

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**



**Casa abierta al tiempo**

**Estudio de la asociación entre el perfil de expresión de MicroRNAs con la capacidad de regeneración de las células satélite durante las distrofias musculares Duchenne y Becker.**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de  
Maestra en Biología Experimental.**

**P R E S E N T A**

**Biol. Exp. Jacqueline Molina Osorio**

**Comité de tutores:**

**Codirectora externa**

**Dra. Alejandra Contreras Ramos**

**Codirector interno**

**Dr. Humberto González Márquez**





**Asesora**

**Dra. Guadalupe Díaz Rosas**

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 918366

## Miembros del Jurado

Nombre	Firma
<b>Dra. Guadalupe Díaz Rosas</b> Presidenta	
<b>Dr. Edmundo Bonilla González</b> Secretario	
<b>Dr. Ivan Uriel Bahena Ocampo</b> Vocal	
<b>Dra. Roxana Uri Miranda Labra</b> Vocal	

## Miembros del Comité Tutoral

Codirectora

**Dra. Alejandra Contreras Ramos**

Investigador de Ciencias Médicas

Laboratorio de Investigación en Biología del Desarrollo y Teratogénesis

experimental,

Hospital Infantil de México Federico Gómez

Codirector

**Dr. Humberto González Márquez**

Profesor-investigador

Laboratorio de Expresión Génica, Proteómica,

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

UAM-Iztapalapa

Asesora

**Dra. Guadalupe Díaz Rosas**

Laboratorio de Investigación en Biología del Desarrollo y Teratogénesis

experimental,

Hospital Infantil de México Federico Gómez

# Dedicatoria

A mi Madre, Padre, hermana y hermanos

## **Agradecimientos**

A mis padres, que son mi pilar y mi inspiración de superación; por la orientación, el apoyo moral y emocional brindado durante el proceso de ingreso al Posgrado en Biología Experimental hasta el día de hoy apoyo sin el cual no hubiese culminado.

A mis hermanos, quienes me impulsan a superarme día con día, por momentos que no compartiré con nadie más. En especial, a mi hermana Samara, por los desvelos, comprensión, apoyo y consuelo, sobre todo, por procurar de mí.

A la Universidad Autónoma Metropolitana, que me proporcionó docentes para mi formación profesional y personal dentro de sus instalaciones.

A la Dra. Guadalupe Diaz Rosas y a la Dra. Alejandra Contreras Ramos, por el apoyo brindado a la realización de este proyecto, el tiempo dedicado a mi formación y aprendizaje, a los periodos de correcciones y el apoyo moral, por la oportunidad brindada de formar parte de su grupo de investigación, pilar fundamental para continuar con mi formación académica, además de su confianza y entusiasmo.

Al Dr. Humberto González Márquez, por el apoyo brindado y, sobre todo, por la comprensión y paciencia en situaciones especiales, por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis y al artículo de revisión, por los consejos y, sobre todo, por el conocimiento compartido para llevar a la culminación este proyecto.

A Lucia, perteneciente al personal del laboratorio de Biología Molecular y Teratogénesis, por el apoyo y dirección brindada durante la realización de varias metodologías y a la Dra. Ada J. García, por el tiempo dedicado a correcciones, las enseñanzas y el conocimiento compartido.

A Viridiana y Sergio y sus preciosos hijos Emiliano y Diego, por su apoyo, consideración, confianza, consejos, por los cuidados, las noches de desvelo, por estar presentes en cada momento, por el amor y sobre todo por creer en mí y todos esos bellos momentos compartidos.

A mis compañeros y amigos Lesly, Alí, Ari, Abigail, Mayra, Nancy. Andrea y especialmente a Gustavo, Michel y Paola, por el apoyo emocional, por los favores y, sobre todo por los buenos momentos y sonrisas compartidas, espero conservarlos a lo largo de mi vida.

Un agradecimiento especial a la Dra. Luz María Garduño Zarazúa, por el apoyo, la confianza, tiempo y, sobre todo, la comprensión en aspectos más allá de los académicos y por su amistad.

## Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar la asociación entre miRNAs y el proceso de diferenciación de células satélite (CS) durante la distrofia muscular de Duchenne y Becker. Usando microarreglos de expresión, se encontró que 15 miRNAs (miR-1-2, miR-184, miR-130a, miR-106b, miR-155, miR-153-1, let-7f-2, miR-130b, let-7e, miR-141, miR-20, miR-133a-1, miR-19a, miR-183, miR-34c) se expresaron más en pacientes con DMD y BMD que en controles sanos. Posteriormente, mediante un análisis *in silico*, fue posible proponer que 9 de estos miRNAs (miR1-2, let-7f-2 y let-7e, miR-133a, miR-130a, miR-155, miR-153-1, miR-130b, miR-19) están involucradas en la regulación de las proteínas *PAX3*, *PAX7*, *MDFIC* y *PAXBP1*, y en la activación y diferenciación de células satélite. Adicionalmente, se realizó una revisión sistemática en la que se destacan cinco miRNAs (miR-1, -155, let-7f, let-7e, -133a) de los nueve seleccionados del análisis *in silico*, que podrían regular las proteínas implicados en proceso de activación y de diferenciación de CS y en fibrosis e inflamación como *PAX7*, *MIOGENINA*, *MEF-2C* y *MYOD*, *HDAC2*, *MYF5*, *SOCS1*, *IL-6*, *INFr*, *MCP-1*, *TNF- $\alpha$* , *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL24A1*, *COL27A1*, *ITGA1*, *ITGA4*, *SCD1*, *THBS1*, *TGF- $\beta$* , *SMAD3*, y *SMAD5*.



## Abstract.

The objective of this work was to determine the association between miRNAs and the differentiation process of satellite cells (SC) during Duchenne and Becker muscular dystrophy. Using expression microarrays, it was found that 15 miRNAs (miR-1-2, miR-184, miR-130a, miR-106b, miR-155, miR-153-1, let-7f-2, miR-130b, let-7e, miR-141, miR-20, miR-133a-1, miR-19a, miR-183, miR-34c) showed higher expression in DMD and BMD patients than in healthy controls. Subsequently, through an in-silico analysis, it was possible to propose that 9 of these miRNAs (miR-1-2, let-7f-2 and let-7e, miR-133a, miR-130a, miR-155, miR-153-1, miR-130b, miR-19) are involved in the regulation of *PAX3*, *PAX7*, *MDFIC*, and *PAXBP1* proteins, and the activation and differentiation of satellite cells. Additionally, a systematic review was carried out in which five miRNAs stand out (miR-1, -155, let-7f, let-7e, -133a) of the nine selected from the in silico analysis, which could regulate the proteins involved in CS activation and differentiation processes and fibrosis and inflammation like *PAX7*, *MYOGENIN*, *MEF-2C* and *MYOD*, *HDAC2*, *MYF5*, *SOCS1*, *IL-6*, *INF $\gamma$* , *MCP-1*, *TNF- $\alpha$* , *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL24A1*, *COL27A1*, *ITGA1*, *ITGA4*, *SCD1*, *THBS1*, *TGF- $\beta$* , *SMAD3*, and *SMAD5*.

# Índice

<b>MIEMBROS DEL JURADO .....</b>	<b>II</b>
<b>MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL .....</b>	<b>III</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>IV</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>V</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
DISTROFIA MUSCULAR .....	1
DIAGNÓSTICO DE LAS DISTROFIAS MUSCULARES. ....	4
DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE.....	4
DISTROFIA MUSCULAR DE BECKER.....	7
COMPARACIÓN HISTOLÓGICA DMD Y DMB.....	8
MARCADORES DE DAÑO MUSCULAR .....	9
REGENERACIÓN MUSCULAR: CÉLULAS SATÉLITE Y MIOBLASTOS .....	10
MIRNAS DURANTE LA MIOGÉNESIS.....	14
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>14</b>
JUSTIFICACIÓN .....	17
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>20</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>20</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
OBJETIVO GENERAL .....	20
OBJETIVOS PARTICULARES .....	20
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
GRUPOS DE ESTUDIO Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN/EXCLUSIÓN.....	21
HISTOLOGÍA .....	21
INMUNOHISTOQUÍMICA INDIRECTA.....	22
ESTUDIO DE MICROARREGLOS.....	22
MARCAJE Y PURIFICACIÓN DE SONDAS DE RNA.....	23

MATRICES DE MIRNAS. ....	23
NORMALIZACIÓN DE ARREGLO DE EXPRESIÓN PARA MIRNAS. ....	24
ANÁLISIS IN SILICO. ....	24
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS. ....	24
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CASOS. ....	26
HISTOLOGÍA DE PACIENTES CON DMD Y DMB ..... 28	28
INMUNOHISTOQUÍMICA DE DISTROFINA EN BIOPSIAS DE PACIENTES ..... 28	28
BIOPSIAS DE PACIENTES CON DMD Y DMB ..... 29	29
ANÁLISIS DE ARREGLOS DE EXPRESIÓN..... 33	33
<i>miRNAs en la distrofia muscular de Duchenne</i> ..... 34	34
<i>miRNAs en la distrofia muscular de Becker</i> ..... 38	38
<i>Mapa de calor comparativo entre distrofia muscular de Duchenne (DMD) vs distrofia muscular de Becker (DMB)</i> ..... 42	42
ANÁLISIS IN SÍLICO DE MIRNAS RELACIONADOS CON LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS SATÉLITE... 48	48
<b>DISCUSIÓN... ..</b>	<b>50</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>54</b>

## Lista de figuras

FIGURA 1. MICROGRAFÍA HEMATOXILINA-EOSINA CORTE TRANSVERSAL DE BIOPSIAS DE MUSCULO SANO Y PACIENTES CON DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD) Y DISTROFIA MUSCULAR DE BECKER (DMB) (COMI ET AL., 2022; DUAN ET AL., 2021). .....	9
FIGURA 2. MICROGRAFÍA HEMATOXILINA-EOSINA CORTE TRANSVERSAL MICROGRAFÍAS HISTOLÓGICAS 40X DE BIOPSIAS DE PACIENTES CON DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD) Y DISTROFIA MUSCULAR DE BECKER (DMB) Y LOS CONTROLES SANOS (CTR) (DUAN ET AL., 2021). .....	28
FIGURA 3. INMUNOTINCIONES DE CÉLULAS MIOGÉNICAS LAS FOTOMICROGRAFÍAS EN LAS CUALES SE OBSERVA LA CARENCIA DE PROTEÍNA DISTROFINA EN LAS MUESTRAS DE DMD Y DMB. TOMADAS A 40X, LA BARRA REPRESENTA 50 $\mu$ M, MIENTRAS QUE EL ZOOM FUE TOMADO A 30 $\mu$ M. ....	29
FIGURA 4. FOTOMICROGRAFÍAS MUESTRAN LA COLOCALIZACIÓN DE PAX3 Y PCNA EN TEJIDO DISTRÓFICO VS CTR. TOMADAS A 40X, LA BARRA REPRESENTA 50 $\mu$ M, MIENTRAS QUE EL AUMENTO FUE TOMADO A 35 $\mu$ M. ....	30
FIGURA 5. GRÁFICAS POST CONTEO DE PAX3, PAX3+PCNA UTILIZADO PARA EVALUAR NIVELES DE PROLIFERACIÓN EN DMD Y DMB .....	31
FIGURA 6. FOTOMICROGRAFÍAS REPRESENTATIVAS DE MUESTRAN LA COLOCALIZACIÓN DE PAX7 Y PCNA EN TEJIDO DISTRÓFICO VS CTR. TOMADAS A 40X, LA BARRA REPRESENTA 50 $\mu$ M, MIENTRAS QUE EL AUMENTO FUE TOMADO A 35 $\mu$ M. ....	32
FIGURA 7. GRÁFICAS POST CONTEO DE, PAX7, PAX7+PCNA UTILIZADO PARA EVALUAR NIVELES DE PROLIFERACIÓN EN DMD Y DMB .....	33
FIGURA 8. COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS MIRNAS ENTRE CONTROLES SANOS Y LOS CASOS CON DMD Y DMB. LOS MIRNAS EXPRESADOS A LA BAJA SE REPRESENTAN CON COLOR (VERDE) MIENTRAS QUE MIRNAS CON EXPRESIÓN AL ALZA EN (ROJO). .....	35
FIGURA 9. ANÁLISIS DE SIGNIFICANCIA (SAM) QUE DETERMINA CÓMO SE DIFERENCIAN LOS DATOS ENTRE LOS MIRNAS EXPRESADOS AL ALZA (ROJO) EN LOS CASOS DISTRÓFICOS Y LOS EXPRESADOS A LA BAJA (VERDE). .....	36
FIGURA 10. GRÁFICO DE VOLCÁN, LOS MIRNAS CON ALTA (COLOR ROJO) Y BAJA (EN VERDE) EXPRESIÓN; EN COLOR AZUL, LOS QUE NO PRESENTAN CAMBIOS SIGNIFICATIVOS TOMANDO UNA RAZÓN DE CAMBIO ( FOLD CHANGE) MENOR A 1 A -1. EL VALOR DE CAMBIO ES EL VALOR OBTENIDO DE LA EXPRESIÓN DE MIRNA UTILIZADA PARA DESCRIBIR LA CANTIDAD DE CAMBIOS ENTRE UN VALOR ORIGINAL Y UNA MEDIDA. ....	37

