

Acercamientos de Investigación Hacia una Cura

Este reporte ha sido escrito para familias quienes tienen uno o más chicos con distrofia muscular tipo Duchenne. En él se les explica en un lenguaje profano algunos de los hechos científicos básicos e informarles de los numerosos acercamientos o enfoques con los cuales investigaciones internacionales tratan de encontrar un causal, por ejemplo una justificación científica, así como una terapia efectiva para la enfermedad. Las dos primeras ediciones de este reporte estuvieron basadas en dos conferencias, una en Octubre de 1999 en Waldbreitbach cerca de Koblenz en Alemania, y otra en Mayo del 2000 en los Institutos Nacionales de Salud en Bethesda cerca de Washington en EUA. Esta tercera edición fue actualizada en Febrero y Marzo del 2002 con información de literatura y correspondencia, mayormente vía correo electrónico, con muchos de los investigadores. Párrafos individuales han sido actualizados cuando ha sido necesario, el mes de la actualización será indicado en tales casos. Los nombres en paréntesis se refieren a los investigadores representativos de un resultado científico mencionado en el texto. Sus nombres con direcciones abreviadas son puestos en una lista en el final de este informe. Como la investigación científica es hecha por trabajo de equipo, muchos más científicos deberían haber sido mencionados, pero por motivos de espacio sus nombres no son mencionados. Si alguien deseara ver publicaciones originales o sus resúmenes debe ponerse en contacto con el autor de este informe.

Los genes y su función: Los Genes son las unidades funcionales del material genético de los cromosomas en el núcleo de cada célula. Este material es conocido como *ácido desoxirribonucleico*, o *ADN*, su estructura se parece a dos escaleras espirales (o de caracol) entrelazadas, o de doble hélice doble. Las dos columnas vertebrales o los barandales de las escaleras son largas cadenas compuestas de ácido fosfórico y desoxirribosa, un tipo de azúcar. Los peldaños consisten en cuatro sustancias químicas diferentes, las bases: *adenina*, *guanina*, *timina*, y *citocina* (abreviadas como A, G, T, C), dos de las cuales siempre se enfrentan en un peldaño de la hélice.

Por razones espaciales, los peldaños solo pueden contener un par A-T y G-C. Si la secuencia de estos pares base o letras genéticas en una cadena es por ejemplo:

---AGGCTTAATCGT---

La secuencia de la cadena opuesta debe ser:

---TCCGAATTAGCA---

Las dos cadenas son complementarias una de la otra.

La unidad de la información genética, o letra genética, es el nucleótido, una de las bases unidas a una molécula de desoxirribosa, la cual también lleva un grupo de ácido fosfórico. Cada una de las 100 mil millones de células del cuerpo humano contienen en su núcleo 46 cromosomas con más de 6 mil millones de letras genéticas, agrupadas en aproximadamente 35 000 genes. Casi todos los detalles de la secuencia de estas letras o nucleótidos son conocidos actualmente. Esta es la información genética de un ser humano individual, y es pasada de generación en generación con pequeños cambios o mutaciones las que, si ocurren, podrían tener consecuencias negativas, pero son necesarios para la evolución de la vida y todas las criaturas vivas.

La mayor parte de los genes llevan la información para la construcción de una o más *proteínas*, las cuales consisten de secuencias de aminoácidos, sus componentes básicos, de los que hay 20 tipos diferentes. La secuencia de los aminoácidos es importante para la función de las proteínas como *enzimas*, catalizadores de reacciones químicas, o como agentes de control para otros genes, o como material estructural. En el núcleo de célula, donde los cromosomas residen, la información genética es copiada o *transcrita* en otra sustancia genética de una estructura similar (al ADN), el *ácido ribonucleico pre-mensajero*, ARNpre-m. Los genes de los organismos multicelulares consisten en secciones activas, los *exones*, y secciones inactivas, los *intrones*. Después de la transcripción, los intrones, que a menudo son muchos más de largos que los exones, son removidos del ARNpre-m, y los exones transcritos son *empalmados* o unidos entre ellos para crear un *ARN mensajero*, ARNm, el cual entonces es exportado hasta los ribosomas, la proteína que sintetiza (crea) estructuras en el citoplasma de la célula. Los ARN's usan la base uracilo, U de forma abreviada, en sustitución de la muy similar base T del ADN. En el ARNm, tres letras genéticas consecutivas siempre significan o se leen como uno de los 20 diferentes aminoácidos según un diccionario genético, el *código genético*. Así, la escritura genética sólo usa cuatro letras, y sus palabras, los *codones*, siempre tienen de extensión tres letras, también llamadas tripletas o triadas. No hay espacios entre las palabras, y pero hay tres diferentes codones de parada o de finalización, UAA, UAG, y UGA, que significan que la síntesis (creación) de la proteína debe finalizarse. En los ribosomas, ARN's que actúan de catalizadores, las *ribozimas*, usan la información genética del ARNm para construir proteínas específicas con los aminoácidos que son entregados a los ribosomas por otra clase de ARN, los ARN's de transferencia o ARNt.

Proteína distrofina y su gen: La distrofia muscular Duchenne es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes del hombre y los mamíferos. Aproximadamente uno de cada 3 500 chicos, independientemente de su origen étnico, nace con esta enfermedad, que es causada por una *mutación* o daño del gen de la DM Duchenne o *gen de la distrofina*. El gen de la distrofina fue *identificado* en 1986 en el brazo corto del Cromosoma X (Kunkel, Boston) y su estructura fue aclarada poco después. Con 2,6 millones de pares de bases, este es uno de los genes más largos alguna vez encontrados: si fuera estirado, este sería de 0,84 mm de largo. Sólo el 0,5 % de los pares de bases, 13 973, pertenece a 79 exones del gene, que combinados juntos contienen la secuencia de codificación activa, la información para la síntesis de las diversas formas de la proteína *distrofina*. La *transcripción* de la información genética del gen de la distrofina en ARNm esta bajo el control de al menos cinco *promotores*, regiones de ADN, las cuales gobiernan el proceso de empalme para que un número de proteínas diferentes sean producidas. El producto principal es la distrofina de extensión completa, una proteína muy larga con forma de varilla que consiste de 3 685 aminoácidos (Hoffman, Washington). Esta tiene un peso molecular de 427 kDa (Kilodaltons), por ejemplo esto es 427 000 veces más pesado que un átomo de hidrógeno. Con una extensión de 125 nm (nanómetros,

una millonésima de un milímetro); por ejemplo, si 8 000 moléculas (de la proteína) fueron reunidas en una línea recta, su longitud total sería solamente de un milímetro. La distrofina esta localizada en el interior de las membranas de célula del músculo, a la que esta anclada por un complejo (o grupo) de muchas otras proteínas. Esta es importante para la estabilidad mecánica de la membrana de célula durante la contracción del músculo. A pesar de su importancia, sólo el 0,002 % del peso de las proteínas del músculo es distrofina, 20 mg por kilogramo de músculo.

Complejo distrófico: Con uno de sus extremos, el terminus amino, la distrofina interactúa con la red β -actina en el interior de la membrana de la célula del músculo. Su otro extremo, el terminus carboxilo, está unido al β -dystroglicano, que atraviesa la membrana de la célula y une su lado externo al α -dystroglicano y así de esa forma se ancla el aparato contráctil a la superficie extracelular de la membrana, o más exacto, al *sarcolema*. El complejo proteico entero al que la distrofina pertenece, consiste de más de dos docenas de proteínas diferentes como se ilustra en la ilustración esquemática al final de este informe (reproducido según el permiso de la revista Nature 415, 228, 2002, derechos de autor Macmillan Editores Ltd., <http://www.nature.com>). Además de las proteínas mostradas, muchos más componentes de este sistema han sido identificados como la disferlina, integrina, telethonina, miotilina, agrina, desmuslina, sincoilina, fukutina, proteína relacionada con la fukutina, spectrina, colágeno y calpaina, con algunos de ellos existiendo en más que una forma. De forma adicional, la red β -actina no aparece en la ilustración. En el futuro, se espera que más componentes sean identificados (Campbell, Iowa City).

Cuando la distrofina esta ausente como en la distrofia Duchenne, se crea un disturbio en el equilibrio entre las diferentes partes del complejo. Especialmente en los dystroglicanos, sarcoglicanos y el sarcospan que son reducidos o desaparecen completamente, pero también las proteínas contráctiles actina y miosina se degeneran. Cada una de las proteínas del complejo tiene su propio gen el cual también puede ser afectado por mutaciones. Esto conduce a los 13 tipos diferentes de distrofia del Anillo Óseo (de Cinturas en Ibero América) y 5 distrofias musculares congénitas, así como a al menos 8 otras enfermedades neuromusculares.

Esta descripción resumida de los detalles moleculares del complejo distrófico acentúa las dificultades que los investigadores deben encarar en sus esfuerzos para curar la distrofia Duchenne muscular causada por una mutación del gen de la distrofina.

Mutación y origen de la enfermedad: La distrofia muscular Duchenne es causada por tres clases diferentes de mutaciones en el gen de la distrofina: las *deleciones*, si partes del gen faltan, *duplicaciones*, si partes del gen están duplicadas, y *mutaciones puntuales*, si solo una letra genética se encuentra cambiada, eliminada o agregada. Como el mecanismo de lectura en los ribosomas siempre lee las palabras del código de tres letras una tras otra sin espaciado, una mutación no trastorna el *marco de referencia de lectura* si el número de letras faltantes o adicionales puede ser dividido por tres, sin que sobre ninguna letra. En este caso, la distrofina hecha es más larga o más corta. Si este cambio sólo concierne a las estructuras no esenciales de la distrofina como por ejemplo la parte central, esta todavía puede ser en parte funcional. Es entonces,

que la forma benigna de la distrofia, la *distrofia muscular Becker*, se desarrolla. Si la mutación cambia el marco de lectura por una o dos letras, entonces, en la mayor parte de casos, una cadena entera de aminoácidos incorrectos es incorporada a la proteína comenzando en el sitio de la mutación hasta que finalmente alcanza un nuevo y prematuro codón de parada, el cual da por terminada la síntesis. En este caso, la distrofina incompleta no puede realizar completamente su función normal, siendo esta degradada y desarrollándose *distrofia muscular Duchenne*.

