera donaciones desgravables de fuentes privadas.

Donaciones para investigación, aun las pequeñas, son importantes. Podrían aportar una fracción de los costes reales del desarrollo de un fármaco que va en millones de dólares, libras o euros. Estos peniques y centavos son un recordatorio de las personas no tan ricas para los reales ricos de que le importa a usted también y que usted, de la misma manera que todos los demás, puede tener una vida larga y feliz.

Enlaces a otros artículos importantes en informes anteriores.

En mis informes anteriores sobre las tres reuniones del Parent-Project del 2006 y 2008, hay muchos más tópicos descritos que no son mencionados en este informe sobre enfoques de investigación. Son enlistados aquí con una señal de donde pueden ser encontrados. Usted puede ver estos informes anteriores en mis páginas de Internet www.duchenne-information.eu en Español, haciendo click en "Informes sobre investigación para una terapia de la distrofia muscular de Duchenne". Los nombres cortos de los informes "2006 Cincinnati Español" (C06), "2006 Londres Español" (L06), y "2007 Filadelfia Español" (P07) están abreviados más adelante en la siguiente lista en paréntesis seguido por el número de página (por ejemplo. P07 - 20) para el artículo referido.

Nick Catlin: Parándose en los Hombros de los Gigantes giants (L06-1). **Louis Kunkel:** Veinte Aniversario: Descubriendo el gen de la distrofina y su proteína (L06-2).

Robert Weis: ¿Por qué necesitamos saber la mutación

exacta (P07-21)? **Stephen Abbs:** ¿Por qué debe uno hacer pruebas de las variaciones, las mutaciones, en el gen de la distrofina (L06-19)? **Kevin Flanigan:** ¿Si todavía no hay ninguna cura, por qué necesitamos conocer la mutación exacta (C06-15)?

Jennifer Morgan: Vectores virales y células madre de músculo (L06-8). **Terence Partridge:** La promesa de las células madre (C06-7).

Kate Bushby: ¿Por qué necesitamos pruebas clínicas (P07-3, L06-3)? **Diana Escolar:** Pruebas clínicas internacionales con agentes farmacológicos (P07-18). **Kate Bushby:** Terapias con corticoesteroides, prueba clínica internacional (L06-13).

Tan Nguyen: ¿Cómo aprueba la FDA un fármaco para Duchenne (P07-19)? **Robin Sharp:** Registro Duchenne (L06-20).

Serge Braun, Kate Bushby: TREAT-NMD, una Red de Excelencia de la Unión Europea (P07-20).

Madhuri Hedge: CETT, Programa de Colaboración, Educación y Traducción de Prueba (P07-22). **Kyle Brown:** DuchenneConnect animará la colaboración y evaluación genética para distrofia muscular Duchenne (P07-24).

Patricia Furlong: ¿Que significa "Connect...." (P07-25)? **Francesco Muntoni:** No olvide la madera para los

árboles (L06-21).

Steve Wilton: Cómo trabaja la omisión de exón (L06-4). Una entrevista con Stephen D. Wilton (C06-16).

Gertjan van Ommen, Francesco Muntoni: ¿Pero cuándo habrá un fármaco de omisión de exón para chicos con Duchenne (P07-9)?

He escrito este informe de parte de TREAT-NMD, PPMD, y ActidionDuchenne a quién agradezco por su apoyo financiero y a quién puede contactarse usted directamente:

TREAT-NMD

Prof. Kate Bushby
Institute of Human Genetics
University of Newcastle upon Tyne, NE1 3BZ, UK
Tel.: 0044-191-241-8621, Internet: www.treat-nmd.eu

Parent Project Muscular Dystrophy

Patricia Furlong
1012 North University Blvd. Middletown, Ohio 45042, USA
Tel.: 001-513-424-0696, Internet: www.parentprojectmd.org

ActionDuchenne

Nick Catlin
Epicentre, 41 West Street
London E11 4LJ, UK
Tel.: 0044-208-556-9955, Internet: www.actionduchenne.org

Este informe será actualizado repetidamente, la próxima vez después de la reunión anual del PPMD en Filadelfia, del 17 al 20 de julio del 2008. Usted puede ver este informe (hasta Junio del 2008) y sus traducciones al alemán e inglés en Internet en www.duchenne-information.eu así como las versiones en inglés, alemán, y español de mis informes sobre las dos reuniones del PPMD en el 2006 en Cincinnati y 2007 en Filadelfia, y la reunión de ActionDuchenne en el 2006 en Londres. Si usted desea recibir todos mis futuros informes tan pronto como estén listos, por favor mándeme su dirección de correo electrónico para la inclusión en mis listas de correo en inglés y alemán, o español que ya contienen más de 1,000 direcciones.