FIGURA 11. MAPA DE CALOR DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS MIRNAS ENTRE CONTROLES SANOS VS DMB RESALTANDO QUE LOS MIRNAS SE ENCONTRARON CON BAJA EXPRESIÓN EN CONTROLES COMPARADO CON EL GRUPO DISTRÓFICO. ....	39
FIGURA 12. GRÁFICO SAM, QUE DETERMINA LOS MIRNAS CON EXPRESIÓN AL ALZA (ROJO) Y A LA BAJA (VERDE) EN LOS CASOS DISTRÓFICOS. MAPA DE CALOR DE MIRNAS CON SIGNIFICANCIA POSITIVA EN DMB COMPARADOS CON LOS CONTROLES (CTR 5 Y 6).....	40
FIGURA 13. GRÁFICO DE VOLCÁN MUESTRA DOS MIRNAS EXPRESADOS A LA BAJA (VERDE) Y 11 MIRNAS EXPRESADAS AL ALZA (ROJO) QUE SON DENOMINADOS MIRNAS SIGNIFICATIVOS.....	41
FIGURA 14. MAPA DE CALOR DE AMBOS GRUPOS DISTRÓFICOS NO SE OBSERVAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS EN LA EXPRESIÓN DE LOS MIRNAS ENTRE AMBOS GRUPOS DMD Y DMB. ....	44
FIGURA 15. SE REALIZÓ UNA COMPARACIÓN ENTRE LA TASA DE CAMBIO DE LOS MIRNAS Y AL HACER EL DIAGRAMA DE VENN SE OBSERVA QUE HAY 15 MIRNAS COMPARTIDOS ENTRE AMBOS GRUPOS, OBTENIENDO ASÍ EL PERFIL DE EXPRESIÓN DE 15 MIRNAS QUE PODRÍAN SER UTILIZADOS COMO BLANCO. ....	47
FIGURA 16. RED DE INTERACCIÓN DE LOS MIRNAS Y SE DETERMINARON 9 MIRNAS DE LOS 15 PERTENECIENTES AL CONJUNTO ENCONTRADO EN LOS PACIENTES CON DMD Y DMB, DE LOS CUALES SOLO 5 (CÍRCULOS AMARILLOS) SE ENCUENTRAN SOBREPRESADOS (MIR-130A, MIR-133A1, MIR-1-2, MIR-153-1, MIR-19A). ....	49

## Lista de tablas

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS TIPOS DE DISTROFIA MUSCULAR. ....	3
TABLA 2. MIRNAS EN DISTROFIAS MUSCULARES .....	18
TABLA 3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CASOS DE DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE.....	26
TABLA 4. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CASOS DE DISTROFIA MUSCULAR DE BECKER.....	27
TABLA 5. MIRNAS ENCONTRADOS REGULADOS DE MANERA SIMILAR EN LAS DISTROFIAS MUSCULARES DUCHENNE Y BECKER.....	45

## Introducción

Las enfermedades neuromusculares se clasifican en: a) Atrofias neurogénicas, que incluyen a las enfermedades de la motoneurona y del nervio (neuropatías); b) trastornos de la unión neuromuscular y c) miopatías o patologías primarias del músculo sin alteraciones estructurales en el nervio periférico. Entre las últimas, se encuentran las distrofias musculares ([Morrison, 2016](#)).

### Distrofia muscular

Las distrofias musculares son un grupo heterogéneo de desórdenes congénitos hereditarios caracterizados por la degeneración del músculo esquelético, inflamación, necrosis y fibrosis, que conducen a hipotonía (bajo tono muscular) progresiva, debilidad y degeneración muscular, causadas por la disrupción de componentes del músculo con la matriz extracelular y su interacción con el sarcolema de membrana ([Butterfield, 2019](#); [Escobar-Cedillo et al., 2021](#))

Las DM conducen a desarrollar discapacidad y, en algunos casos, dirigen a la muerte temprana ([Escobar-Cedillo et al., 2021](#)). Existen nueve tipos de distrofia muscular (Tabla 1) y, en todos ellos, se producen con el tiempo, pérdida de la fuerza y discapacidad progresiva y, en ocasiones, deformidades ([Hernández Ramírez, 2006](#)). Los músculos pueden ser afectados en grados variables dependiendo del tipo de DM, los órganos o tejidos pueden estar involucrados incluido el cerebro. Debido a la variedad de DM es que existen implicaciones para el asesoramiento genético y el tratamiento ([Escobar-Cedillo et al., 2021](#)).

Las formas de DM más comunes son la **distrofia muscular de Duchenne**, seguida de la **distrofia muscular de Becker** (por sus siglas en inglés DMD y DMB, respectivamente).

Debido a la heterogeneidad, gravedad, la edad de inicio, progresión de la enfermedad, complicaciones y pronóstico que varían mucho entre las diferentes formas de DM, es que las implicaciones son significativas para el asesoramiento genético y tratamiento ([Escobar-Cedillo et al., 2021](#)).

Bernabé y colaboradores reportan que la prevalencia de la distrofia muscular de Duchenne en México es de 15.9 a 19.5 casos por cada 100000 hombres nacidos vivos, mientras que hasta el momento no existen estudios sobre distrofia muscular de Becker que reporten la prevalencia en México ([Bernabe-García et al., 2019](#)).

En este trabajo se estudiará la relación entre la distrofia muscular y la regulación de la diferenciación de las células satélite, mediada por los micro-RNA reguladores (miRNAs).



Tabla 1. Características de los tipos de distrofia muscular.

Característica	DMB	Congénita	DMD	Distal	Emery-Dreifus	Facioesca-pulohumeral	Cintura escapulohumeral o pélvica	Miotónica	Oculofaringea
Edad de aparición	Adolescencia a edad adulta temprana	Al nacimiento	2-6 años	40-60 años	niñez-pubertad	niñez y edad adulta temprana	Final de la niñez y la media edad	20-40 años	40-70 años
Progreso	Lento	Lento	Rápido	Lento	Lento	Lento	Lento	Lento	Lento
Deterioro	–	–	–	–	–	Rápido	–	–	–
Supervivencia	Mediana edad	Corta	<20	–	–	50-60 años	–	50-60 años	–
Debilidad muscular	–	leve	leve	leve	leve	leve	leve	leve	leve
Atrofia muscular	–		leve	leve	leve	–	leve	–	–
Músculos afectados	Pelvis, Antebrazos, Parte superior de las piernas, Músculos voluntarios.		Pelvis, Antebrazos, Parte superior de las piernas, Músculos voluntarios.	Antebrazos, Espinilla	Hombros, antebrazos, Espinilla	Hombros, Antebrazos,	Pelvis, Hombros, Cintura escapular	Faciales, Manos, Cuello, Pies	Parpado, Garganta
Deformidad en articulaciones	–	–	–	–	–	–			
Incapacidad total.	–	–	–	ocasional	–	–	–	–	–
Muerte súbita	–	–	–	–	Problemas cardiacos	Complicaciones cardiopulmonar-es.	–	–	–
Incapacidad de tragar	–	–	–	–	–	–	–	–	–

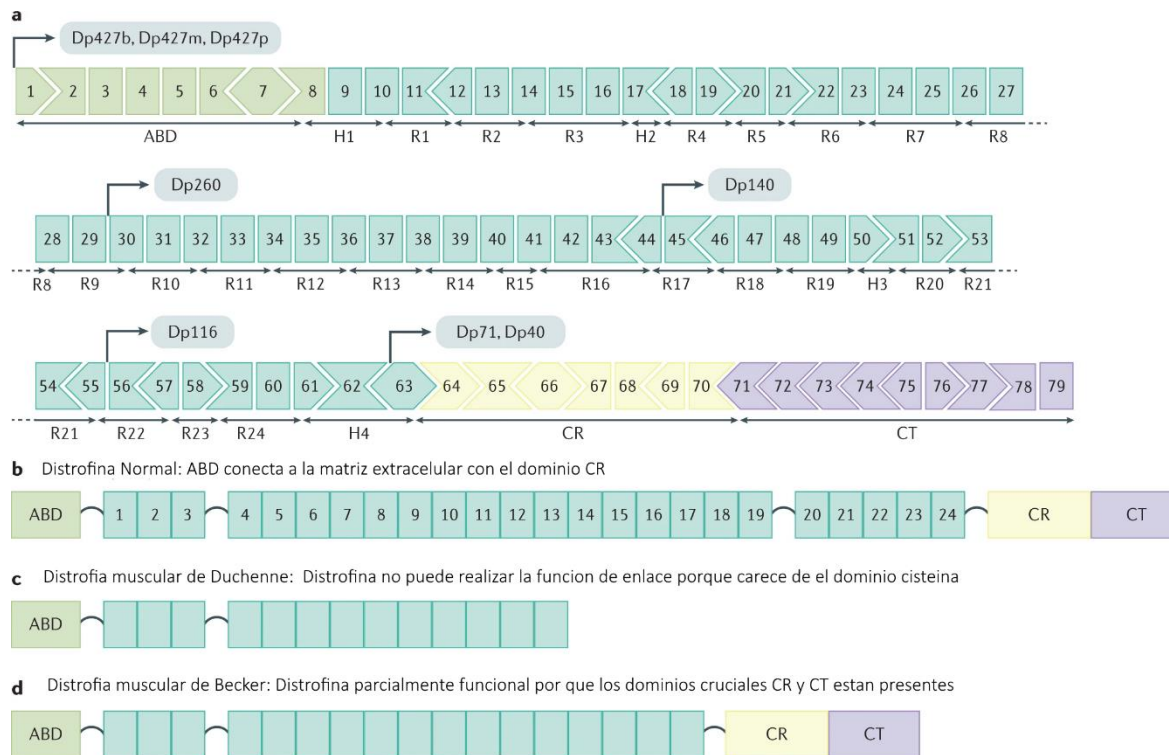
Abreviaturas: DMB= Distrofia Muscular de Becker; DMD= Distrofia Muscular de Duchenne.

## **Diagnóstico de las distrofias musculares.**

Las distrofias musculares se diagnostican basándose en las características clínicas pues los pacientes presentan debilidad muscular en los primeros años de vida ([Butterfield, 2019](#)) apoyándose en la histopatología, PCR múltiple, MLPA (amplificación de sonda dependiente de ligadura) y NGS (secuenciación de nueva generación) utilizadas como técnicas estándar para el diagnóstico de DMD/ DMB ([Sun, Shen, Zhang, & Xie, 2020](#)); además con esta última se puede realizar un diagnóstico genético para determinar la variabilidad genética([Butterfield, 2019](#)).