Sin distrofina, las células del músculo se degeneran. Continuamente estas son regeneradas, pero el mecanismo de regeneración finalmente falla. Las fibras del músculo destruidas son substituidas por tejido graso y conectivo, apareciendo a la edad de dos a tres años los primeros signos visibles de la enfermedad. Donde los nervios motores se ponen en contacto con los músculos, se localiza otra proteína con una estructura similar a la distrofina, la *utrofina*, la cual contribuye en algún grado a la estabilidad de la membrana del músculo (Davies, Oxford). Sin la utrofina, la enfermedad podría progresar mucho más rápido. Como ya se ha mencionado, la ausencia de la distrofina altera el delicado equilibrio de un gran número de otros componentes cuya naturaleza e interacción en la arquitectura de las células del músculo todavía no se conocen completamente. Por estas influencias, la patología y los síntomas de la enfermedad se presentan a veces de formas imprevisibles.

Herencia de la distrofia muscular Duchenne: Además de los 44 cromosomas normales, llamados *autósomas*, los varones tienen dos cromosomas sexuales diferentes en cada célula de su cuerpo, un cromosoma "Y" y un cromosoma "X". Si su gen de la distrofina en su único cromosoma X es dañado por una mutación, este no puede ser compensado por un gen intacto de un segundo cromosoma X, como es posible para mutaciones en los *autósomas*, que siempre están presentes en pares. Por lo tanto, la distrofia Duchenne y Becker afectan sólo a varones. Las mujeres, sin embargo, tienen dos cromosomas X en cada célula de su cuerpo. Cuando ellas llevan un gen mutado de la distrofina en uno de sus cromosomas X, el gen intacto en el otro cromosoma X compensa el gen mutado, por lo que ellas no muestran ningún síntoma o solo síntomas clínicos débiles de la enfermedad. Sin embargo, ellas pueden transmitir la enfermedad, siendo *portadoras genéticas*.

Aproximadamente dos terceras partes de los chicos con Duchenne heredan la enfermedad porque sus madres son *portadoras genéticas*, es decir todas las células de su cuerpo tienen una mutación en el gen de la distrofina en uno de sus dos cromosomas X. En la *meiosis*, la división celular que conduce a los óvulos, cada óvulo recibe sólo un cromosoma X. La probabilidad que este sea un cromosoma X con la mutación genética es del 50 %. Por lo tanto el 50 % de sus hijos varones por regla general tendrán distrofia muscular Duchenne y el 50 % de sus hijas por regla general serán portadoras al igual que la madre. Estos riesgos permanecen igual para todos los niños de una familia, no son más pequeños si la familia ya tiene un hijo con distrofia muscular Duchenne. Si la madre es una portadora, la mutación surgió en las células germinales de sus padres o de los antepasados de su madre, la abuela del paciente. Como todas las células del cuerpo de un portador genético tienen el gen mutado, el defecto genético de la portadora puede ser descubierto por un análisis genético de los leucocitos, las células o glóbulos blancos de la sangre.

Aproximadamente un cuarto de los casos son causados por una *mutación nueva*. En estos casos, la mutación ocurrió espontáneamente en el óvulo de la madre que dio lugar al paciente. Como sólo un óvulo es afectado, todos los otros niños de estas mujeres no afrontan un mayor riesgo que el riesgo general para la enfermedad.

Aproximadamente un décimo de los pacientes tienen una madre con *célula germinal de mosaico*, debido a que la mutación nueva surgió en un momento temprano de la formación de la célula germinal y la célula desarrollada se transformó en un grupo de óvulos, cada uno con la mutación. Como más de un óvulo es afectado, otro hijo puede heredar la enfermedad también, o una hija puede ser una portadora genética.

Como los métodos genéticos actualmente no pueden descubrir una célula germinal de mosaico, debería ser ofrecido un diagnóstico prenatal durante el segundo embarazo a todas las mujeres quienes ya tienen un chico con distrofia muscular Duchenne, no sólo a las que han probado ser portadoras genéticas (*Müller-Reible, Würzburg*).

Diagnóstico: El material genético para el diagnóstico de la distrofia muscular Duchenne en chicos, puede ser aislado de glóbulos blancos de la sangre, los leucocitos, obtenidos de sangre líquida. Aproximadamente el 60 % de los pacientes tienen deleciones y aproximadamente el 6 % tiene duplicaciones en su gen de la distrofina. La detección de estas mutaciones es bastante simple después de la multiplicación del material genético por la técnica de reacción en cadena por polimerasa, PCR. Los pacientes quienes no tienen, ni deleciones, ni duplicaciones, aproximadamente el 35 %, tienen mutaciones puntuales, por ejemplo, el cambio de una sola letra genética por otra. Para detectarlos de forma inequívoca, análisis de secuencia deberían ser realizados pero aún no pueden ser ofrecidos en los servicios de análisis. Sin embargo, estos están en desarrollo y podrían estar disponibles dentro de los próximos años (*Ray, Toronto*). Hay también pacientes sin embargo, cuyas mutaciones no caben en este esquema y cuyos diagnósticos genéticos moleculares plantean demandas especiales a los científicos (*Hoffman, Washington*).

En las familias quienes tienen un chico con Duchenne con una deleción o duplicación en su gen de la distrofina, las portadoras genéticas pueden ser diagnosticadas por una evaluación cuantitativa de las pruebas génicas. Las portadoras tienen en uno de sus dos cromosomas X un gen intacto y en el otro un gen mutado de la distrofina que tiene que ser mantenido aparte. Estas determinaciones cuantitativas son un poco demandantes, y sólo laboratorios genéticos con el equipo y la experiencia necesaria pueden realizarlos de forma fidedigna.

Para el diagnóstico de la carga genética única, el análisis por marcadores genéticos, *repeticiones cortas en tándem*, ha probado ser acertado. Estos marcadores son secuencias cortas repetidas de dinucleótidos en los intrones y otras regiones de no-codificación del gen de la distrofina. Ya que cada marcador es bastante variable, su estructura exacta y el arreglo es único para cada persona. Esto permite trazar la herencia de un gen mutado de la distrofina dentro de una familia, sin la necesidad de un análisis de secuencia y la detección de la mutación por sí misma (*Fenwick, San Juan Capistrano*).

Posibilidades terapéuticas: Para curar la distrofia muscular Duchenne, la consecuencia de la mutación que dañó el gen de la distrofina, que es la degeneración del músculo, tiene que ser detenida o al menos aliviada. La investigación intenta hacer esto por medio de una *terapia génica* o por una *terapia farmacológica*. La terapia génica significa que todas las secciones activas, los exones, del gen intacto de la distrofina, su ADNc, o partes de él, sean introducidos en cada célula muscular, o que el daño específico del gen sea reparado por técnicas genéticas. Una terapia farmacológica significa que se de una sustancia química ordinaria, un fármaco o droga normal, que no tiene nada que ver con un gen, para bloquear o reducir la velocidad de la degeneración del músculo. En ambos enfoques, se han hecho progresos durante los pasados últimos años.

No hay ninguna terapia aún: A pesar de este progreso, ni una terapia génica, ni una farmacológica ha sido desarrollada hasta ahora que pueda curar la enfermedad de los chicos con Duchenne. Sólo en un tipo de fármacos, tres cortico-esteroides estrechamente relacionados, *prednisona, prednisolona, y deflazacort*, ha sido encontrado que, durante un periodo limitado de tiempo, pueden reducir la velocidad de la degeneración de los músculos. Sin embargo, muchas veces tienen efectos secundarios severos (vea el párrafo sobre *Glucocorticoides* mas abajo). Por la severidad de la enfermedad, las familias de los pacientes, sus doctores, y el público en general buscan desesperadamente aun el más pequeño resultado positivo de investigación, y los medios de comunicación, principalmente los periódicos y la televisión, tienden a exagerar pequeños avances como saltos importantes. No sólo los medios de comunicación, los mismos científicos son a menudo sobre-optimistas y pueden declarar los resultados de experimentos con animales como victorias terapéuticas, levantando así falsas esperanzas. *Ni un solo chico con Duchenne alguna vez ha sido curado* (*Dubowitz, Londres*).

En los párrafos que siguen, es resumido el trabajo científico de 59 equipos de investigación con los progresos de más de 30 enfoques o acercamientos diferentes para encontrar una cura para la distrofia Duchenne. Sin embargo, el lector debe tener presente que a pesar de estos esfuerzos impresionantes, muchos más pasos tienen que ser tomados antes de que dicho objetivo todavía distante sea alcanzado.

Experimentos para transferir el gen de la distrofina: es razonable de creer que la transferencia, o el transporte, de cantidades suficientes del gen intacto de distrofina en los núcleos de las células del músculo distrófico podría curar la enfermedad proporcionando la información genética de los nuevos genes que será usada para sintetizar la proteína por los ribosomas de la célula, produciendo cantidades bastante grandes de distrofina funcional que entonces emigraría a su lugar normal bajo la membrana de célula, para ser incorporada en el intrincado complejo distrófico-glicoproteico de forma normal.

Ratones y perros distróficos: La mayor parte de los experimentos para transferir el gen son realizados con una clase de animal de laboratorio: el ratón-mdx distrófico, que tiene una mutación puntual en el nucleótido 3,185 en el exón 23 de su gen de la distrofina. En esta mutación se ha cambiado un codón CAA, que representa un aminoácido glutamina, por un codón TAA, que es un codón de parada, para que la síntesis de distrofina sea parada antes de tiempo y el ratón no tenga ninguna distrofina funcional en sus músculos. Estos ratones no pierden sus músculos,

debido a que ellos no desarrollan *fibrosis*, la proliferación de tejido conectivo, como en los chicos con Duchenne, sus procesos de degeneración causados por la enfermedad no sobrepasen la regeneración. Aunque la transferencia génica pueda ser estudiada con ellos, habría que tener presente que cualquiera de los resultados obtenidos con estos ratones no pueden ser considerados como inmediatamente aplicable a niños sin estudios clínicos adicionales con pacientes con Duchenne. ¡Un niño no es un ratón grande!