Guenter Scheuerbrandt, PhD.
Im Talgrund 2
79874 Breitnau, Germany
Tel.: *49-7652-1777, Fax: *49-7652-982730.
E-Mail: gscheuerbrandt@t-online.de
Internet: www.duchenne-information.eu

Traducción al español por:

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

Detalles moleculares de omisión de exón 51.

En la prueba clínica en Holanda, se ha logrado omitir el exón 51. Aquí, los detalles moleculares de esta omisión son explicados, cuyo objetivo fue restaurar el marco de lectura que fue cambiado en el ARNm por la delección del exón 50 en el gen de la distrofina.

Parte de las secuencias de bases del exones 50 y 51 del ARNm del *gen normal de la distrofina* es mostrado así como el final del exón 49 y del inicio del exón 52. En el exón 50, 29 tripletas de bases no son mostradas y 52 en el exón 51. Debajo de cada tripleta, se muestra el nombre abreviado del aminoácido en la proteína distrofina que esta codificado por la tripleta. (La traducción hacia los aminoácidos ocurre en los ribosomas. Los aminoácidos no están unidos a los codones del ARN.) Las tripletas están seguidas una tras otra sin espacios entre ellas, pero aquí se usan guiones indicando la separación entre tripletas del marco de lectura y líneas verticales para indicar los bordes de los exones. Las tres bases que señalizan el codón de parada *oculto* UGA se muestra en rojo. El exón 50 finaliza después de la primera base de la última tripleta, que entonces es completada para formar la tripleta UCU con la primera y segunda base del exón 51, mostrada en azul.

Final Exón 49		Inicio Exón 50		Final Exón 50		Inicio Exón 51
---CAG-CCA-GUG-AAG		AGG-AAG-UUA-GAA---		AUU-GGA-GCC-U		CU-CCU-ACU-CAG-ACU-
gln pro val lys		arg lys leu glu		ile gly ala ser		pro thr gln thr
codón de parada oculto						
---GUU-ACU-CUG-GUG-ACA-CAA---		AAA-CUA-GAA-AUG-CCA-UCU-UCC-UUG-AUG-UUG-GAG---				
val thr leu val thr gln		lys leu glu met pro ser ser leu met leu glu				
Final Exón 51				Inicio Exón 52		
---AUG-AUC-AUC-AAG-CAG-AAG				GCA-ACA-AUG-CAG-GAU-UUG---		
met ile ile lys gln lys				ala thr met gln asp leu		

Cuando el exón 50 esta delecionado (eliminado) en el gen y también en el ARNm, el exón 49 es seguido directamente por el exón 51. Esto causa el cambio del marco de lectura en el exón 51 por un nucleótido a la derecha, con la consecuencia de que 8 aminoácidos incorrectos son incorporados en la distrofina, hasta que finalmente una señal de parada prematura UGA es alcanzada. La secuencia de bases cambiada y los aminoácidos erróneos son mostrados en rojo. La síntesis de distrofina es interrumpida prematuramente, queda incompleta, es destruida, y *distrofia muscular Duchenne* se desarrolla.

Final Exón 49		Inicio Exón 51
---CAG-CCA-GUG-AAG		CUC-CUA-CUC-AGA-CUG-UUA-
gln pro val lys		leu leu leu arg leu leu
codon de parada activo		oligorribonucleotido en antisentido
UC-UUU-ACG-GUA-GAA-GGA-ACU		
-CUC-UGG-UGA-CAC AAG---		AAC-UAG-AAA-UGC-CAU-CUU-CCU-UGA-UGU-UGG--
leu trp;Alto!		
Final Exón 51		Inicio Exón 52
---AU-GAU-CAU-CAA-GCA-GAA-G		GC-AAC-AAU-GCA-GGA-UUU---

El oligorribonucleótido en antisentido para omisión de exón, AON PRO051, usado por los investigadores holandeses, es mostrado en color azul unido por el emparejamiento de bases Watson-Crick a 20 bases en el exón 51. Este induce la omisión del exón 51 en el ARNm del gen *mutado* que, en este ejemplo, no contiene la secuencia del exón.

Si, en adición del exón 50 delecionado, es removido el exón 51 por omisión, entonces el exón 52 estara directamente conectado con el exón 49. El marco de lectura no es alterado más porque el exón 49 termina y el exón 52 empieza con un codón completo de tres bases.

Final Exón 49		Inicio Exón 52
---CAG-CCA-GUG-AAG		GCA-ACA-AUG-CAG-GAU-UUG---
gln pro val lys		ala thr met gln asp leu

Ninguna señal prematura de parada aparece en el exón 52 o posterior, pero 77 aminoácidos están faltantes en la proteína, aquellos cuya información genética fue portada por la secuencia de bases de los exones 50 y 51. Están faltantes en la parte central de la distrofina acortada, que, sin embargo, todavía será probablemente parcialmente funcional y por lo tanto da lugar a distrofia Becker moderada, en lugar de distrofia Duchenne severa.