## **Distrofia muscular de Duchenne**

La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es causada por una mutación en el gen DMD el cual es el gen humano más grande conocido contiene 79 exones que abarcan 2.4 Mb ([Duan, Goemans, Takeda, Mercuri, & Aartsma-Rus, 2021](#)), localizado en el brazo corto del cromosoma X (*Xp21.2*) por lo que sólo se presenta en el sexo masculino ([Stedman et al., 1991](#)), codifica para la proteína Distrofina que tiene una longitud de 427 kDa, proteína que une al citoesqueleto con la matriz extracelular y la F-actina (ilustración 1) ([Duan et al., 2021](#)).



**Ilustración 1. a)** La distrofina está compuesta por 8 promotores, se puede dividir en 4 dominios, el dominio de unión a la F-actina N terminal; dominio ABD (codificado por los exones 1-8), dominio varilla (R; codificado por los exones 8-64) este dominio se divide en 24 repeticiones de espectrina, dominio rico en cisteína (CR; codificado por los exones 64-70) y dominio C-terminal (CT; codificado por los exones 71-79) **b)** Proteína distrofina normal **c)** Proteína distrofina durante la DMD carente de los dominios cruciales CR y CT **d)** Proteína distrofina durante la DMB. Modificado de (Duan et al., 2021)

La DMD es causada por mutaciones en el marco de lectura (aproximadamente el 60-70% de las mutaciones en pacientes con DMD son deleciones, el 5-15% son duplicaciones y el 20% son mutaciones puntuales, pequeñas deleciones o inserciones) generando una distrofina no funcional (Duan et al., 2021), o la pérdida de la proteína distrofina lo que conduce a daño recurrente de las miofibras,

inflamación crónica, fibrosis progresiva y disfunción de las células madre musculares (Sun et al., 2020).

La mutación afecta a músculos lisos y estriados perjudicando su función (Aartsma-Rus, Ginjaar, & Bushby, 2016; Bernabe-García et al., 2019; Maggio, Chen, & Gonçalves, 2016; Reynolds & Broussolle, 2018). Esta distrofia tiene una incidencia de 1 en cada 5000 nacimientos en varones y se caracteriza por la ausencia de distrofina.(Carmen et al., 2019; Sun et al., 2020).

La distrofina ayuda a las células musculares a mantener su forma y fuerza; sin ella, los músculos van degenerando y la persona se va debilitando gradualmente. La debilidad muscular progresiva suele manifestarse entre los dos y seis años (Carmen et al., 2019; Nakamura & Takeda, 2011). Por ello, los pacientes pediátricos con distrofia aprenden a caminar más tarde que el promedio y, se vuelven incapaces de caminar, en promedio, a los 9 años. En consecuencia, llegan a requerir del uso de una silla de ruedas a tiempo completo, desarrollan escoliosis (curvatura anómala de la columna vertebral), contracturas en las articulaciones e insuficiencia respiratoria pues, con el tiempo, los músculos que controlan la respiración pueden afectarse, llegando a necesitar un respirador artificial y, es frecuentemente la causa principal de muerte. También, debido a esto, disminuye su función pulmonar, presentando microatelectasia (dificultad para respirar debido al colapso del tejido pulmonar y pérdida de volumen), deformación torácica y disminución de distensión alveolar con hipoventilación (Carmen et al., 2019; Gochicoa-Rangel et al., 2016; Guglieri et al., 2017).

El corazón también puede verse afectado, los varones desarrollan miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca en la adolescencia o en la edad adulta temprana y

puede empeorar rápidamente ([Lopez, Kolster, Zhang, & Adams, 2017](#)). Generalmente los individuos con DMD, alcanzan una vida media de 19 a 20 años sin intervención médica, aunque recientemente se ha informado de casos de hasta 30 o 40 años; esto, debido a tratamiento con corticosteroides, soporte cardíaco y respiratorio y cirugía de columna ([Guglieri et al., 2017](#)).

Los pacientes con DMD presentan un riesgo alto de desarrollar hiperinsulinemia, resistencia a la Insulina (IR) y también hiperleptinemia en (48.5%) esta frecuencia incrementa cuando existe obesidad o sobrepeso hasta (80%), lo que puede dirigir a desarrollar morbilidades severas como aterosclerosis, enfermedad cardiovascular y diabetes tipo 2 ([Rodríguez-Cruz et al., 2019](#)).

### **Distrofia Muscular de Becker**

La distrofia muscular de Becker (DMB), es una miopatía genética con herencia ligada al sexo al igual que la DMD afecta al sexo masculino ([Lanza et al., 2020](#); [Thada, Bhandari, & Umapathi, 2020](#)) por otro lado Duan y colaboradores reportan que hasta el 13,3% de las mujeres portadoras de DMB presentan síntomas musculoesqueléticos y miocardiopatía dilatada, pero no suelen presentarse defectos respiratorios pero tienen una esperanza de vida normal ([Duan et al., 2021](#)).

La DMB se caracteriza por la degeneración progresiva y necrosis del tejido muscular el cual es remplazado por células fibroadiposas, ocurre durante la infancia y puede presentarse de distintas formas. En los niños, la primer característica es caminar de puntitas, a medida que la condición progresa se dirige a un daño muscular con dificultades funcionales (subir escaleras, o levantarse de una silla) también se presenta pseudohipertrofia muscular que afecta músculos de la pantorrilla y atrofia en músculos como los cuádriceps, también puede haber

contracturas articulares como la del tendón de Aquiles aunque la enfermedad es lentamente progresiva (Lanza et al., 2020).

Muchos de los afectados por DMB pueden llevar vidas activas sin tener que usar nunca una silla de ruedas, la esperanza de vida varía en función de la gravedad de los problemas respiratorios (debido a debilidad de los intercostales y músculos del diafragma) o cardíacos que presente (Thada et al., 2020).

Tiene una incidencia de 1 de cada 18.000 varones vivos, la edad de aparición es de 10 a 20 años (LaPelusa & Kentris, 2020) Es heredada de manera recesiva dada por una mutación ligada al ChrX localizado en p21.2 (Thada et al., 2020).

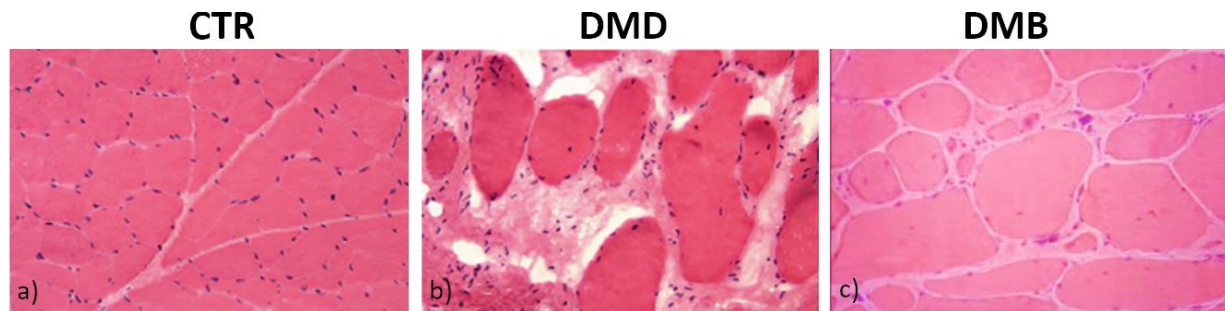
En esta patología, la mutación en el gen *DMD* da como resultado una proteína distrofina acortada y parcialmente funcional (60-70% de las mutaciones son deleciones, 20% son duplicaciones y 5-10% son mutaciones puntuales, pequeñas deleciones o inserciones), es debido a esto que, en la DMB se presenta una distrofinopatía leve con inicio tardío y progresión lenta ya que la distrofina es de tamaño menor una distrofina de normal (Asher et al., 2020; Duan et al., 2021).

### **Comparación histológica DMD y DMB**

Como se mencionó anteriormente, la histología se utiliza como un apoyo al diagnóstico de la patología DMD y DMB esta prueba utiliza como fundamento el análisis de la tinción de tejido con hematoxilina eosina el cual permitirá analizar la arquitectura y la estructura del tejido.

La tinción con hematoxilina y eosina (HE) muestra, en el panel **a)** Tinción de músculo sano (CTR) en tono morado podemos observar a las CS, mientras que en el panel **b)** tejido de biopsia DMD se muestra la presencia de miofibras nucleadas,

infiltración de células inflamatorias, tamaño variable de miofibras y depósito de tejido conjuntivo endomisio y perimisio, además en el panel **c)** tejido de biopsia DMB se muestra variabilidad marcada, en color blanco se observa la fibra muscular y se observa menor cantidad de fibrosis comparada con DMD.

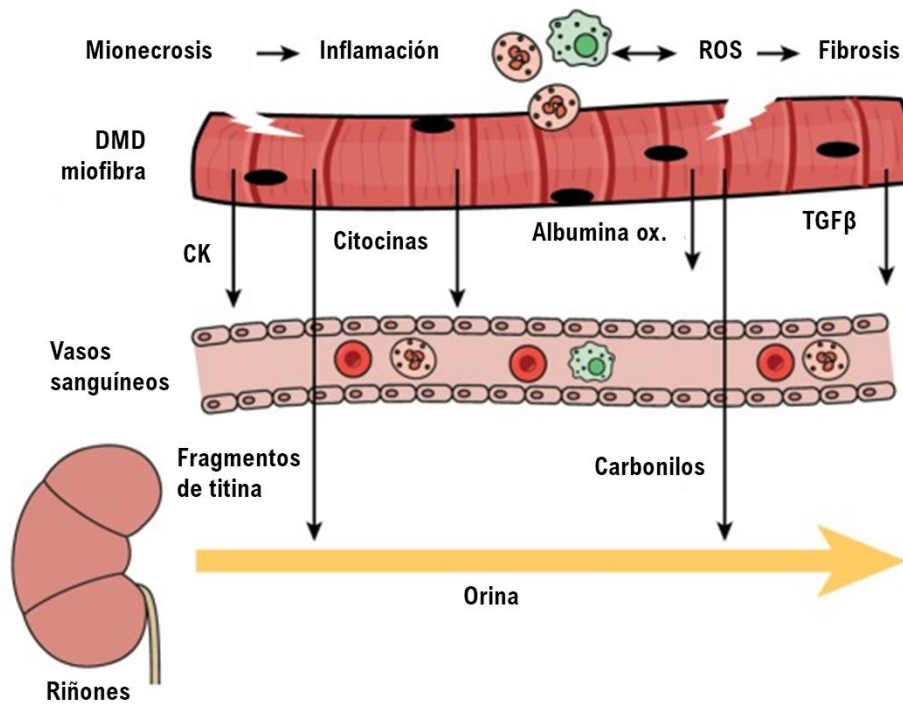


*Figura 1. Micrografía Hematoxilina-Eosina corte transversal de biopsias de musculo sano y pacientes con Distrofia muscular de Duchenne (DMD) y Distrofia muscular de Becker (DMB) (Comi et al., 2022; Duan et al., 2021).*






### **Marcadores de daño muscular**

Los marcadores clínicos y bioquímicos se utilizan para medir el grado del daño muscular, los marcadores pueden detectarse en musculo (Myomirs), sangre (enzimas y proteínas de musculo) u orina (proteínas citoesqueléticas y metabolitos) (Ilustración 2) (Grounds et al., 2020).

Las proteínas musculares, detectadas en niveles elevados, utilizadas como marcadores de daño en sangre son la creatina quinasa (CK) la mioglobina (Mb). La CK es una enzima expresada en músculo y cataliza la conversión de creatina en fosfocreatina y adenosina difosfato; la Mb es una proteína fijadora de hierro y oxígeno que se encuentra en las miofibras; particularmente abundante en músculos que obtienen energía mediante fosforilación oxidativa (Fukada, Akimoto, & Sotiropoulos, 2020).