Algunos experimentos son realizados en perros distróficos, con *distrofia muscular del perdiguero dorado*, o perros GRMD en sus siglas en inglés, los cuales en contraste con los ratones, tienen una distrofia muscular similar a la distrofia Duchenne. Ellos realmente están impedidos y por lo tanto difíciles de criar y mantener. Su gen de la distrofina tiene una mutación puntual en el sitio donde se empalma el receptor del intrón 6 que conduce a una delección del exón 7 en el ARNm, un cambio del marco de lectura y un codón de parada prematuro.

Transferencia génica por medio de virus: Para transferir un gen, un transportador, un vector génico es necesario. Un modo de transferir el material genético a células vivas es empaquetarlo en virus, que consisten en una cadena de sus propios genes dentro de una cápsula de proteína. Ellos se anclan a la superficie de una célula viva, introducen sus genes en la célula y luego usan, o esclavizan, el aparato sintetizador de la célula para reproducirse. Principalmente dos clases de virus son usadas como vectores génicos en la investigación de Duchenne, el *adeno virus* y el diez veces el más pequeño virus adeno-asociado. Estos virus no pueden multiplicarse dentro de la célula objetivo porque los científicos han eliminado casi todos sus propios genes. El virus que mas ventajas tiene parece ser el *des-tripado*, prácticamente vaciar el contenido de un adeno-virus, que no contenga ningunos de sus propios genes, y así tener el espacio para las 14,000 letras genéticas activas, el ADNc, con la información para la proteína entera de distrofina. Con estos virus des-tripados, en hasta el 30 % de las fibras de músculo de un ratón distrófico, fue sintetizada distrofina nueva seguida de una mejoría de la función del músculo tanto en ratones jóvenes como en los más viejos (*Lochmüller, München; Chamberlain, Seattle*).

Es posible introducir hasta dos ADNc de distrofina en cada uno de estos virus des-tripados, y con la ayuda de un promotor, una secuencia genética que activa un gen, casi el 100 % de las células de músculo en algunos músculos de los ratones produjo distrofina nueva que persistió durante al menos 30 días (*Karpati, Montreal*).

Los pequeños virus *adeno-asociados* sólo pueden transportar material genético que no sea mayor de aproximadamente 5.000 nucleótidos, un tercio del ADNc de distrofina entero. Su ventaja consiste en que ellos transfieren el gen con más eficacia que los adenovirus normales. La desventaja es que para ser transferido el ADNc de distrofina, este tiene que ser acortado bastante para que quepa en este pequeño vector. Los pacientes con distrofia muscular Becker, que progresa mucho más despacio que la distrofia Duchenne, tienen tal distrofina acortada en sus músculos, por lo tanto, una posible terapia génica con la transferencia de uno de estos *mini genes tipo Becker* no curarían completamente la distrofia muscular Duchenne, sólo la transformarían en la forma Becker mas benigna.

Para determinar cuales de las cuatro regiones de la proteína normal distrofina, la Terminal-N, la rica en cisteína, la Terminal-C, o la barra central son importantes y cuales no lo son, se han hecho extensos experimentos en el que ratones distrófico fueron genéticamente modificados para que ellos tuvieran una de nueve diferentes proteínas distrofinas acortadas en sus músculos. Hasta ahora se sabía que algo de la región central parecida a una barra puede ser quitada sin la pérdida de función. El análisis detallado de la estructura tridimensional ahora revela cuales partes particulares de la estructura de la barra podrían ser suprimidas sin perderse considerablemente la función que protege al músculo. Una de las distrofinas acortadas, que era aproximadamente la mitad de lo normal, tenía prácticamente las mismas propiedades que la proteína inalterada. La entrega de este y algunos otros genes acortados de la distrofina por medio de virus adeno-asociados en los músculos de los ratones-mdx previno y parcialmente revirtió los síntomas distróficos. Estos resultados demostraron que modificaciones específicas a la distrofina pueden generar nuevas proteínas que son considerablemente más pequeñas, pero más funcionales que las distrofinas naturalmente acortadas en pacientes con distrofia muscular Becker (*Chamberlain, Seattle*).

El ultrasonido permite supervisar que la inyección de los vectores sea aplicada con bastante precisión (*Mendell, Columbus*). Si aproximadamente el 30 % de la cantidad normal de distrofina inalterada reaparece, medidas hechas sobre el diafragma de los ratones indican que la función del músculo también se mejora. La transferencia del mini gen también conduce a una mejora de la función muscular. Además, estos experimentos han mostrado que la transferencia génica conduce a un mejor término en los animales más jóvenes, debido a que hay menos problemas de rechazo inmune y, a que después de una sola inyección, la nueva distrofina recién sintetizada se mantiene en los músculos por mayor tiempo que en animales adultos. Después de aplicarse un solo tratamiento en ratones recién nacidos, la recién formada distrofina todavía puede ser encontrada después de un año. Para un uso futuro en la gente, esto significa que los pacientes tendrían que ser tratados cuanto antes después del nacimiento cuando sus músculos todavía están en gran parte intactos (*Clemens, Pittsburgh*).

La distrofina recién introducida probablemente podría no ser reconocida como "propia" por el sistema inmunológico, por lo tanto, los procesos de rechazo ocurrirán. Experimentos han sido hechos con ratones distróficos para suprimir la respuesta inmune con fármacos conocidos. Después de la utilización de un adenovirus para transferir un gen marcador, que produce una proteína verde fluorescente, pudo ser demostrada la prolongada persistencia de la producción de la proteína en ratones-mdx adultos y también fue posible repetir la transferencia génica sin rechazo inmune. Esta técnica ahora es usada para transferir el gen de la distrofina (*Clemens, Pittsburgh*).

Transferencia génica vía circulación sanguínea: En los experimentos hasta ahora descritos, las soluciones han sido que los virus que contienen el gen de la distrofina fueran inyectados directamente en los músculos de los animales. Para alcanzar todos los músculos, hasta aquellos del corazón y los pulmones, son realizados experimentos para desarrollar un *tratamiento sistémico*, lo que posibilitaría inyectar los virus en la circulación sanguínea. Para asegurar que nueva distrofina sea sintetizada sólo en las células musculares, otra secuencia genética es agregada

al gen de la distrofina en el virus, un *promotor CK*, el cual tiene 1 354 nucleótidos de largo y normalmente activa el gen de la proteína muscular creatina kinasa. Este promotor se aseguraría que el nuevo gen de la distrofina sea activado sólo en células de músculo y no en otra parte.

Los virus se anclan a estructuras específicas sobre la membrana de la célula, a los receptores usados por el virus coxsackie y el adenovirus, de donde ellos penetran a través de la membrana de la célula del músculo. Estos receptores, sin embargo, son más numerosos en el desarrollo y regeneración de las células del músculo. Siendo menos numerosos, en los músculos maduros que no se regeneran más. Así, la transferencia génica con adenovirus vectores es más eficiente en células de músculo que se dividen. Para vencer esta deficiencia, los ratones transgénicos fueron producidos para que expresen estos receptores en grandes cantidades sobre la superficie de las fibras maduras del músculo. En experimentos preliminares con adenovirus que contenían el complejo génico para la proteína marcadora β -galactosidasa y que fueron inyectados intramuscularmente, mostró que la transferencia génica en los músculos de los ratones con concentración alta de receptores aumentó la eficiencia 50 veces más que en experimentos de control. Si en experimentos la distrofina también puede ser aumentada tan dramáticamente como la proteína marcadora en estos ratones, un acercamiento para una terapia de distrofia Duchenne podría ser la transferencia génica de dos pasos, primero el gen del receptor y luego el gen de la distrofina, o la suprarregulación separada del gen del receptor antes de una transferencia génica de distrofina (Holland, Montreal).

Transferencia de genes desnudos: Para esta técnica, el ADN del material genético a ser transferido no es incorporado en virus, si no en plasmidos, pequeñas estructuras de ADN circulares sin cubierta de proteína, que existen, a veces en cantidades grandes, en bacterias donde sobre todo dan lugar a la resistencia contra los antibióticos. La ventaja de esta clase de transferencia génica consiste en que los plasmidos no contienen ninguna proteína, sólo material genético, *ADN desnudo*, para que ninguna reacción inmune se desarrolle contra el material vector. Los experimentos fueron hechos con plasmidos que contenían un marcador o delator de genes, genes cuyas proteínas pueden ser descubiertas en el tejido del músculo por tinción o por la producción de luz para que así el éxito de un experimento de transferencia pueda ser supervisado fácilmente. Cuando volúmenes relativamente grandes de una solución de plasmidos fue inyectada *bajo presión* en arterias de los miembros de ratas y monos de rhesus, el delator de los genes β -galactosidasa y luciferasa fueron transferidos en hasta el 20 % de las fibras del músculo después de una sola inyección y en hasta el 40 % después de varias inyecciones repetidas. La presión fue creada bloqueando la salida venosa de un miembro durante un corto tiempo. Los experimentos para transferir el gen de la distrofina actualmente son realizados en ratones mdx, monos, y perros GRMD (Wolff, Madison; Braun, Estrasburgo).

Prueba clínica con plasmidos: En Francia, la fase-1 de un estudio clínico con 9 pacientes con Duchenne mayores a 15 años de edad fue iniciado en septiembre del 2000 con administraciones intramusculares de plasmidos que contienen el gen de la distrofina y promotores. Esta fase-1 del estudio es necesario para establecer la seguridad del procedimiento, esto es determinar si habrá alguna inflamación o rechazo inmune, y si alguna nueva distrofina fue creada del todo, producida según la información del gen

transferido. Una solución que contiene 200 μ g (millonésimo de gramo) de plasmidos con 10 billones (10^{12}) de copias del gen de la distrofina fue inyectada una vez en un músculo del antebrazo de los 3 primeros pacientes. Esta es una muy pequeña cantidad de material genético comparado a los experimentos en animales. Los 3 siguientes pacientes recibieron una dosis de 600 μ g y los últimos 3 dos dosis de 600 μ g cada uno. La seguridad de los pacientes es la preocupación principal, por lo tanto cualquier paciente es tratado sólo cuando se está seguro que el anterior tratado no muestra ningún signo de intolerancia inmune. Es importante acentuar que en esta etapa del estudio, los participantes no sacarán ninguna ventaja clínica de este tratamiento, esto no es una terapia aún. Esta primera prueba durará hasta aproximadamente el final del 2002. (Braun, Estrasburgo; Fardeau, París).

Experimentos para vencer los problemas inmunológicos: (Actualizado en abril del 2002). Como los plasmidos de ADN no contienen ninguna proteína, la transferencia génica con tal ADN desnudo también permite examinar los problemas potenciales con respuestas inmunes hacia la distrofina recién creada sin la interferencia de otras proteínas que son introducidas con otros métodos de transferencia génica como los que usan vectores virales y celulares. Los estudios con ratón mdx han mostrado que las respuestas inmunes son generadas hacia la distrofina humana, pero no a la distrofina de ratón, a pesar de la ausencia de distrofina normal en los músculos de los ratones. La carencia de una respuesta inmune a la distrofina de ratón podría haberse debido a la presencia de otras formas de distrofina. Estos resultados sugieren que respuestas inmunes a la transferencia génica de distrofina no puedan ser un problema particular en pacientes con Duchenne, sobre todo en aquellos con mutaciones puntuales que no interfieren con la síntesis de otras formas de distrofina. El trabajo experimental actual se enfoca en la determinación de cuales otras distrofinas deben estar presentes para permitir la tolerancia inmune al aspecto (forma) del nuevo tipo de distrofina muscular después de la transferencia génica (Wells, Londres).

Células madre: Las células madre existen en muchos tejidos del cuerpo, también en músculos esqueléticos y en la médula ósea. Estas células no-especializadas pueden desarrollar muchas clases de células especializadas, por ejemplo células madre de médula ósea en los diferentes tipos de células sanguíneas, y células madre de músculo en células de músculo nuevas. Estas células *pluripotentes* son células madre somáticas o adultas, en contraste con las células madre embrionarias que son *totipotentes* y que pueden desarrollarse en todas las clases de células del cuerpo y células germen. La investigación de células madre para encontrar una terapia para la distrofia Duchenne sólo usa las células madre adultas de animales experimentales, así los problemas éticos unidos con el empleo de células madre humanas embrionarias serían evitados.

Experimentos con células madre de médula ósea: Diez mil a 20 000 células madre, especialmente purificadas de la médula ósea de ratones normales machos, fueron inyectadas en la vena de la cola de ratones-mdx homocigóticos hembras que no tenían ninguna distrofina propia. Tres meses más tarde, distrofina podía ser detectada en hasta el 10 % de las células musculares, y en el mismo 10 % los núcleos de las células tenían un cromosoma "Y" como prueba de que las células inyectadas sanas del ratón macho se habían fundido con las células del músculo de enfermo. Las células se inocularon vía la circulación sanguí-

nea y traían con ellas la información normal para la distrofina que entonces fue usada para la producción de distrofina funcional. Sin embargo, no fue posible aumentar el número de células de músculo que contenían nueva distrofina normal por encima del 10 % obtenido al principio (Kunkel, Boston).

Los experimentos también fueron hechos para ver si el trasplante de médula ósea en ratones normales conduciría a nuevas células de músculo con distrofina en ratones-mdx4cv distróficos. Estos ratones tienen un codón de parada en el exón 53 y, en contraste con los ratones-mdx con una mutación en el exón 23, producen muy pocas fibras musculares regeneradas espontáneamente, fibras revertantes, conteniendo distrofina normal. Diez meses después de la inyección de 15 millones de células de médula ósea sin purificar en estos ratones cuya propia médula ósea fue destruida por medio de radiación, no más del 1 % de las fibras musculares mostró nueva distrofina. Por lo tanto, el trasplante total de médula ósea no puede mitigar la distrofia muscular de los ratones. Los investigadores acentuaron, sin embargo, que su resultado no significa que la misma técnica fuera también ineficaz en niños, porque la enfermedad es diferente en ratones y en humanos (Mavilio, Modena).

Experimentos similares también han sido comenzados con perros GRMD distróficos jóvenes. Algunos perros tratados tienen ya varios meses. Extensas biopsias de músculo son planeadas para determinar si sus músculos ahora contienen nueva distrofina. Como la distrofia de estos perros es más similar a la enfermedad humana que a la enfermedad de los ratones, los resultados darán más indicativos de que pasaría cuando esta técnica se intentada en chicos con Duchenne (Storb, Seattle).

Experimentos con células madre de músculo esquelético: Células madre obtenidas de músculo fueron aisladas de los músculos esqueléticos de ratones-mdx distróficos, tratadas fuera del animal con un virus vector que llevaba el gen de mini-distrofina, y luego inyectadas de nuevo en la vena de la cola de los ratones distróficos. Después de siete días, fueron encontradas pequeñas cantidades de distrofina en los músculos de los miembros traseros. Esto significa que algunas células madre genéticamente tratadas habían encontrado su camino a los tejidos del músculo. Algunas células también habían emigrado vía la corriente sanguínea a otros órganos incluyendo la médula ósea. Cuando las células madre de músculo purificadas de ratones normales eran etiquetadas con un marcador génico y luego inyectadas en ratones mdx cuya médula ósea fue destruida, las células madre se diferenciaron y se convirtieron en células productoras de distrofina en los músculos esqueléticos. Ellas también aparecieron en el tejido de nervios y vasos sanguíneos. Por lo que así pueden contribuir de formas diferentes a la regeneración de músculo funcional y otros tejidos que normalmente también contienen distrofina y que se carece en animales distróficos y muchachos con Duchenne (Huard, Pittsburg).

Transferencia de mioblastos: En los años 1990 y 1991, una serie entera de estudios clínicos en niños con Duchenne fue realizada con una técnica que había mostrado resultados positivos en ratones-mdx: el uso de *mioblastos* (mioblastocitos), las células precursoras del músculo, que pueden desarrollarse en células maduras de músculo, obtenidas de un donante sano por lo que contiene el gen normal de la distrofina, y que eran inyectadas directamente en muchos sitios de músculos distróficos. Estos

experimentos no fueron exitosos en chicos con Duchenne, porque los mioblastos no emigraron suficientemente fuera de los sitios de la inyección, había problemas inmunológicos y, encima de todo, casi todos los mioblastos inyectados habían muerto después de un corto tiempo (Karpati, Montreal).

Experimentos siguen determinando la razón por la que menos del 1 % los mioblastos inyectados trasplantados en las fibras del músculo distrófico sobrevive. Estas pocas células parecen comportarse como células madre. Para aislar estos mioblastos activos, mejores métodos de reconocimiento para ellos serán necesarios. Por lo tanto, las estructuras superficiales, los así llamados *marcadores*, son investigados, lo que permitiría distinguir estas células de las inactivas (Partridge, Londres).

Terapia génica ex-vivo con mioblastos, primeros pasos:

El aislamiento de células mioblasticas de un paciente con Duchenne, seguido de la introducción del gen correcto de la distrofina y luego de nuevo ser inyectadas prevendría la mayor parte de los problemas inmunológicos. Pero antes de que una terapia génica somática *ex-vivo* tenga una posibilidad de tener éxito, la supervivencia de los mioblastos en el tejido del músculo después de que el trasplante se ha realizado debe ser mejorada considerablemente. Esto posiblemente puede ser alcanzado induciendo a los mioblastos a sintetizar, al menos durante un cierto tiempo, agentes anti-inflamatorios o factores de crecimiento. Así, los genes para estos agentes tendrían que ser introducidos en los mioblastos antes del trasplante. En experimentos preliminares, usando *electroporación*, se transportaron plásmidos con un gen para una proteína fluorescente marcadora a través de la membrana celular de los mioblastos humanos en un recipiente de cultivo. Esta técnica transitoriamente hace permeables las membranas con un solo pulso eléctrico, por ejemplo 400 V a través de un hueco de 4 mm. En condiciones óptimas, hasta al 70 % los mioblastos se les transfirió el gen y expresaron la proteína marcadora. La capacidad de los mioblastos para unirse en miotubos, otra etapa de desarrollo del músculo, no fue perjudicada. Así, terapias génicas basadas en la corrección génica y el trasplante de mioblastos humanos pueden beneficiarse de la transferencia génica por *electroporación*. (Bernheim, Genève).

Cambio de la información genética: Experimentos han sido emprendidos con el objetivo de no introducir una secuencia génica funcional de distrofina en las células de músculo, pero si de cambiar la información genética defectuosa reparando la mutación. Tal técnica tendría cuatro ventajas importantes: (1) los riesgos de una transferencia génica mediada por virus serían evitados, (2) no sólo la distrofina de los músculos esqueléticos, si no todas otras formas de distrofina también serían reparadas, (3) la regulación específica de la producción de distrofina en el tejido sería mantenida, (y 4) la fabricación del agente terapéutico, los *oligonucleotidos*, probablemente sería más fácil y más barata que la fabricación del virus vectores con el material genético a ser transportado. Los oligonucleotidos son secuencias cortas específicas de ADN, que consisten en unos pocos nucleotidos y que pueden ser fabricados automáticamente.

Tres clases de estrategias de reparación son aplicadas: (1) reparar la mutación a nivel del gen mismo, (2) cambiar la información genética durante transcripción del ARN por omisión de exón, (y 3) ignorando un codón de parada prematuro.

Reparar el gen: Los intentos para reparar las mutaciones puntuales a nivel génico son hechos usando cortos *oligonucleotidos quiméricos*, que contienen tanto ARN sobre unas de las cadenas como ADN sobre la otra. La cadena de ADN de los oligonucleotidos quiméricos es perfectamente complementaria a la correcta secuencia génica del sitio de la mutación puntual del gen, mientras que la parte de ARN es perfectamente complementaria a la secuencia mutante. Esto conduce a estructuras cuádruples apareadas, cadenas cuádruples, que son capaces de corregir una mutación tan pequeña activando los mecanismos biológicos de reparación del ADN de la célula. Con esta técnica, un ADN y un ARN oligonucleotido complementario se empalman al sitio de la mutación en el gen de la distrofina de perros GRMD distrofosos al ser inyectados en un perro afectado de 6 semanas de edad. El músculo tratado mostró: (1) La evidencia de restauración del exon que se omitía debido a la mutación, (2) la restauración de la región codificada de la proteína por el exon faltante dentro de la proteína de completa de distrofina que se localizo correctamente en la membrana del músculo, (y 3), el más importante, la demostración de que el gen en el cromosoma X fue corregido. La reparación de la mutación fue sostenida para casi un año en este perro (*Bartlett*, Bethesda).