**Clave**

	<b>Miofibra</b>		<b>Núcleo</b>		<b>Glóbulo rojo</b>		<b>Neutrófilo</b>
	<b>Macrófago</b>						

*Ilustración 2.* Diagrama representativo de los marcadores de daño muscular presentes en sangre y orina, cuando la fibra muscular sufre daño por ROS o fibrosis varias proteínas, enzimas y citocinas son liberadas al torrente sanguíneo o a la orina como consecuencia de la destrucción muscular. Modificado de (Grounds et al., 2020).

### Regeneración muscular: células satélite y mioblastos

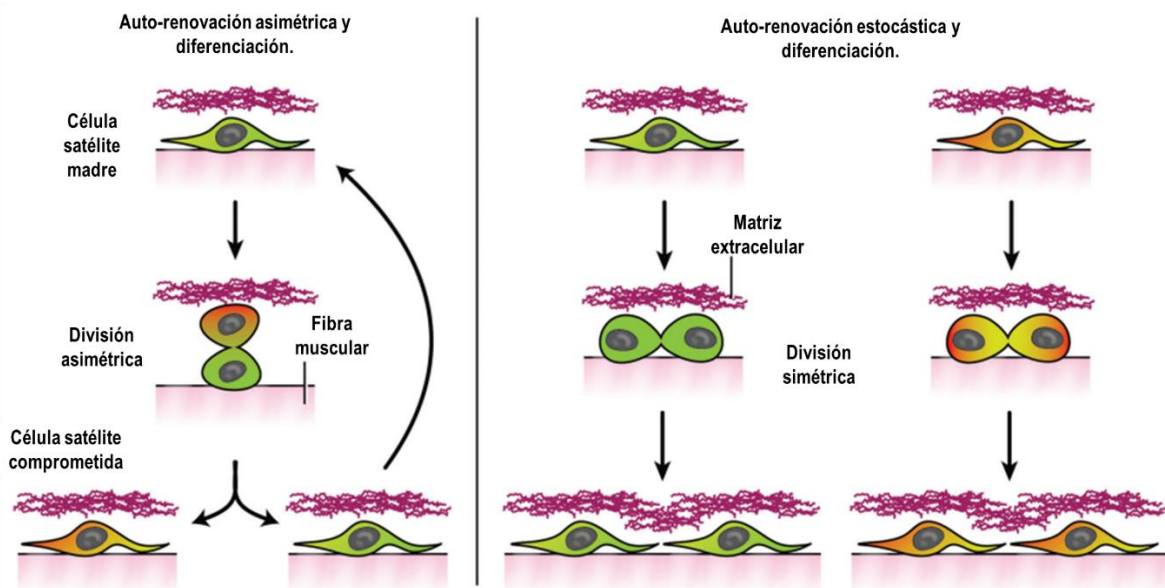
La miogénesis es el proceso de formación de tejido muscular a partir de células precursoras llamadas células progenitoras miogénicas (MPC), estas células también producen una subpoblación de células madre musculares llamadas células satélite (CS) que residen entre el sarcolema y la lámina basal de la fibra muscular



y contribuyen a la regeneración después de daño (Das, Das, Das, Abdelmohsen, & Panda, 2020; Karthik & Taneja, 2021). La miogénesis se divide en tres fases: embrionaria, perinatal y regenerativa (Hrach & Mangone, 2019). Durante la fase de desarrollo embrionario o embriogénesis, el músculo esquelético se origina de las MPC (Karthik & Taneja, 2021), células derivadas del mesodermo paraxial situado a ambos lados del tubo neural y la notocorda (Shi & Grifone, 2021), que expresan factores de transcripción PAX3, PAX7, que se comprometen diferenciarse en mioblastos cuando expresan factores reguladores miogénicos (MRF) como MyoD, Myf5, miogenina y MRF4 produciendo los cuales se diferencian a miotubos multinucleados (Karthik & Taneja, 2021). Mientras que la miogénesis regenerativa ocurre en respuesta al daño muscular (Hrach & Mangone, 2019). Se sabe que el músculo esquelético tiene una capacidad excepcional para recuperarse de un daño, al reemplazar las fibras musculares dañadas o destruidas mediante múltiples ciclos de regeneración sin ninguna pérdida de funcionalidad o consecuencias importantes en el tejido o arquitectura, por la contribución en gran medida de las CS (E. W. Li, McKee-Muir, & Gilbert, 2018; Mashinchian, Pisconti, Le Moal, & Bentzinger, 2018).

A partir de las observaciones de Alexander Mauro, en la década de los 60, fue posible identificar un grupo de células madre residentes en el músculo esquelético llamadas Células Satélite (Lepper, Conway, & Fan, 2009). Las CS tienen mecanismos de autorrenovación entre los cuales se incluyen la división asimétrica: proceso mediante el cual se obtiene una CS comprometida a diferenciación y una CS madre, y por su parte la división simétrica y obtenemos solo un tipo celular definido ya sean dos células satélite madre o dos células satélite comprometidas

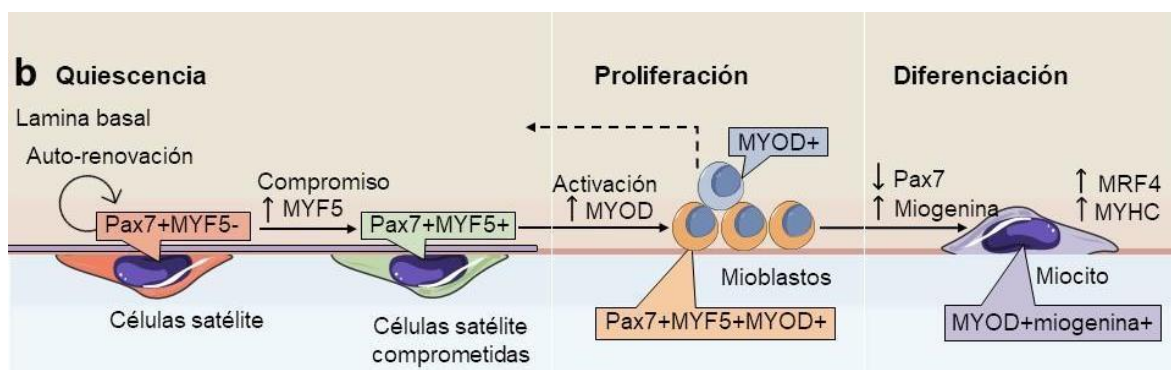
(Ilustración 3) (Dumont, Bentzinger, Sincennes, & Rudnicki, 2015). Las CS se originan de somitas embrionarias en reposo, que expresan PAX7+ (Lepper et al., 2009; Seale et al., 2000), esfingomiolina+ (Nagata, Partridge, Matsuda, & Zammit, 2006) y Nestina+ (Day, Shefer, Richardson, Enikolopov, & Yablonka-Reuveni, 2007).



*Ilustración 3.* Representación de dos tipos de autorrenovación de CS utilizado para conservar CS de reserva en el sarcoplasma. Las CS se dividen dos subpoblaciones las **CS madre** y las **CS comprometidas**. Las CS madre realizan división asimétrica en orientación basal de la cual se obtiene una CS comprometida y una CS madre original. Mientras que durante la división estocástica o simétrica dependiendo del tipo celular diferenciado se producirán dos células iguales (Dumont et al., 2015).

Las CS quiescentes se encuentran sin actividad debido a la expresión de *PAX3*, cuando las CS comienzan a expresar *PAX7*, *MYF5* se consideran activas y listas para proliferar, mientras que si las CS se comprometen a diferenciarse, expresarán *MYOD* (Klimczak, Kozłowska, & Kurpisz, 2018; E. W. Li et al., 2018). En respuesta

al estímulo de daño, se activan, proliferan y diferencian en mioblastos, para fusionarse con las miofibrillas ya existentes. Dependiendo del grado de estímulo, la activación induce cambios adaptativos en el músculo esquelético como hipertrofia, alteración de los tipos de fibras y regeneración (Yamane, Akutsu, Diekwisch, & Matsuda, 2005). Después de la activación, las CS que co-expresan *PAX7+/MYOD+*, se diferencian en mioblastos que, a causa de *PAX7* expresan *MYOD+/MIOGENINA+* lo que provoca finalizar su diferenciación en fibra muscular. Por otro lado, la población de células satélite *PAX7+/MYOD-* retorna a un estado quiescente (Figura 1) (Halevy et al., 2004; Zammit et al., 2004). Debido a su capacidad para generar y/o regenerar el músculo esquelético, las CS se consideran un candidato ideal para la terapia celular y génica de distrofias musculares. No obstante, en enfermedades como DMD/DMB se desconoce si el número de CS se encuentra reducido o poco activo o la capacidad de daño supera la regeneración (Feige, Brun, Ritso, & Rudnicki, 2018). Sin embargo, aún no ha habido éxito debido a que se conoce poco sobre los mecanismos que controlan su activación.



*Ilustración 4.* Destino de las células satélite en la regeneración. En reposo, las células satélite son una población heterogénea que reside entre la lámina basal y el sarcolema de las fibras de acogida; ~ 90% son células satélite (*PAX7+/MYF5+*), mientras que ~10% son células madre satélite (*PAX7+/MYF5-*). Después de la

activación, las células satélite comprometidas se diferencian a mioblastos (*PAX7+/MYF5+/MYOD+*), y, finalmente a miotubo (*PAX7-/MYF5+/MYOD+*). Aquellas células satélite que no expresan *MYOD* retornan a un estado basal. Modificado de ([Wang & Rudnicki, 2012](#)).

### **MiRNAs durante la miogénesis**

Además de la regulación a nivel de proteínas, cada vez es más evidente la participación de los miRNAs en la regulación post-transcripcional de la expresión génica. Los miRNAs son una clase de RNA cortos no codificantes que funcionan después de la transcripción para regular la expresión génica específica, mediante la unión específica. Los genes de miRNA se ubican en grupos, se transcriben con promotores únicos o se encuentran en regiones intrónicas de genes que codifican proteínas. Una vez transcritas y maduras, se unen al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) de manera complementaria a las regiones 3' no traducida (3'UTRs) de los mRNA, reprimiendo la traducción o degradando el RNAm ([Hrach & Mangone, 2019](#)).

### **Antecedentes**

Pese a que muchos miRNAs se expresan en numerosos linajes o tejidos, algunos son específicos de linaje ([Chen et al., 2010](#)). Este es el caso de los myomiRs "musculares específicos", que incluyen el miRNA-1 (miR-1), su variante miR-206, junto con miR-133 y miR-208, han demostrado ser importantes para la diferenciación de mioblastos normales, la proliferación y remodelación muscular en respuesta al estrés. También han sido implicados en enfermedades musculares esqueléticas y cardíacas ([Chen et al., 2010](#)) miR-1 y miR-206 promueven miogénesis, debido a que la mayoría de sus blancos son genes represores de la

diferenciación muscular; por su parte miR-133, al inhibir la miogénesis del mioblasto, favorece su proliferación (Chen et al., 2010). Mientras que miR-206 y miR-486 inducen la diferenciación de mioblastos río abajo de la expresión de *PAX7* (Dey Bijan, Gagan, & Dutta, 2011). Pero también se ha reportado que en mioblastos C2C12 (línea celular de mioblastos de ratón) la represión de miR-206, miR-1a-1 y miR-1a no impide la diferenciación, pero en ausencia de miR-133 la diferenciación se ve afectada (las represiones de los miRNAs se pueden llevar a cabo mediante transfección). En un ratón knockout (KO) (modelo en el que se realiza un silenciamiento específico para estos tres miR- no se ve afectada la diferenciación in vivo, sin embargo, cuando se realiza un ratón KO de miR-206 no resulta en un fenotipo letal, estos ratones experimentan anomalías incluidas la disminución de la diferenciación de células satélite en desarrollo del músculo en regeneración, aumentando la progresión de la enfermedad (Boettger, Wust, Nolte, & Braun, 2014; Przanowska et al., 2020; Salant, Tat, Goodrich, & Kugel, 2020). Por otra parte, (Gagan, Dey, Layer, Yan, & Dutta, 2011) identificaron que existe regulación directa durante la diferenciación de mioblastos a través de *MYOD* y miR-378. Por otro lado, miR-27 está implicado en la inducción de la diferenciación del músculo al reprimir la expresión de *PAX3* (Crist et al., 2009).

El crecimiento postnatal y la regeneración del músculo esquelético dependen principalmente de progenitores musculares, llamadas células satélites. Algunas de estas células satélite son capaces tanto de favorecer la proliferación como la autorrenovación y diferenciación a lo largo del linaje de los músculos esqueléticos (Kuang, Gillespie, & Rudnicki, 2008) y son reguladas por miR-15, miR-503, miR-23 y miR-106 (Lozano-Velasco et al., 2015).

Un estudio reciente realizado en un modelo murino de lesión del músculo esquelético reveló que la administración de una mezcla de algunos de los myomiR maduros (miR-1, miR-133 y miR-206) pudo acelerar la regeneración del músculo, prevenir la fibrosis en el sitio de la lesión y aumentar la expresión de marcadores clásicos de miogénesis regenerativa, incluidos *MYOD* y *PAX7* (Hrach & Mangone, 2019).

## Justificación

Las distrofinopatías de Duchenne y Becker son las formas más comunes de distrofia muscular hereditaria. Su prevalencia se estima en 1 de cada 5000 varones nacidos vivos; mientras que las mujeres heterocigotas que presentan debilidad muscular oscilan entre el 2.5% y el 17% de la población ([Carmen et al., 2019](#)). En México, la frecuencia y la distribución de deleciones intragénicas parciales en el gen de DMD (52-67.5%), se ha reportado que en el 10% de los pacientes con DMD/DMB que presentan duplicaciones intragénicas parciales, el 10.5% de los casos presenta una variación de un solo nucleótido sin sentido; en donde el genotipo responsable no fue identificado en un 30%, es por esto que el espectro mutaciones completo de DMD/DMB sigue siendo desconocido en la población mexicana ([Alcántara-Ortigoza et al., 2019](#); [Lopez et al., 2017](#)).

A pesar de los avances médicos, los tratamientos clínicos son insatisfactorios pues actualmente no existe cura para la Distrofia y los usos clínicos están muy limitados, (Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE inhibidor)) bloqueadores de  $Ca^{+2}$ , glucósidos cardíacos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, inhibidores de la fosfodiesterasa, donantes de óxido nítrico) pues demuestran eficacia cuestionable ([Lopez et al., 2017](#)) También se han utilizado tratamientos de base genética como (transferencia de genes, omisión de exón, oligonucleótidos antisentido); sin embargo, los corticosteroides representan la terapia estándar de oro para esta enfermedad ([Lopez et al., 2017](#)).

La terapia celular dirigida empleando miRNAs, podría ser una herramienta para mejorar la calidad de vida del paciente con distrofia ([Hrach & Mangone, 2019](#)). Se sabe que hay RNA no codificante (nc-RNA) no expresados diferencialmente en

DMD/ DMB que son llamados myomiRs (miR-1, miR-133, y miR-206) reportados al alza en pacientes con DMD y en modelos de distróficos. Estos myomiRs se han utilizado como biomarcadores pues participan en la restauración de la distrofina (Brusa, Magri, Bresolin, Comi, & Corti, 2020).

Tabla 2. miRNAs en distrofias musculares

miRNAs	Función	Referencia
miR-146b-5p, miR-382, miR-410, miR-758, miR-214, miR-494, miR-223, miR-146a, miR-195, miR-374a, miR-103, miR-320a, let-7d, let-7a), además la expresión de miR-31	miRNAs con baja expresión en DMB	(Brusa et al., 2020)
miR-21, miR-34a, miR-130a, miR-146b, miR-148, miR-154, miR-155, miR-199a, miR-199b, miR-210, miR-214, miR-221, miR-222, miR-299, miR-335, miR-368, miR-376a, miR-379, miR-381, miR-432, miR-452, miR-487b, miR-495, miR-2537, miR-4983, miR-13145, y miR-13258	miRNAs con alta expresión en DMD	(Perry & Muntoni, 2016)
miR-146b, miR-31, miR-374, miR-146a, miR-223, miR-320a, miR-382	miRNAs que reprimen la expresión de la distrofina en DMB	(Brusa et al., 2020; Perry & Muntoni, 2016)
miR-195, miR-758	miRNAs que promueven la expresión de la distrofina en DMB.	(Brusa et al., 2020)

Abreviaturas: DMB= Distrofia Muscular de Becker; DMD= Distrofia Muscular de Duchenne.

Sin embargo, a pesar de la creciente información y caracterización de varias familias de miRNAs como reguladores esenciales en el control del desarrollo del músculo esquelético (Hrach & Mangone, 2019; Szgyarto & Spitali, 2018) los miRNAs reportados como reguladores de la CS durante las distrofias son miR-3,



miR-1 y miR-206, miR-27b, miR-133, miR-146a ([Brusa et al., 2020](#)). Por esta razón, el presente trabajo pretende centrar las bases al correlacionar el perfil de miRNAs de biopsias con distrofia Duchenne y Becker con la capacidad de regeneración de sus células Satélite.

## **Pregunta de investigación**

¿Cuáles myomiRs se asocian con la capacidad de regeneración de las Células Satélite en las distrofias musculares Duchenne y Becker?

## **Hipótesis**

La diferenciación de las Células Satélite en las distrofias musculares Duchenne y Becker se asocia a miRNAs específicos de músculo o myomiRs, por lo que, si se estudia su perfil de expresión, se entenderá cómo modulan su capacidad de regeneración.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Determinar el perfil de expresión de miRNAs y correlacionar con la capacidad de regeneración de las células satélite durante las distrofias musculares Duchenne y Becker.

### **Objetivos Particulares**

1. Establecer el fenotipo de las células satélite en biopsias de pacientes con DMD y DMB por Inmunohistoquímica de *PAX7*, *PAX3*,
2. Analizar el perfil de miRNAs en biopsias de pacientes con DMD y DMB.
3. Determinar *in silico* los miRNAs potencialmente implicados en la reparación del daño.

## **Materiales y métodos**

### **Grupos de Estudio y criterios de inclusión/exclusión**

Se estudiaron las biopsias de músculo incluidas en parafina de una cohorte de infantes que se recopiló entre los años 2003 y 2013, diagnosticados por el Departamento de Patología del Hospital Infantil de México Federico Gómez como DMD (quince casos) y DMB (quince casos), los criterios de inclusión fueron: características morfológicas de tejido anormal, inmunohistoquímica para distrofina ausente o carente, con un rango de edad entre tres meses hasta dieciséis años. Adicionalmente, como grupo control se emplearon biopsias del mismo rango de edad, pero sin alteración fisiológica (cinco controles). Se incluyeron muestras de tejido utilizadas en otros estudios en donde ya se cuenta con el consentimiento informado firmado y que, durante la evaluación al microscopio, reportaron tejido con morfología dentro de los parámetros. Se excluyeron las muestras que no cumplen con las características aceptables.

### **Histología**

Las biopsias, se fijaron previamente en formalina al 3.5%, se incluyeron en parafina en el departamento de Patología, y se les realizaron cortes de entre 6 y 8  $\mu\text{m}$  de espesor empleando un microtomo y se montaron en laminillas. Posteriormente las laminillas se desparafinaron por una hora en un horno para histología a 60 °C y se rehidrataron con una serie gradual de etanol (de absoluto a etanol 30%), se lavaron en agua destilada y fueron teñidas con Hematoxilina y Eosina (H-E). Con el fin de realizar el análisis histológico entre los grupos DMD y DMB se tomaron micrografías a 40X de cada grupo mediante microscopía de campo claro con el microscopio óptico.

## **Inmunohistoquímica indirecta**

Para analizar el fenotipo de las células satélite en cada grupo se utilizó inmunocolocalización de los anticuerpos *PAX7* ((*PAX7*): sc-81648 ratón monoclonal, TEXAS EU **SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC**) y *PAX3* ((*C-20*): sc-34916 cabra policlonal, TEXAS EU **SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC**), distrofina (conejo policlonal REINO UNIDO **ABCAM**) para corroborar daño, y PCNA (DakoCytomation) antígeno nuclear de proliferación. Las laminillas con muestra fueron tratadas con solución de citratos a presión (15lbs/pulg.<sup>2</sup>) para liberar al antígeno, posteriormente se realizaron lavados con PBS-Tween 20, se incubó de 5 a 10 minutos con solución bloqueadora de proteínas (Biogenex, USA), una vez que se decantó el bloqueador, se aplicó el primer anticuerpo toda la noche. El anticuerpo secundario está acoplado al fluoróforo Alexa 488 o 594 (Invitrogen, Life Technologies, USA). Finalmente, los núcleos fueron contrastados con DraQ7 (Cell signaling Technology ®, Danvers, Massachusetts, U.S). Las laminillas tratadas se observaron en un microscopio confocal Carl Zeiss LSM-510 programa Zen 2009 (Zeiss, Alemania). Cada micrografía se capturó a 40X. Las micrografías de cada subgrupo fueron evaluadas con el programa ImageJ ([Schneider et al., 2012](#)). Se realizó el conteo celular para poder determinar el índice de expresión y su correlación con PCNA (PCNA/*PAX7*, PCNA/*PAX3*) de manera cuantitativa.

## **Estudio de microarreglos.**

Extracción de RNA total y síntesis de cDNA. El RNA total se obtuvo a partir de biopsias embebidas en parafina: Se realizaron cortes de 8µm de cada una de las muestras, después estos fueron desparafinados a 55°C por 15 min. Posteriormente se les realizaron 2 lavados con xilol y 2 lavados con etanol absoluto. La digestión

del tejido se realizó con 150µL de proteinasa K (500µg/mL). El RNA se extrajo con Trizol (Life Technologies), siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración y pureza se determinó por espectrofotometría a 260/280nm de absorbancia utilizando el Thermo Scientific™ NanoDrop Lite.

### **Marcaje y purificación de sondas de RNA.**

Se emplearon 250 ng del RNA purificado en cada uno de los 5 casos por grupo (DMD y DMB) y 2 casos para el CTR. Las muestras fueron liofilizadas y posteriormente marcadas usando el kit miRCURY LNA™ miRNA Hy3/Hy5 Power labeling (EXIQON), obteniendo 12.5 µL de RNA marcado. Una vez marcados los RNAs se purificaron mediante el uso del Kit QIAquick® Nucleotide Removal (Qiagen).

Se emplearon 250 ng del RNA de cada uno de los 5 casos por grupo (DMD y DMB) y 2 casos para el CTR. Los RNAs fueron purificados mediante el uso del Kit QIAquick® Nucleotide Removal (Qiagen). Las muestras fueron liofilizadas y posteriormente marcadas usando el kit miRCURY LNA™ miRNA Hy3/Hy5 Power labeling (EXIQON), obteniendo 12.5 µL de RNA marcado. Una vez marcados los RNAs se les adiciona 12.5 µL de agua libre de nucleasas obteniendo un volumen total de 25 µL (necesario para poder iniciar con la hibridación de los arreglos).