En un experimento similar, fue reparada en-vitro la mutación puntual en el exón 23 de mioblastos de ratones mdx y estos mioblastos entonces se unieron en miotubos los cuales crearon distrofina completa normal. Dos semanas después de una sola inyección de oligonucleotidos en los músculos de ratones mdx, del 1 a 2 % de las fibras alrededor del sitio de la inyección contenían distrofina nueva la cual no era distrofina revertante, por ejemplo distrofina normal después de una supresión espontánea de la mutación. Esta cantidad de distrofina nueva permaneció estable durante al menos 10 semanas (*Rando*, Palo Alto).

Omisión de exón: Con esta técnica se intenta cambiar una mutación Duchenne en una mutación Becker. Esto puede ser hecho induciendo el mecanismo de empalme, el cual elimina los intrones del ARN pre-mensajero, eliminando también uno o mas *exones específicos* para que la información genética pase de largo una mutación puntual o restaure el marco de lectura alrededor de una delección genómica que causa una lectura fuera del marco de lectura. El gen con su mutación no es alterado al *omitir el exón*, sólo el ARN mensajero, ARNm, el cual no contiene la información del exón omitido. Como el ARNm es más corto de lo normal, la proteína distrofina es también más corta, esta contiene menos aminoácidos. Si los aminoácidos faltantes formaran parte de la región central de la distrofina, no serían esenciales, y la proteína más corta resultante todavía podrá realizar su papel estabilizante en la membrana de las células del músculo. El resultado sería un cambio de los severos síntomas de la distrofia Duchenne a los mucho más suaves síntomas de la distrofia muscular Becker.

Este acercamiento fue usado para pasar de largo un solo defecto nucleótido, la mutación puntual en el exón 23 del ratón mdx. Un *oligonucleótido en antisentido*, consistiendo de 25 unidades nucleótidas que son complementarias a la secuencia de ARN del ARNpre-m en una de las zonas del extremo del exón 23, indujo la omisión del exón que contenía la mutación durante el proceso de empalme. La información genética del exón 23 del gen, que codifica 71 aminoácidos en la zona de la barra (de la proteína distro-

fina), fue *omitida* de esta forma durante el proceso de lectura. Los oligonucleotidos en antisentido fueron empaquetados en liposomas, o sea rodeados por un lípido (químico graso), e inyectados en los músculos de ratones vivos. Después de 2 o 4 inyecciones con intervalos de una semana, este experimento en-vivo condujo a la producción de distrofina, que juntos con otros componentes del complejo distrofínico se localizo correctamente en las membranas de las células del músculo. Más experimentos son realizados para aumentar el potencial de estos oligonucleotidos en antisentido (*Wilton*, Perth).

Oligonucleotidos en antisentido especialmente estables fueron creados bloqueando con grupos metilos los normalmente libres grupos-OH de los azúcares ribosa del ARN. Con estos oligonucleotidos modificados se aumento un 70 % el que pudiera ser omitido el exón 23 del ARNm de la distrofina de ratones mdx en cultivos de tejido. La técnica también trabaja en los ratones vivos, pero en la eficacia es inferior, dando lugar a la proteína de distrofina en los músculos (*Dickson*, Londres).

El exón 45 del gen de la distrofina es el exón delecionado con más frecuencia en chicos con distrofia Duchenne. Esto causa un cambio del marco de lectura en el ARNm y un codón de parada prematuro, lo que conduce a una proteína truncada y no-funcional de distrofina que posteriormente es degradada en las células del músculo. Sin embargo, si ambos exones 45 y 46 se encuentran delecionados, el marco de lectura no es afectado, resultando una distrofina más corta de lo normal con la falta de una cadena de 108 aminoácidos no esenciales de la parte media de la proteína. Los pacientes con esta clase de delección tienen síntomas más suaves, de distrofia muscular Becker.

En experimentos en-vitro para delecciones específicas del exón 46 del ARNpre-m de distrofina en miotubos de ratones mdx se logro exitosamente con 4 diferentes oligonucleotidos ARN en antisentido específicos empalmar una secuencia reguladora dentro del exón 46. Seguidos a estos, experimentos en-vitro similares fueron realizados con varios oligonucleotidos ARN en antisentido específicos en el sitio de empalme análogo del exón humano 46. Con uno de ellos, consistiendo de 19 nucleótidos, era posible suprimir el exón 46 de aproximadamente el 15 % de los ARNpre-m's de distrofina en miotubos obtenidos de dos pacientes con Duchenne quienes tenían una delección del exón 45. Este porcentaje de ARNm acortado sin exones 45 y 46 condujo a cantidades normales de distrofina acortada en al menos el 75 % de los miotubos. Después de 24 horas, esta distrofina nueva fue distribuida uniformemente dentro de los miotubos, pero después de 48 horas esta se había movido a la membrana de los miotubos y se había quedado allí durante varios días.

Esta técnica fue sumamente específica, resultando solamente en el retiro del exón 46 objetivo. Con la misma técnica, se indujo en células de músculo cultivadas la omisión de otros 9 exones: 2, 19, 29, 41, 43, 44, 47, 50, y 51. Así, que esta estrategia muy prometedora, probada en experimentos en probeta, posiblemente más tarde pueda convertir las mutaciones Duchenne en mutaciones Becker en más del 65 % de los pacientes con delecciones. Estudios en curso tienen como objetivo otros exones y prueban el método para reparar una variedad de otras mutaciones que incluyen mutaciones puntuales y por duplicación. Además, la misma técnica fue usada para omitir el exón 46 en las células musculares de ratones vivos con una eficacia de aproximadamente el 10 %. Métodos diferentes

para la entrega en-vivo de oligonucleotidos en antisentido ahora son estudiados, no sólo para mejorar la eficacia de la omisión del exón, si no también para permitir un tratamiento futuro sistémico para músculos distróficos en pacientes con Duchenne (*van Ommen, van Deutekom, Leiden*).

Los *sitios de empalme* son secuencias de ARN específicas en la frontera entre exones e intrones, la cual es esencial para el retiro correcto del intrón no-codificado de la secuencias de ARNpre-m. El ARN pre mensajero, ARNpre-m, es el primer producto de un gen activo; después del retiro de las secuencias del intrón por empalme este se convierte en ARN mensajero, ARNm, que se mueve a los ribosomas donde actúa como el portador de la información para la síntesis de la proteína. Los *mioblastos* o células satélite se funden en miotubos que entonces se desarrollan en células de músculo maduras.

Omisión espontánea de exón: Un muchacho con Duchenne quien todavía podía andar a la edad de 14 años se le fue encontrada una delección génica del exón 45. Cuando él tenía 18 meses, recibió células madre de la médula ósea de su padre a causa, de que en aquel tiempo, él tenía SCID, abreviación en ingles de inmuno deficiencia severa combinada. Esto genero la pregunta de si sus células de músculo contienen distrofina normal hecha con la información genética que había provenido de las células madre sanas de la médula ósea de su padre. Investigaciones con un nuevo material bióptico, sin embargo, ahora han mostrado que los síntomas más suaves de la enfermedad no fueron causados por el trasplante, si no por una omisión de exón debido a la naturaleza especial de su delección. Además, sus células musculares contienen algunos núcleos de células que provinieron de las células de su padre, las que producen niveles muy bajos de distrofina normal. Así, las células de médula ósea podrían contribuir a la reparación de las células de músculo, pero no lo suficiente para alterar considerablemente el curso de la enfermedad (*Kunkel, Boston*).

Recombinación homóloga: La mutación puntual en el gen de la distrofina de ratones mdx podría ser reparada en el 15 a 20 % de mioblastos aislados por la adición de una cadena de ADN de 603 nucleótidos con la secuencia correcta en el sitio de la mutación. Parte del nuevo segmento génico fue cambiado al enfrentar un segmento homólogo que contiene la mutación C-T en el exón 23 de los ratones. Esta técnica de *recombinación homóloga por fragmento corto*, SFHR con sus iniciales en ingles, ahora es aplicada a mioblastos aislados de pacientes con Duchenne con mutaciones de delección en los exones 45 a 51 y 13. Si es exitosa, esta técnica restauraría el marco de lectura alterado después de donde se ubica la mutación, permitiendo así la reintroducción de los mioblastos corregidos en los músculos del mismo paciente (*Kapsa, Melbourne*).

Ignorar un codón de parada prematuro por medio de antibióticos: Aproximadamente el 5 % de los chicos con Duchenne tienen una mutación puntual en su gen de la distrofina donde esta cambiada una palabra del código de aminoácidos en uno de los tres codones de parada, TGA, TAG Y TAA, donde, después de la transcripción a ARNm, la síntesis de distrofina es detenida antes de tiempo. La gentamicina es un antibiótico que causa que el mecanismo de traducción del ARN en los ribosomas ignore un codón de parada tan prematuro, esto es leer rápidamente a través de él. Los codones de parada normales, los que están protegidos por una estructura especial tridimensional, sin embargo, serían leídos o usados como antes.

En ratones-mdx, hasta el 20 % de la cantidad normal de distrofina nueva y funcional ha sido obtenida de este modo. La gentamicina tiene la ventaja de ser un fármaco conocido, cuyo empleo como una posible terapia para la distrofia muscular no necesitaría largos procedimientos de aprobación (*Sweeney, Filadelfia*).

Dos estudios clínicos con gentamicina han sido realizados en chicos con Duchenne aplicándose inyecciones de 7,4 mg de gentamicina por kilogramo por día durante 14 días. En Bethesda, fueron tratados 2 chicos con Duchenne y 2 con distrofia Becker, en Columbus 10 chicos con Duchenne y 3 con distrofia muscular del Anillo Óseo (de Cinturas). Ninguna distrofina nueva podría ser descubierta hasta después de que finalizara la prueba, pero los altos niveles de Creatina Kinasa habían disminuido considerablemente y permanecieron en un nivel inferior durante algún tiempo, una indicación de que el fármaco tenía algún efecto benéfico sobre la membrana de las células del músculo. Posiblemente el período de prueba de 14 días era insuficiente para tener un efecto positivo sobre la síntesis de distrofina. Por lo tanto, otra prueba clínica de más larga duración aplicada en 36 pacientes ahora es realizada en Columbus durante la que se aplicaran inyecciones intravenosas de gentamicina cada tres días durante seis meses. Algunos pacientes con codones de parada después de una mutación de cambio del marco de lectura también serán incluidos (*Mendell, Columbus; Fischbeck, Bethesda*).