### **Matrices de miRNAs.**

La hibridación del microarreglo se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Basados en el protocolo para hibridación de microarreglos impresos en Superepóxico-Arrayit por Ramírez Salcedo et al. 2003. Un total de 2306 miRNAs fueron analizados. La hibridación del arreglo se llevó a

cabo con una mezcla de hibridación (6.25 µl de SSC 5X, 2.5 µl de SDS 0.1%, 16.25 µl TE) en un volumen final de 25 µl que contenía una concentración final de 250 ng de RNA, el cual fue aplicado al microarreglo cubriendo la superficie de este con un cubreobjetos y se incubó 10 h en un baño de agua 42°C. Por último, se secó la laminilla a 1500 rpm durante 2 min, para su posterior lectura en escáner.

### **Normalización de arreglo de expresión para miRNAs.**

Para cada caso se realizó una normalización tipo Loess a 100U, se consideró una señal positiva aquella cuyo promedio fue mayor a 250 U, es decir 2.5 veces el valor promedio de todo el experimento. La construcción de mapa de calor se realizó a partir de los datos del microarreglo empleando el software Multi Experiment Viewer versión 4.9.8 y los paquetes incluidos en el programa R, manejados con RStudio. Se realizó una comparación entre los grupos y este fue esquematizado mediante un diagrama de Venn.

### **Análisis in silico.**

Utilizando las bases de datos TargetScan, miRDB, miRBase MYO-REG, DIANA, TransmiR v2.0, se determinaron los blancos putativos de los miRNAs expresados al alza determinados en el Diagrama de Venn.

### **Análisis estadísticos.**

En las inmunohistoquímicas, se capturaron un total de 10 micrografías a 40X; en cada micrografía se cuantificó el total de núcleos por campo (TNC), el total de núcleos positivos a cada marcador y se determinó el total de núcleos que colocalizaron al segundo marcador. De los datos obtenidos se calculó el promedio y la desviación estándar. El promedio fue empleado para determinar el índice de

expresión relativo para cada factor y su correlación con los niveles de expresión de PCNA. Los datos obtenidos fueron representados en gráficas, comparando el grupo problema con el control.

Se calcularon los porcentajes de expresión de los marcadores *PAX7*, *PAX7/PCNA*, *PAX3* y *PAX3/PCNA*.

## Resultados

### Características generales de los casos.

A partir de los expedientes, se elaboró la tabla 3 de las características generales de los casos con DMD y la tabla 4 de las características generales de los casos con DMB, cabe destacar que son los casos incluidos en los arreglos de expresión. A partir de esos datos se calcularon promedio y desviación estándar.

En los casos con DMD (tabla 2) la edad promedio fue de 6.8 años, el rango de edad va de los 5 a los 8 años; la talla promedio se reportó en 115.5 cm y el peso promedio fue de 19.48 kg. Mientras que la edad promedio de los casos con DMB (tabla 3) fue de 10.6 años, el rango de edad va de los 6.5 a los 13.9 años. Por otro lado, la talla promedio se reportó en 130.4 cm y el peso promedio fue de 33.5 kg.

*Tabla 3. Características generales de los casos de distrofia muscular de Duchenne.*

Tipo de Distrofia	Edad (años)	Talla (cm)	Peso (kg)	Sexo
DMD_1	7	119	20.5	Masculino
DMD_2	7	119	21.7	Masculino
DMD_4	7	109	17.7	Masculino
DMD_9	5	104	14.5	Masculino
DMD_14	8	126.5	23	Masculino
Promedio	6.8	115.5	19.48	
DS	1.09544512	8.9442719	3.4032338	

Cálculo del promedio y desviación estándar de los casos con DMD



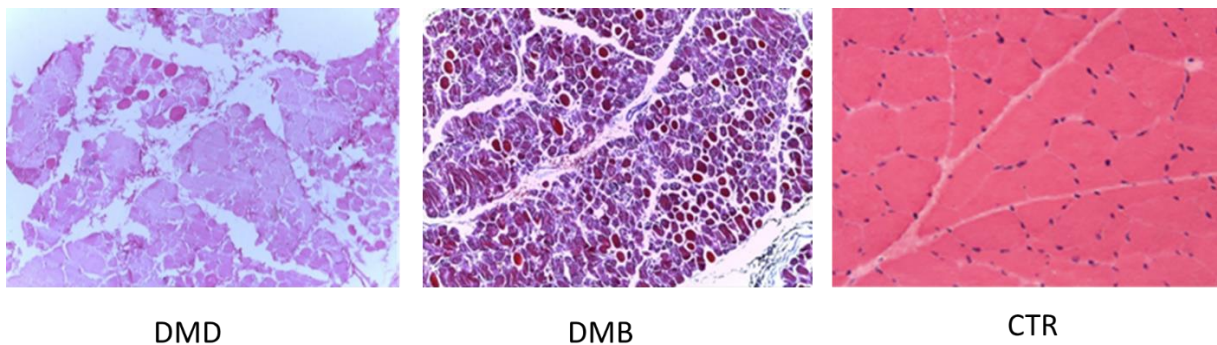
*Tabla 4. Características generales de los casos de distrofia muscular de Becker.*

<b>Tipo de Distrofia</b>	<b>Edad (años)</b>	<b>Talla (cm)</b>	<b>Peso (kg)</b>	<b>Sexo</b>
BMD_1	10	136	34.4	Masculino
BMD_4	11	136	50.3	Masculino
BMD_6	11.8	146	45.5	Masculino
BMD_7	13.9	132	23.5	Femenino
BMD_9	6.5	102	13.8	Femenino
Promedio	10.64	130.4	33.5	
DS	2.7226825	16.697305	15.12564	

Cálculo del promedio y desviación estándar de los casos con DMB

## Histología de pacientes con DMD y DMB

Se realizaron cortes histológicos para comparar el daño existente en el músculo esquelético entre los casos con DMD y DMB (figura 2) mediante la evaluación de la morfología del músculo. Dichos cortes demostraron que en ambos tipos de distrofia hay pérdida de la arquitectura del músculo esquelético. Por su parte en la distrofia muscular de Duchenne se observaron varios fascículos centrados con cambios y variación en las fibras. Además, detectaron fibras hipertróficas pequeñas y fibras grandes con incremento en la eosinofilia y núcleo central, y hay necrosis e infiltrado inflamatorio mientras que en la distrofia muscular de Becker se observó variación en el tamaño de las fibras y también se visualizaron fibras atróficas e hipertróficas y fragmentadas también hay fibrosis perimicial e intersticial, datos contrastantes a lo observado en los controles (CTR)



*Figura 2. Micrografía Hematoxilina-Eosina corte transversal Micrografías histológicas 40X de biopsias de pacientes con Distrofia muscular de Duchenne (DMD) y Distrofia muscular de Becker (DMB) y los controles sanos (CTR) (Duan et al., 2021).*

## Inmunohistoquímica de Distrofina en biopsias de pacientes

De manera adicional a los cortes histológicos utilizados para determinar la morfología de las biopsias se evaluó la presencia de distrofina en las biopsias de pacientes con DMD y DMB vs controles mediante la técnica de inmunohistoquímica

con los marcadores miogénicos *PAX7* y distrofina, mientras que los núcleos fueron marcados con DraQ7 (figura 3). Permittiéndonos observar la carencia de distrofina en las biopsias de los pacientes con DMD y DMB en contraste con los controles.

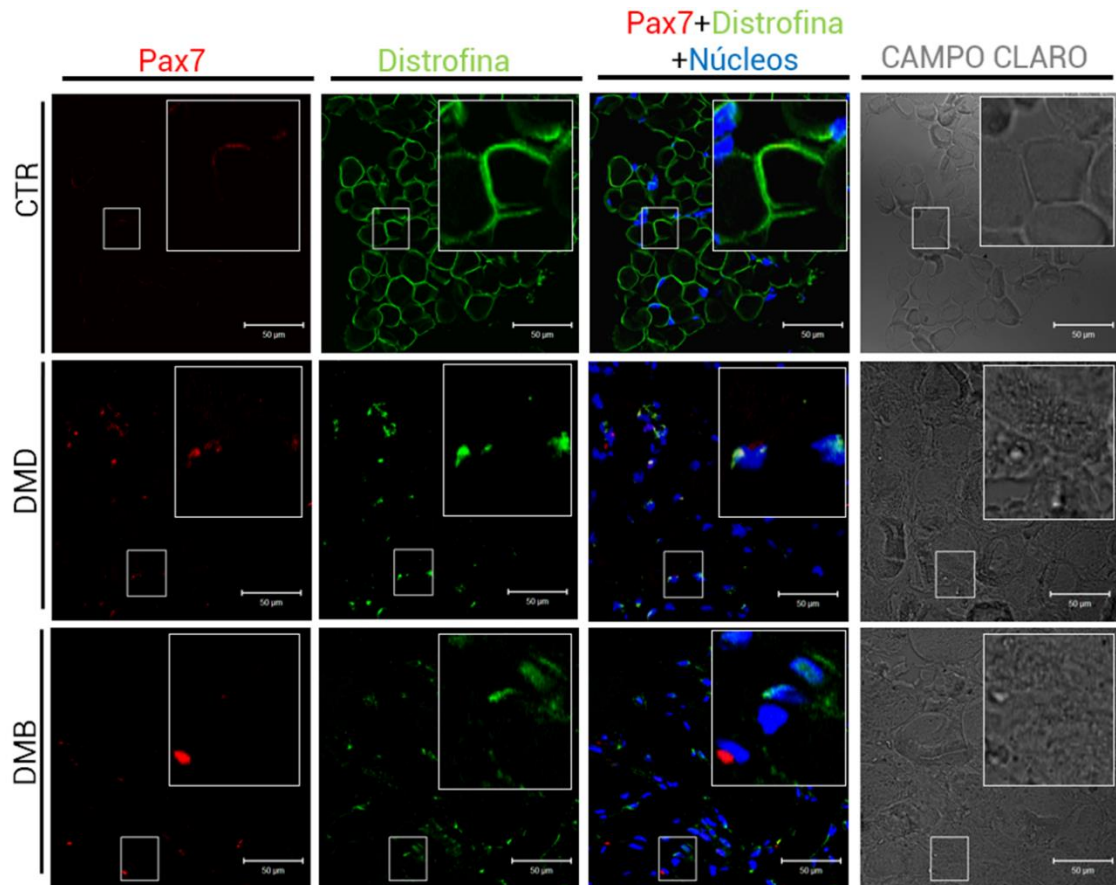


Figura 3. Inmunotinciones de células miogénicas las fotomicrográficas en las cuales se observa la carencia de proteína distrofina en las muestras de DMD y DMB. Tomadas a 40x, la barra representa 50 µm, mientras que el zoom fue tomado a 30 µm.

### Biopsias de pacientes con DMD y DMB

Para determinar el fenotipo de las CS en biopsias de pacientes con DMD y DMB se utilizaron marcadores de diferenciación como *PAX3* y *PAX7* (figura 4 y 6) y PCNA, cuya presencia informaría el estadio en el que se encuentran las células satélite durante la diferenciación estos resultados fueron comparados con controles sanos. Los núcleos fueron marcados con DraQ7.

Posteriormente se realizó un conteo de cada célula positiva a cada marcador *PAX3* y *PAX7* (figura 4 y figura 6 respectivamente) por inmunohistoquímica para determinar el fenotipo celular y su estado de proliferación a través de la expresión de PCNA. Con dicho análisis encontramos a *PAX3* sobrepresado en DMD vs DMB además cuando se evalúa *PAX3/PCNA* se percibe mayores niveles de proliferación en DMD y DMB (Figura 5). Mientras que *PAX7* se encontró en aumento en DMB comparado con el control por su parte DMD no muestra diferencia observable vs control, cuando se realizó el análisis de *PAX7/PCNA* se percibió que la proliferación es mayor en la DMD y DMB vs control (figura 7).

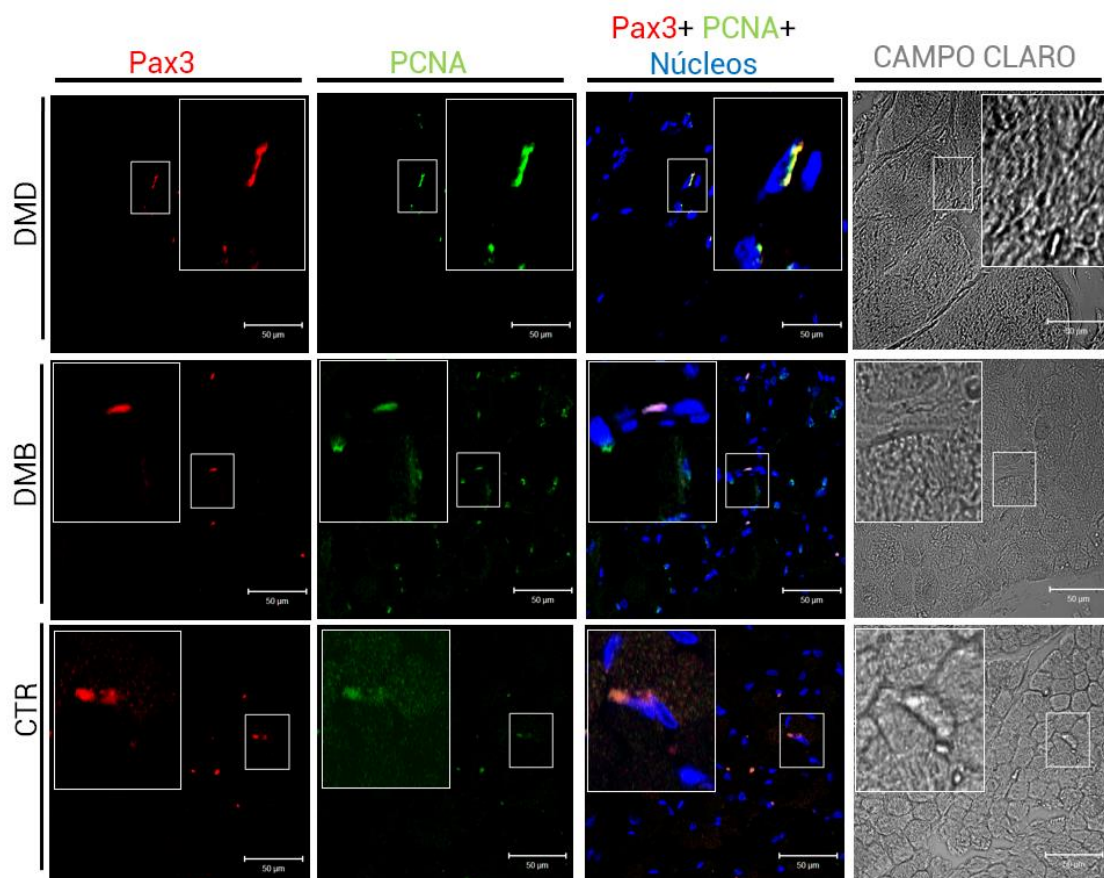
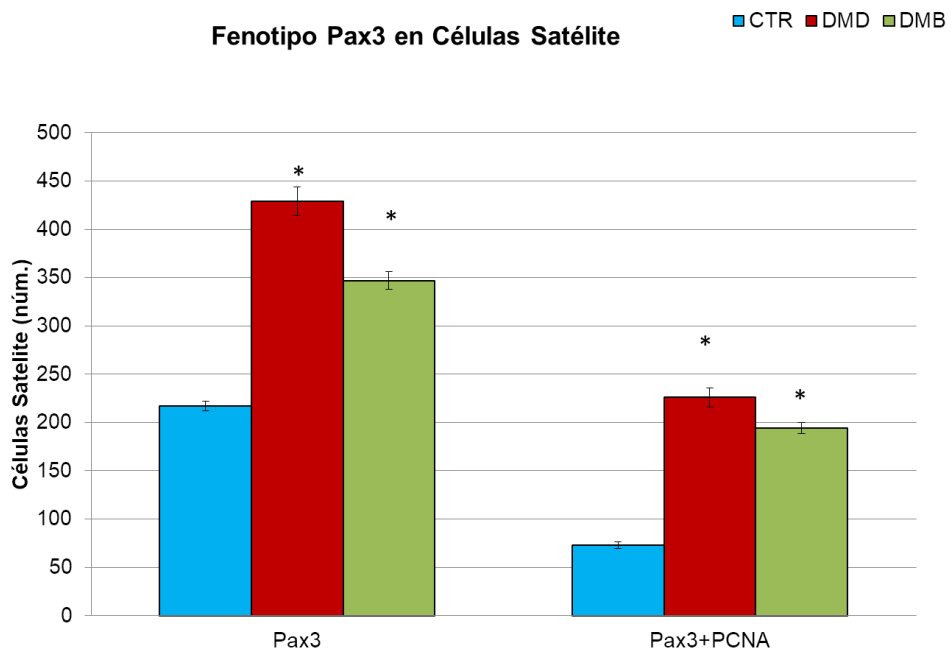


Figura 4. Fotomicrografías muestran la colocalización de *PAX3* y *PCNA* en tejido distrófico vs CTR. Tomadas a 40x, la barra representa 50 µm, mientras que el aumento fue tomado a 35 µm.



*Figura 5. Gráficas post conteo de PAX3, PAX3+PCNA utilizado para evaluar niveles de proliferación en DMD y DMB*

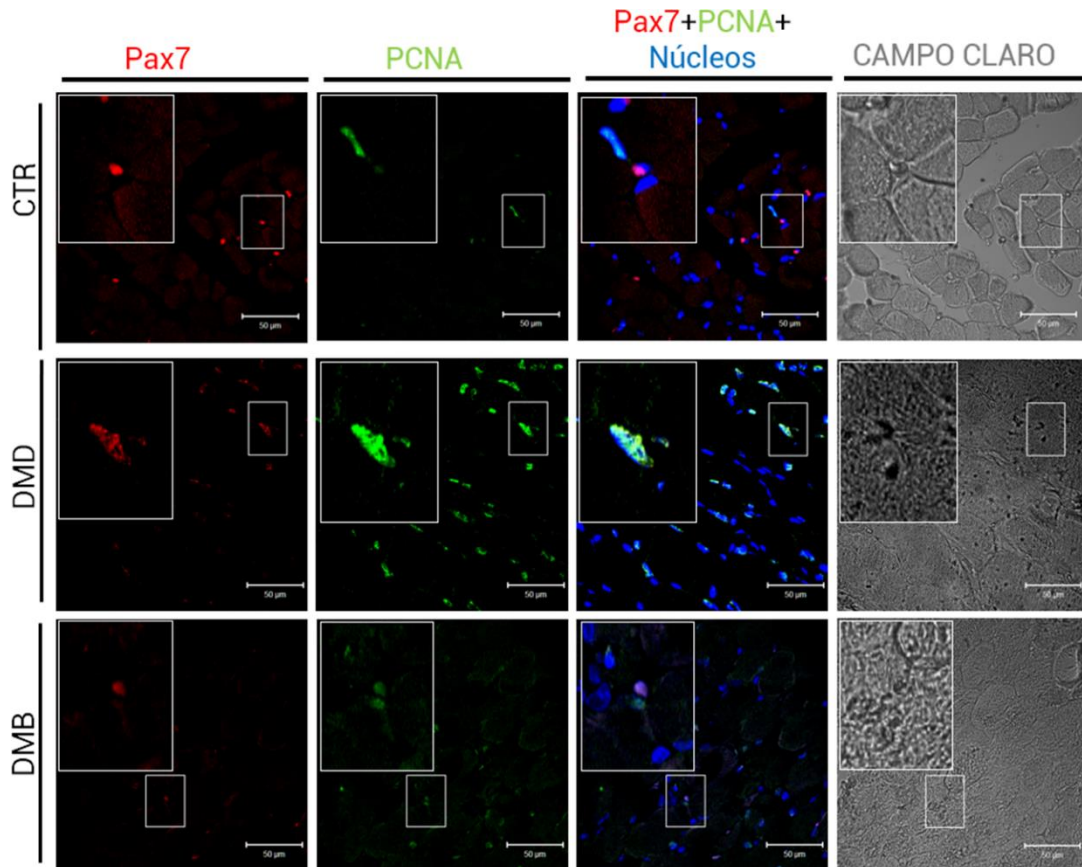
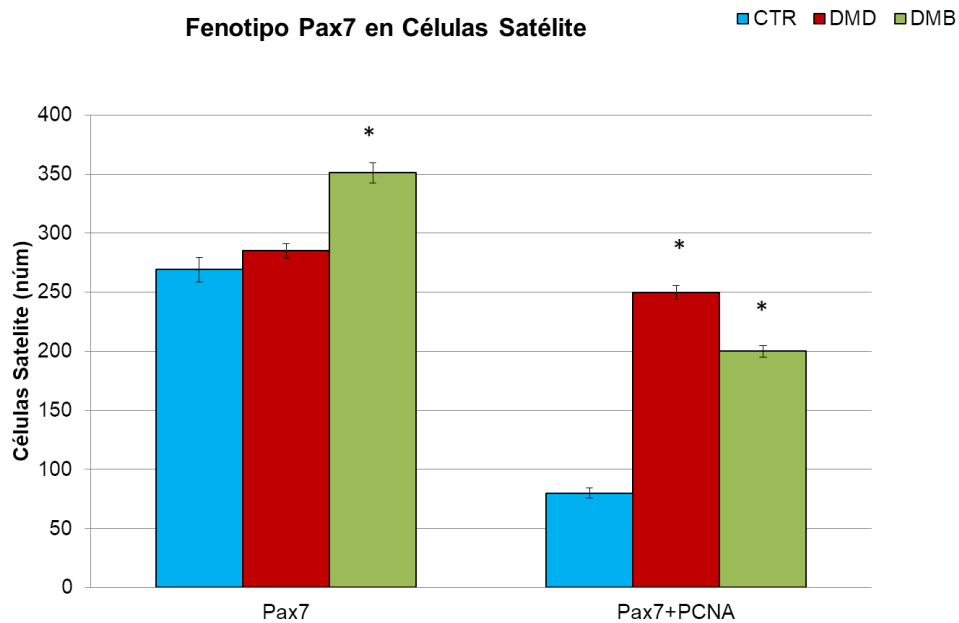


Figura 6. Fotomicrografías representativas de muestran la colocación de PAX7 y PCNA en tejido distrófico vs CTR. Tomadas a 40x, la barra representa 50  $\mu\text{m}$ , mientras que el aumento fue tomado a 35  $\mu\text{m}$ .



*Figura 7. Gráficas post conteo de, PAX7, PAX7+PCNA utilizado para evaluar niveles de proliferación en DMD y DMB*

### **Análisis de arreglos de expresión.**

Para el análisis se emplearon doce muestras diagnosticadas agrupadas en tres grupos, DMD (cinco muestras), DMB (cinco muestras) y controles sanos (CTR) (dos muestras).

A partir de dichos microarreglos fueron proporcionados los datos crudos por el Instituto de Fisiología, y después del análisis se determinó la expresión diferencial de 288 miRNAs humanos en cada arreglo de un total de 2306 utilizados para discernir entre los grupos DMD y BMD vs CTR, mediante el uso del análisis de jerarquía con el software Multi Experiment Viewer TM4 version 4.9.8.

## **miRNAs en la distrofia muscular de Duchenne**

De los 288 miRNAs (de humanos) detectados con la matriz cabe resaltar que durante la comparación se encontró una firma de miRNAs con expresión diferencial entre controles sanos y los casos con DMD y DMB se determinó que en los controles hay miRNAs expresados a la baja (verdes) mientras que en DMD que en el mismo grupo de miRNAs se encontró regulado con expresión al alza (Rojo) (figura 8). Partiendo de estos resultados se realizó un análisis de SAM (Significance Analysis for Microarrays) con el fin identificar los miRNAs expresados diferencialmente en DMD con respecto al control, este análisis dio como resultado un mapa de calor de los miRNAs, y mediante un filtrado se obtiene un listado con los miRNAs con significancia positiva del grupo de distrofia muscular de Duchenne (figura 9). Se logró determinar un subconjunto de cincuenta y nueve miRNAs humanos con expresión diferencial entre los grupos control vs DMD con un nivel significativo ( $P < 0.05$ ) correspondientes al 20.48 % de las sondas de miRNA humanos presentes en la matriz (figura 9). Después se construyó el gráfico de volcán en donde se graficó la proporción de cambio vs. el valor confianza (p-value), hallamos diecisiete miRNAs con expresión alta y seis miRNAs con expresión baja en DMD (figura 10).