La gentamicina, sin embargo, puede causar efectos secundarios serios, como daño en el oído interior y riñón, los que posiblemente pueden ser evitados por una modificación de la estructura del fármaco y por exámenes frecuentes de chequeo. Otros antibióticos similares a la gentamicina han sido intentados con algún éxito en ratones mdx como la negamicina (*Matsuda, Tokio*), y la geneticina (*Flanigan, Salt Lake City*).

Activación de la utrofina: La utrofina es una proteína similar a la distrofina. En los humanos, esta localizada en el cromosoma 6, tiene muchos exones como el gen de la distrofina y contiene aproximadamente 1 millón de nucleótidos. La proteína utrofina es aproximadamente 7 % más corta que la distrofina, pero tiene una estructura y la función muy similar. Está presente en muchos tejidos del cuerpo, también en el músculo, pero allí se concentra cerca de las uniones neuromusculares, las regiones donde los nervios motores se ponen en contacto con la membrana del músculo. Antes del nacimiento, la concentración de utrofina en el músculo es mucho más alta que después del mismo. Esta proteína, incluso cuando está presente sólo en pequeñas cantidades, hace los síntomas de la distrofia Duchenne menos severos de lo que serían si la utrofina también estuviera ausente. De hecho, en ratones-mdx, cuyo gen de la utrofina fue eliminado experimentalmente, no teniendo ni distrofina, ni utrofina, están realmente enfermos en contraste a los ratones-mdx normales cuyos músculos no se degeneran.

Los experimentos con ratones han mostrado, que la utrofina, si está presente en cantidades suficientes, puede sustituir a la distrofina y asumir sus funciones. La distrofia muscular de ratones-mdx prácticamente fue curada así. Esto fue logrado por la introducción de minigenes de utrofina en la línea de células germinales, una técnica que no puede ser usada en humanos (*Davies, Oxford*).

Para una posible terapia para la distrofia Duchenne, otra estrategia es seguida, que es aumentar la cantidad normalmente baja de utrofina *aumentando* la actividad de su gen. Para hacer esto, una sustancia de activación es necesaria, la que podría ser un fármaco conocido, o alguna otra sustancia química o natural, que podría actuar sobre uno de los dos promotores de la utrofina. Usando sistemas automáticos en-vitro, miles de compuestos químicos, algunos de ellos hechos automáticamente por química combinatoria, son probados para conocer su capacidad de aumentar la expresión del gen de la enzima luciferasa, que es más fácil de analizar que el de la utrofina. Cualquier acierto, de algún componente activo en estas pruebas preliminares será investigado para conocer su potencial de activación del gen de la utrofina. (Davies, Oxford).

Una compañía privada en Basel prueba varios grupos seleccionados de sustancias farmacológicamente activas sintéticas y naturales para conocer su capacidad para aumentar la expresión de utrofina. Estas pruebas son realizadas en cultivos de células humanas de músculo normales y distróficas obtenidas de biopsias. Los primeros resultados indican que varios glucocorticoides, entre ellos la prednisona, pueden aumentar la expresión de utrofina. Pero debido a sus efectos secundarios, estos fármacos probablemente no serán utilizables para una terapia a largo plazo en distrofia Duchenne. Basándose en la observación, de que algunas medicaciones herbales chinas tradicionales habían mostrado efectos débilmente positivos cuando son usadas contra las distrofias musculares, varios compuestos puros fueron aislados de estas mezclas herbales, y entre ellos uno definitivamente aumentaba la expresión de utrofina. Sin embargo, el compuesto activo mostró actividad glucocorticoide y por lo tanto causaría efectos hormonales secundarios indeseables. La empresa actualmente emprende esfuerzos para identificar las moléculas que aumenten la expresión de utrofina y que no muestren tales efectos secundarios (Meier, Basel).

Como en otros ARNm, una región de uno de los extremos del ARNm de la utrofina no es traducida en proteína. Esta región al parecer contiene las secuencias reguladoras que parecen estabilizar el ARNm y dirigirlo expresamente a los sitios de la unión neuromuscular sobre la membrana de las células del músculo esquelético. Podría ser posible encontrar las sustancias que manipulen estos eventos para que el aumento de la expresión de utrofina fuera distribuido uniformemente sobre la membrana del músculo entero como la distrofina normalmente lo hace (Jasmin, Ottawa).

Ratones-mdx transgénicos han sido creados que expresan utrofina sólo cuando reciben el antibiótico tetraciclina en su agua para beber. Usando estos ratones, un número de pruebas fisiológicas estandarizadas han sido desarrolladas, las que serán importantes para investigar los efectos del aumento de la expresión de utrofina, y que son generalmente aplicables para resultados de pruebas obtenidos en laboratorios diferentes y puedan ser comparados objetivamente (Gillis, Bruxelles).

Otra observación prometedora es el bajo grado de inflamación crónica en los músculos de ratones mdx a que conduce el marcado aumento de la expresión de utrofina en las regiones de la membrana lejos de los sitios donde los nervios motores tocan al músculo. Esto causó una mitigación de los síntomas distróficos (Karpati, Montreal)

Hay dos ventajas de aumentar la expresión de utrofina: como pequeñas cantidades de utrofina ya están presentes

aun en chicos con Duchenne, haría que el sistema inmunológico reconozca la utrofina adicional como una sustancia propia, no habría ningún problema de rechazo. Otra ventaja consiste en que el fármaco que podría aumentar la expresión del gen, alcanzaría todos los músculos y no sólo aquellos solo convenientes para inyecciones intramusculares.

Una sustancia, sin embargo, que active el gen de la utrofina, podría hacer lo mismo con otros genes, aunque hay ejemplos de aumento de la expresión del gen sin que interfiera con actividades génicas sin relación. La selección cuidadosa de las de sustancias de activación de la utrofina, por lo tanto, debería hacer que un uso terapéutico a futuro no produzca efectos indeseables.

Sintrofina: Las cinco sintrofinas conocidas son proteínas que median la interacción de las proteínas señalizadoras entre los complejos distrófino y utrofino en la membrana de la célula muscular. Los estudios con ratones que carecen de α -sintrofina sugieren que esta forma de sintrofina participa en la regulación de la síntesis de la utrofina o en el ensamblaje del complejo utrofino en la membrana. El entendimiento más detallado de este proceso puede tener consecuencias para una terapia con utrofina (Froehner, Chapel Hill).

Aumento de la expresión de integrina: Hay un número de integrinas, proteínas que unen las células del músculo unas con otras y con su lamina basal circundante, y que también participan en la transmisión de señales de una célula a otra. Los pacientes con Duchenne y Becker tienen más $\alpha 7\beta 1$ -integrina que la gente sana, y se ha sugerido que esto puede reducir el progreso de la enfermedad. En ratones severamente distróficos, los cuales no tienen ni distrofina ni utrofina, la cadena $\alpha 7$ de integrina obtenida de ratas fue expresada en ratones transgénicos por medio de un promotor de creatina kinasa como activador, y que condujo también a una cantidad mayor de la subunidad $\beta 1$. Esta manipulación genética aumentó la $\alpha 7\beta 1$ -integrina de 2,0 a 2,3 veces la cantidad normal y, como consecuencia, se amplió la longevidad de los ratones al triple, se redujo la cifosis (deformación de la columna), la movilidad fue mantenida, así como la estructura de la unión neuromuscular.

Así, la concentración más alta de esta forma particular de integrina puede ayudar a la membrana del músculo a permanecer intacta compensando los defectos de causado por la acción de la falta de distrofina y utrofina. Las estrategias para aumentar la integrina en chicos con Duchenne como un medio de aliviar los síntomas de la enfermedad podría implicar insertar genes adicionales de la integrina o un tratamiento farmacológico que aumente la actividad del gen de la $\alpha 7$ -integrina que se conoce esta localizado en el cromosoma 12 (Kaufman, Urbana).

Leupeptina: Esta es un tripeptido que consiste de tres aminoácidos, que inhiben la enzima calpaina. La calpaina destruye las proteínas en las células del músculo cuando el calcio entra de un modo descontrolado, como en la distrofia Duchenne y otras enfermedades neuromusculares. Al unirse la leupeptina con la carnitina, el efecto inhibitorio es aún mayor. En experimentos con monos y ratones, la degeneración del músculo fue inhibida. Los estudios con pacientes son planeados hacia 2002. El fármaco puede ser administrado mas oralmente que por vía inyección. Es posible que la degeneración de músculo en otras en-

fermedades neuromusculares también pudieran verse influidas con este tratamiento (*Stracher, Brooklyn*).

Estabilizador de la membrana: La sustancia sintética Polaxamer 188 (P188), que comparte muchas de las propiedades químicas de las membranas, ha sido usada para estabilizar los glóbulos rojos sanguíneos en la anemia falciforme y prevenir el daño a las células del músculo del corazón durante un paro cardíaco. Como la ausencia de distrofina conduce al daño de la membrana del músculo, la P188 podría ser usada para proteger las células del músculo de los efectos de la tensión física. Experimentos con ratones mdx son realizados ahora (*Quinlan, Cincinnati*).

JNK1: En ratones sin distrofina y sin la proteína muscular MyoD, la señal de proteína JNK1 es activada, causando que se produzca apoptosis, el suicidio de la célula, la que conduce a la degeneración celular del músculo en la distrofia muscular. Este efecto nefasto se debe a la inactivación de la proteína muscular NFATc1. La inyección directa en el músculo de la proteína naturalmente inhibidora JIP1, empaquetada dentro de un adenovirus, dramáticamente redujo la destrucción de la fibra muscular, porque interfiere con la JNK1. Actualmente, péptidos específicos, pequeños pedazos de proteína, dirigida contra la JNK1 son probados como una nueva estrategia terapéutica para detener la degeneración del músculo en la distrofia Duchenne (*Megeney, Ottawa*).

Óxido nítrico sintetasa: En ratones mdx y pacientes con Duchenne, la cantidad de la enzima óxido nítrico sintetasa, ONS, se reducen enormemente en el complejo distrofínico de la membrana, por lo que el producto de la enzima, el biológicamente activo gas óxido nítrico, ON, no pueda realizar muchas de sus funciones y su ausencia contribuye a la degeneración del músculo. Un ratón mdx transgénico con la cantidad normal de óxido nítrico sintetasa mostró una considerable reducción de los signos patológicos como la inflamación, lesiones de la membrana y alta actividad de creatina kinasa. Una prueba clínica para probar la eficacia de fármacos anti-inflamatorios en pacientes con Duchenne ha sido iniciada (*Tidball, Los Angeles*).

Aumento de la regeneración del músculo: Es sabido que la proteína conocida como *factor de crecimiento similar a la insulina* aumenta la síntesis de proteína, experimentos fueron hechos para determinar si esto podría ser usado para aumentar la regeneración muscular en músculos distrofos. Ratones distrofos fueron creados para que produjerán este factor en cantidades relativamente grandes en su tejido muscular, llamado después de eso *factor de crecimiento muscular similar a la insulina 1*, mIGF1. La masa muscular de estos ratones-mdx transgénicos aumento al menos en un 40 %, mientras la fibrosis y el deterioro del músculo normalmente encontrado en el diafragma y cuádriceps de ratones mdx viejos se redujo significativamente, y la regeneración del músculo aumento considerablemente (*Rosenthal, Roma*).

Transformando la piel en músculo: La proteína galectina-1 se genera en el músculo esquelético y sus células precursoras, mioblastos y miotubos, y participa en los procesos que conducen a nuevo y regenerado tejido muscular. Se ha demostrado que los fibroblastos, que se desarrollan en tejido conectivo, pueden ser transformados en células musculares cuando son cultivados en cultivos de tejido que contienen galectina-1. Los fibroblastos fueron obtenidos de la piel de ratones recién nacidos y fetos hu-

manos. El trabajo continua para determinar las condiciones bajo las que lo fibroblastos de tejido más viejo de piel podrían ser usados. Tales fibroblastos de la piel podrían ser recogidos fácilmente de un paciente con Duchenne, transformarlos en células de músculo con la galectina-1, entonces ser modificadas genéticamente para sintetizar distrofina normal, y finalmente trasplantadas de nuevo en el paciente (*Watt, Londres*).

Glucocorticoides, esteroides: Dieciséis estudios clínicos en todo el mundo han probado la eficacia de fármacos derivados de la cortisona, sobre todo la *prednisona*, para reducir la pérdida de la fuerza muscular de chicos con Duchenne. Entonces, hubo indicaciones de que un nuevo corticoide, el *deflazacort*, podría actuar de modo similar, pero con menos efectos secundarios. Desde 1992 hasta 1997, fue realizado con la participación de 14 centros musculares alemanes un estudio en el cual el efecto de mantenimiento muscular de los dos fármacos similares fue comparado con la historia natural bien documentada de la enfermedad. Las dosis empleadas eran de 0,75 mg por kilogramo de peso corporal por día para la prednisona y 0,9 mg por kilogramo por día para el deflazacort. Ambos fármacos pueden mantener la fuerza muscular durante al menos dos o tres años y, en casos aislados, pueden prolongar la capacidad de andar hasta los 14 años de edad. El efecto secundario más importante de la prednisona es el aumento de peso en aproximadamente el 20 % de los pacientes. Con el deflazacort, las cataratas leves, opacamiento de la lente del ojo, eran más frecuentes que con la prednisona. Ambos fármacos tenían un efecto de retardo del crecimiento, otros efectos secundarios fueron insignificantes. Después de detenerse la medicación, la degeneración del músculo y crecimiento normal inicio de nuevo.

Los resultados del estudio aún no permitieron decidir todavía cual es el mejor momento para empezar el tratamiento, por ejemplo antes de los cinco años de edad. Los pacientes quienes desean comenzar este tratamiento deben hacerlo en acorde con un estudio bien documentado para obtener más información y garantizar los extensos controles necesarios debido a los efectos secundarios. El estudio en Alemania es continuado con documentación a largo plazo que incluye los datos de algunos pacientes quienes fueron tratados durante más de siete años (*Reiter, Mainz*).

Para reducir al mínimo los efectos secundarios, son emprendidas pruebas para administrar la medicación no diariamente, sino en días alternados (*Topaloglu, Ankara*), dando una dosis total semanal en dos días consecutivos (*Conolly, San Louis*), o periódicamente, por ejemplo durante los diez primeros días de cada mes (*Dubowitz, London*).

En el Reino Unido, el *grupo de prueba con esteroides* que comprende a 16 centros pediátricos neuromusculares, contempla una larga prueba terapéutica controlada con placebo para determinar si los corticoides son capaces de prolongar la ambulación y mejorar la calidad de vida. Para tal prueba al menos será necesario reclutar 190 chicos con Duchenne lo que tomaría tres años, mientras que la prueba por sí misma durará aproximadamente ocho años. Un tratamiento intermitente de dosis bajas, 10 días de uso y 10 días libres, es previsto con prednisolona (*Muntoni, London*).

Aún no se conoce por qué la prednisona, o la muy similar prednisolona, y el deflazacort retrasan la degeneración del músculo. Mientras parte de su acción probablemente implica su acción anti-inflamatoria, otros mecanismos de acción son también posibles. Al analizar la actividad de más de mil genes en ratones mdx tratados con prednisona con la nueva técnica de micro serie, fue encontrado que aproximadamente el 5 % de los genes mostró actividades reducidas o aumentadas. El análisis del modelo de expresión génica inducida por glucocorticoides ayudará entender el mecanismo molecular de la acción de los glucocorticoides en el músculo esquelético, lo que podría ayudar desarrollar un tratamiento más específico pero menos tóxico con estos fármacos. Esto es esperado, ya que esto permitirá nuevos acercamientos terapéuticos (*Muntoni*, London).

La *Oxandrolona*, un esteroide anabólico (diferente de los corticoesteroides, que son esteroides catabólicos) a veces usado por atletas, fue probado en un estudio con 51 chicos con Duchenne. Sin embargo, la pequeña mejora en la fuerza del músculo encontrada, no justifica su empleo como fármaco en vez de la prednisona o el deflazacort (*Fenichel*, Nashville).

Creatina: Otra sustancia la cual pudiera disminuir la degeneración muscular, es la *creatina*, un compuesto natural el cual es usado en grandes cantidades por los atletas para aumentar su rendimiento. La creatina, la forma fosforilada de la fosfocreatina, provee energía no solo para la contracción muscular si no también para la remoción del calcio superfluo, una de las causas de la destrucción de las células musculares. Experimentos con ratones mdx han mostrado que suplementación con creatina mejora la salud muscular, y pudiera proveer las bases científicas para su uso como terapia coadyuvante en la distrofia Duchenne (*Wallimann*, Zürich; *Rüegg*, Lausanne).

En un estudio clínico controlado, también llamado doble ciego, con 8 pacientes con Duchenne, 10 con Becker, y 18 con otras enfermedades musculares, mostró después de 8 semanas con dosis de creatina monohidrata de 5 gramos para niños y 10 gramos para adultos, un ligero pero significativo efecto benéfico a corto plazo en la fuerza y rendimiento muscular sin efectos adversos. Mas estudios clínicos deberán ser hechos antes de que pueda ser recomendado como medicación a largo termino para preservar el músculo en chicos con Duchenne (*Walter*, München).

Estudios clínicos: Estudios clínicos con chicos con Duchenne serán más y más necesarios en vista del aumento de resultados positivos en experimentos con animales. Después del nulo éxito de las pruebas con la transferencia de mioblastos en pacientes con Duchenne a principios de los 1990's, los científicos ahora son muy cautelosos cuando planean tales estudios. La planeación de estudios clínico tendría que ser realizada en varios pasos, de los cuales el primero, *la fase I*, tomaría varios años en estar completamente listo, siendo su propósito que el nuevo tratamiento no viniera acompañado de efectos secundarios inaceptables. Sólo después de ese paso, mas estudios pueden ser iniciados para averiguar si el tratamiento realmente mejora o mantiene la fuerza muscular, *la fase II*, y después debe averiguarse cual será la dosis óptima, *la fase III*. Prácticamente todos estos estudios tienen que ser realizados bajo pruebas de control doble-cego, esto significa, que sólo la mitad de los pacientes recibe la sustancia a ser probada, mientras que la otra mitad recibe un compuesto inactivo, un placebo, ni los pacientes ni los

investigadores conocen cual paciente pertenece a cual grupo hasta que la prueba ha sido completada, el código es roto y los resultados son analizados. Estos estudios y los procedimientos de aprobación consumen tiempo, tomando muchos años, y son caros de realizar. Sin embargo, hay ejemplos de tratamientos que alcanzan a los pacientes rápido, como el Gleevec, fármaco que fue aprobado en el 2001 en unos pocos meses sin examinarse todos los efectos secundarios, después de que se mostró que este podría curar aproximadamente al 90 % de los pacientes con cáncer de la sangre, leucemia crónica mieloide.

En el marco de trabajo del *Grupo Cooperativo Internacional de Investigación Neuromuscular*, CINRG en sus siglas en ingles, laboratorios en EE.UU., Canadá, Bélgica, Argentina, Australia, y India realizan estudios clínicos en chicos con Duchenne con sustancias que habían mostrado resultados positivos en un programa de selección con ratones distróficos. Los estudios con creatina y glutamina ya han sido iniciados. Una prueba con *coenzima Q10* en niños tratados con prednisona inicio en agosto del 2001, otra con pacientes en sillas de ruedas se planea. Una prueba piloto de *oxatomida* ha iniciado en abril de 2002 y una prueba con *pentoxifilina* iniciará en mayo o junio del 2002. Mas pruebas para ser iniciadas en el 2002 son planeadas con *taurina*, *carnitina*, y *ácido nicotínico*. Además, pruebas para la eficacia y toxicidad de muchos fármacos potenciales en ratones y perros distróficos son preparadas. Para la evaluación y la documentación de estos estudios, procedimientos de control estandarizados han sido desarrollados. No sólo las funciones musculares son medidas, también otros parámetros como por ejemplo la calidad de vida. Algunos métodos son modificados para que puedan ser usados en pacientes muy jóvenes y viejos (*Escolar*, Washington, actualizado abril de 2002).

La organización CINRG tiene problemas para encontrar suficientes pacientes para participar en estas pruebas. Los pacientes en países fuera de los Estados Unidos que deseen unirse deberían ponerse en contacto con los centros de CINRG en su propio país o en países vecinos.

Detección por CK: En Alemania, los infantes varones presintomáticos con distrofia muscular Duchenne y Becker se detectan por el *programa voluntario de detección CK* en el cual la enzima creatina kinasa, CK, es determinada en una macnha de sangre seca de chicos de 4 semanas a aproximadamente 6 meses de edad. Desde 1974, más de 500 000 infantes varones han sido analizados. 130 muchachos con distrofia Duchenne (1:3 800) y 28 con distrofia Becker (1:17 900) han sido encontrados. Tales programas serán necesarios en el futuro, porque el progreso de la investigación terapéutica conducirá a estudios con pacientes muy jóvenes quienes no tienen ninguno de lo síntomas clínicos y cuyos músculos están todavía en gran parte intactos. Un tratamiento futuro probablemente será capaz de parar o retardar el proceso distrófico, pero no sustituir el tejido muscular ya perdido (*Scheuerbrandt*, Breitnau/Freiburg).

Programas similares de detección son realizados en Gales (*Bradley*, Cardiff), Bélgica (*Eyskens*, Antwerpen), Chipre (*Drousiotou*, Nicosia), y Canadá (*Greenberg*, Winnipeg).

¿Cuándo se tendrá una terapia? La distrofia muscular Duchenne siempre ha acompañado al hombre y también a los animales que tienen músculos esqueléticos. Esta fue descrita correctamente por primera vez en 1851 por el doctor inglés *Edward Meryon*. Sin embargo, obtuvo des-

pués su nombre del médico francés *Duchenne de Bolonia*, quien describió en 1861 no sólo sus síntomas, sino también su histología. De su modo de herencia, se conoció a principio del siglo 20 que un defecto en el Cromosoma X es responsable de la enfermedad. Pero sólo hasta 1986 era identificado el gen mismo, el *gen de la distrofina*, (*Kunkel*, Boston) y poco tiempo después la proteína *distrofina* fue caracterizada (*Hoffman*, Washington), la que esta ausente en los chicos con Duchenne. El rápido paso de la investigación genética dio lugar a la esperanza de que pronto sería posible sustituir o reparar el gen y así curar la enfermedad.

Este optimismo fue prematuro. Los primeros estudios en 1991 con la transferencia de mioblastos mostraron que esta técnica, que se veía promisoría en ratones, era ineficaz en los chicos con Duchenne. Ahora, más de 16 años después de la detección del gen, no hay en ninguna parte ninguna terapia para la distrofia Duchenne. Como este informe muestra, el trabajo de investigación se realiza basándose en más de 30 métodos diferentes que son aplica-

dos en ratones y perros distróficos, y algunos ya en chicos con Duchenne. Sin embargo, estos estudios consumen tiempo, y la aprobación de un tratamiento tomará años adicionales.

Todos estos requerimientos deben ser considerados y muchos datos adicionales colectados, antes de que sea posible hacer cualquier predicción sobre cuanto tiempo mas tomará que se tenga listo un tratamiento seguro y eficaz para niños con distrofia muscular Duchenne en todas partes del mundo. La respuesta a esta pregunta es la más importante para los padres y sus hijos enfermos. Esto probablemente todavía tomará muchos años, y para que la distrofia muscular Duchenne sea derrotada. Esto es menos de que lo que había sido esperado, lo que es el lado negativo de este difícil problema, lo positivo es que cientos de investigadores capaces y dedicados en más de 60 laboratorios en el mundo entero trabajan para encontrar una cura: por lo tanto, es *seguro que un tratamiento eficaz estará ahí, tarde o temprano*.

Los científicos mencionados en el informe: los científicos son puestos en una lista por orden alfabético con sus direcciones abreviadas y sin ninguno de sus títulos. La mayor parte de ellos son profesores y todos tienen una especialidad médica o postgrado. A menudo sus numerosos colegas no son mencionados por motivos de espacio. Muchas publicaciones originales, que contienen los nombres de todos los miembros de un equipo de investigación, pueden ser obtenidas del autor de este informe.

Richard J. **Bartlett**, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA
Laurent **Bernheim**, Hôpital Cantonal Universitaire, Genova, Italia
Don **Bradley**, University Hospital of Wales, Cardiff, Pais de Gales
Serge **Braun**, Transgène S.A., Strasbourg, Francia
Kevin P. **Campbell**, University of Iowa College of Medicine, Iowa City, IA, EUA
Jeffrey **Chamberlain**, Dept. of Neurology, University of Washington, Seattle, WA, EUA
Paula **Clemens**, Dept. of Neurology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA
Anne **Conolly**, Dept. of Pediatric Neurology, Washington University, St. Louis, MO, EUA
Judith C. T. **van Deutekom**, Dept. of Human Genetics, Leiden University Medical Center, Leiden, Holanda
Kay **Davies**, Dept. of Genetics, University of Oxford, Oxford, Inglaterra
J. George **Dickson**, Royal Holloway College, University of London, Egham, Surrey, Inglaterra
Anthi **Drouiotou**, Cyprus Institute of Neurology and Genetics, Nicosia, Chipre
Victor **Dubowitz**, Imperial College School of Medicine, Hammersmith Campus, London, Inglaterra
Diana **Escolar**, Children's National Medical Center, Washington, DC, EUA
François **Eyskens**, Centrum voor Opsporing van Metabole Aandoeningen, Antwerpen, Belgica
Michel **Fardeau**, Institut de Myologie, Paris, Francia
Gerald M. **Fenichel**, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, EUA
Raimond **Fenwick**, Quest Diagnostics, San Juan Capistrano, CA, EUA
Kenneth **Fischbeck**, Neurogenetics Branch, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA
Kevin M. **Flanigan**, Dept. of Neurology and Pathology, University of Utah, Salt Lake City, UT, EUA
Stanley **Froehner**, Dept. of Cell Physiology, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, EUA
Jean-Marie **Gillis**, Dept. de Physiologie, Université de Louvain, Bruxelles, Belgica
Cheryl **Greenberg**, Cadham Provincial Laboratory, Winnipeg, Manitoba, Canada
Eric **Hoffman**, Children's National Medical Center, Washington, DC, EUA
Paul C. **Holland**, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Canada
Johnny **Huard**, Children's Hospital, University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, PA, EUA
Bernard J. **Jasmin**, Center of Neuromuscular Diseases, University of Ottawa, Ottawa, Canada
Robert **Kapsa**, Melbourne Neuromuscular Research Institute, Melbourne, Australia
George **Karpati**, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Canada
Stephen **Kaufman**, Dept. of Cell and Structural Biology, University of Illinois, Urbana, IL, EUA
Louis **Kunkel**, Harvard University, Children's Hospital, Boston, MA, EUA
Hanns **Lochmüller**, Genzentrum der Universität, München, Alemania
Ryoichi **Matasuda**, Dept. of Life Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japon
Fulvio **Mavilio**, Dept. of Biomedical Sciences, University of Modena School of Medicine, Modena, Italia
Lynn **Megeney**, Health Research Institute, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada
Thomas **Meier**, MyoContract Pharmaceutical Research AG, Basel, Suiza
Jerry **Mendell**, Dept. of Neurology, Ohio State University, Columbus, OH, EUA
Clemens **Müller-Reible**, Humangenetisches Institut, Biozentrum der Universität, Würzburg, Alemania
Francesco **Muntoni**, Dept. of Paediatrics, Imperial College School of Medicine, London
Gertjan B. **van Ommen**, Dept. of Human Genetics, Leiden University Medical Center, Leiden, Holanda

Terrence **Partridge**, Muscle Cell Biology Group, Hammersmith Hospital, London, Inglaterra
John **Quinlan**, University of Cincinnati, OH, EUA
Thomas **Rando**, Dept. of Neurology, Stanford University School of Medicine, Palo Alto, CA, EUA
Peter **Ray**, Division of Molecular Diagnostics, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada
Nadia **Rosenthal**, European Molecular Biology Laboratory, Monterotondo, Roma, Italia
Bernd **Reitter**, Kinderklinik der Universität, Mainz, Alemania
Urs T. **Rüegg**, Ecole de Pharmacie de l'Université, Lausanne, Suiza
Günter **Scheuerbrandt**, Testlaboratorium Breitnau, Breitnau bei Freiburg, Alemania
Rainer **Storb**, Fred Hutchinson Cancer Research Center, University of Washington, Seattle, WA, EUA
Alfred **Stracher**, Dept. of Biochemistry, State University of New York, Brooklyn, NY, EUA
H. Lee **Sweeney**, Dept. of Physiology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, EUA
James G. **Tidball**, Dept. of Physiological Sciences, University of California, Los Angeles, EUA
Haluk **Topaloglu**, Dept. of Child Neurology, Hacettepe Children's Hospital, Ankara, Turquia
Theo **Wallimann**, Institut für Zellbiologie, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Suiza
Maggie C. **Walter**, Friedrich-Baur-Institut, Medizinische Klinik der Universität, München, Alemania
Diana **Watt**, Dept. of Neuromuscular Diseases, Charing Cross Hospital, London, Inglaterra
Dominic **Wells**, Dept. of Neuromuscular Diseases, Imperial College of Medicine, London, Inglaterra
Steve **Wilton**, Australian Neuromuscular Research Institute, University of Western Australia, Perth, Australia
Jon **Wolff**, Dept. of Pediatrics, University of Wisconsin Medical School, Madison, WI, EUA

Dr. Günter Scheuerbrandt
Im Talgrund 2
D-79874 **Breitnau**
Alemania
Tel.: +49-7652-1777, Fax: +49-7652-91813-13
e-Mail: gscheuerbrandt@t-online.de
Internet: <http://www.duchenne-research.com>

Traducción: Ricardo Rojas Caballero en Mexico
E-mail: distrofiamuscular@yahoo.com.mx
Internet: <http://www.distrofia.cjb.net>