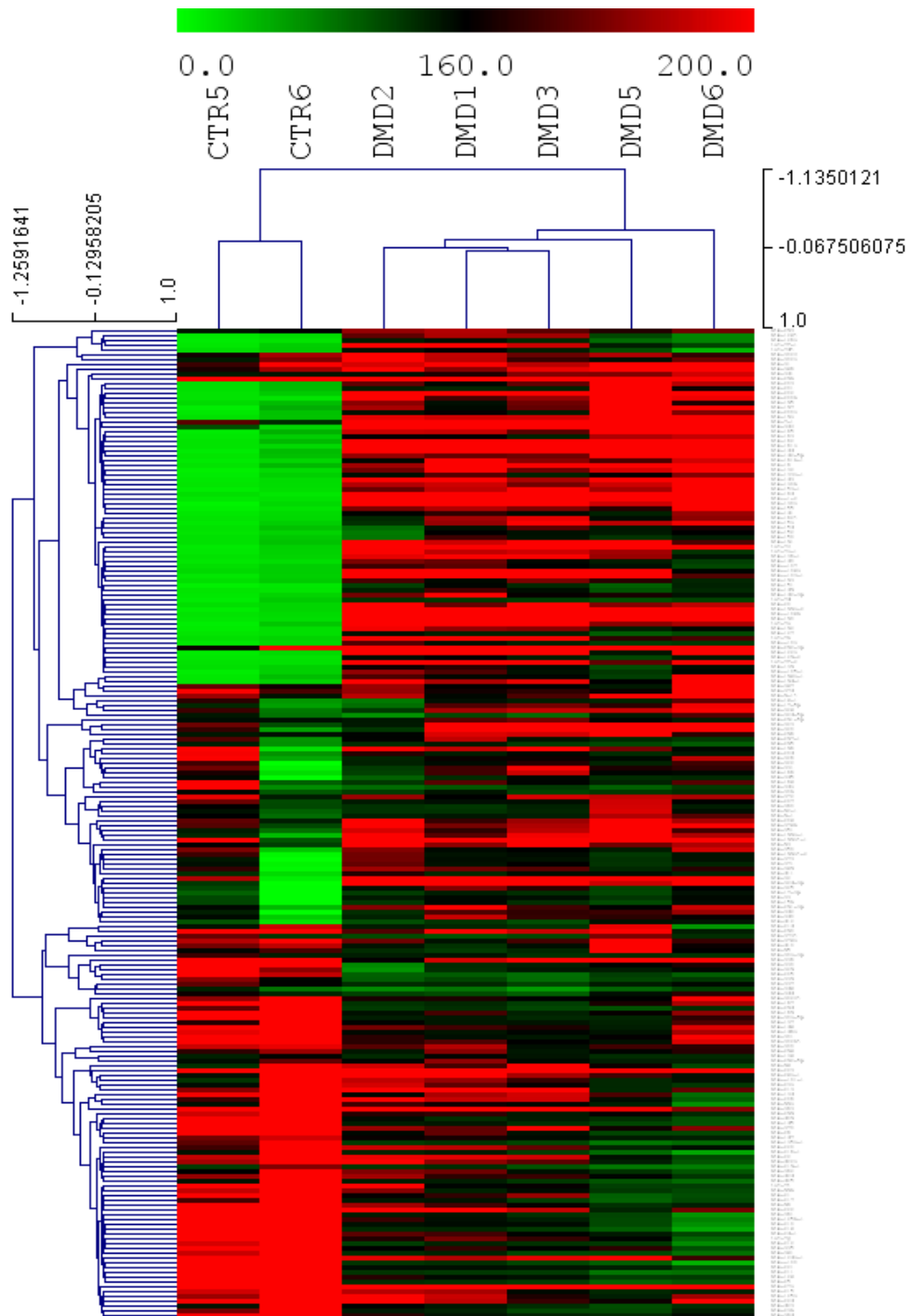


Figura 8. Comparación de la expresión de los miRNAs entre controles sanos y los casos con DMD y DMB. Los miRNAs expresados a la baja se representan con color (verde) mientras que miRNAs con expresión al alza en (rojo).

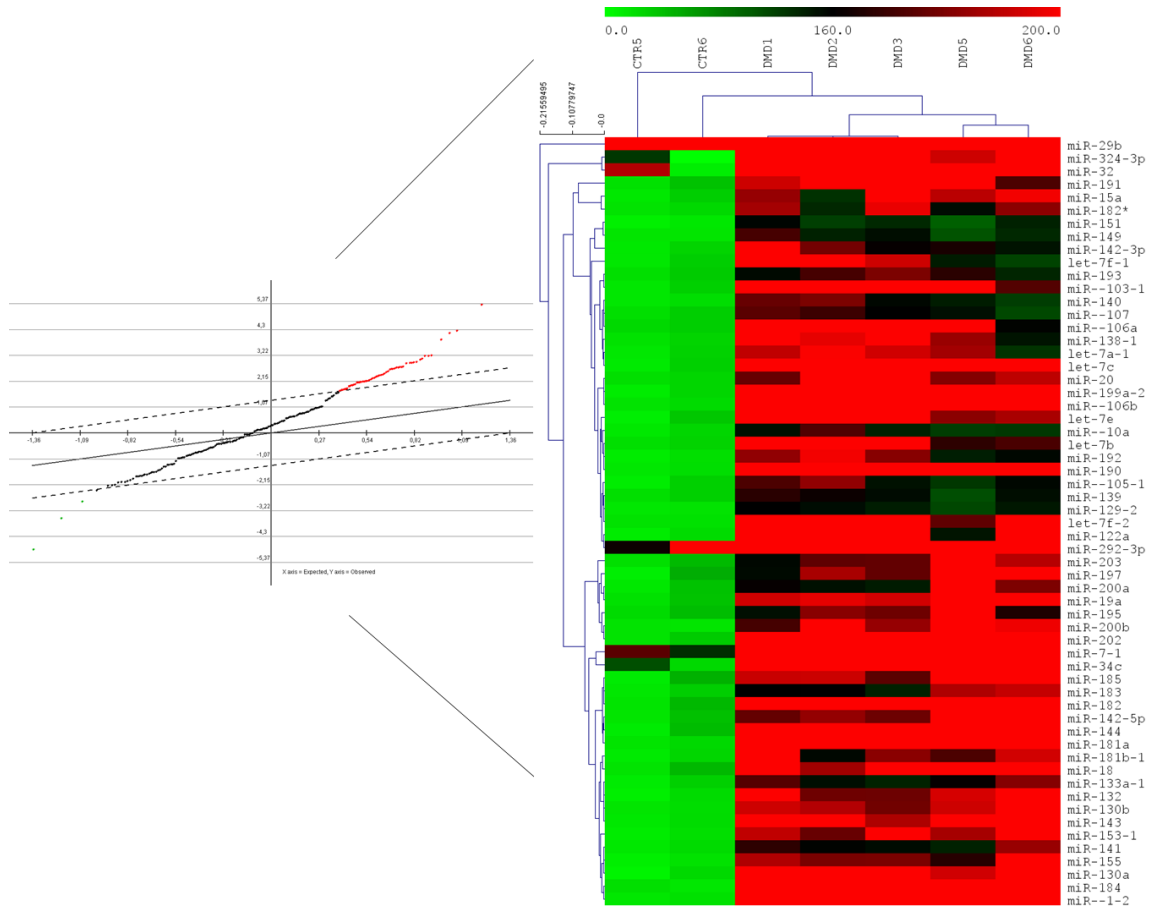


Figura 9. Análisis de significancia (SAM) que determina cómo se diferencian los datos entre los miRNAs expresados al alza (Rojo) en los casos distróficos y los expresados a la baja (verde).

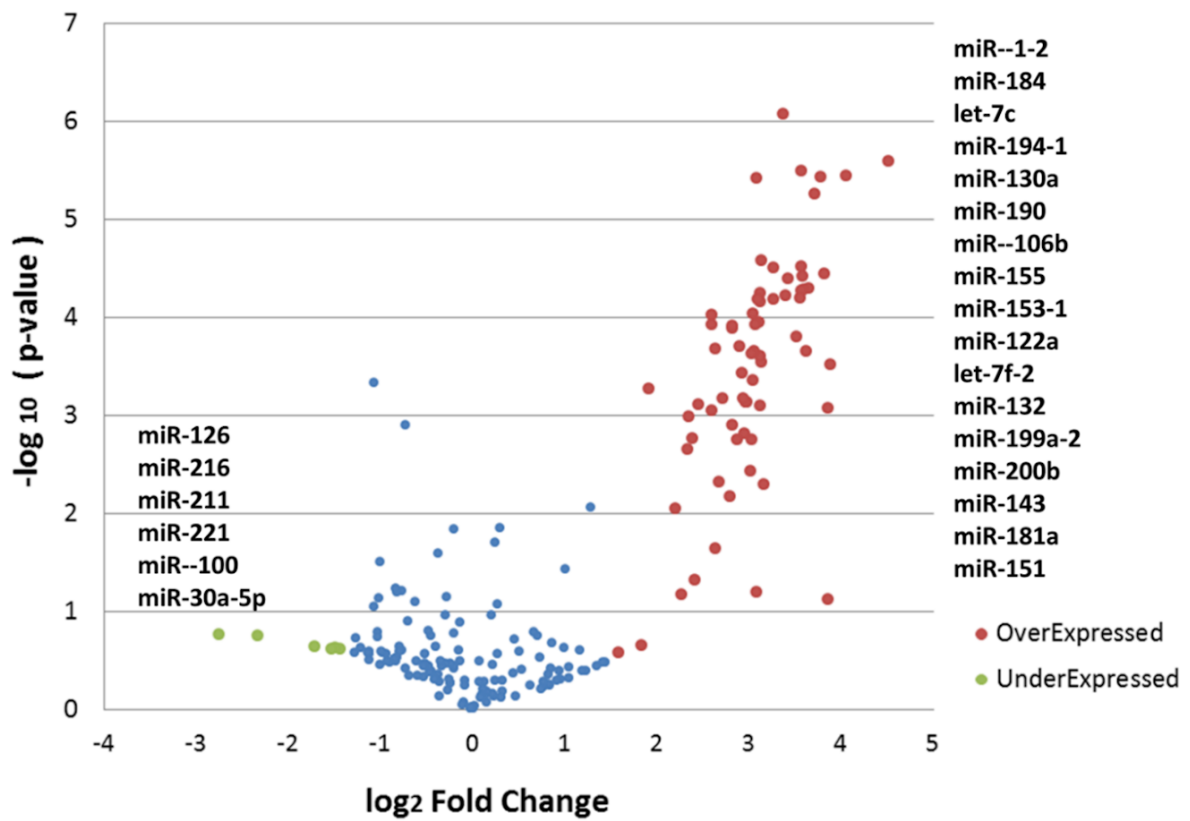


Figura 10. Gráfico de volcán, los miRNAs con alta (color rojo) y baja (en verde) expresión; en color azul, los que no presentan cambios significativos tomando una razón de cambio ( fold Change) menor a 1 a -1. El valor de cambio es el valor obtenido de la expresión de miRNA utilizada para describir la cantidad de cambios entre un valor original y una medida.

### **miRNAs en la distrofia muscular de Becker**

Para la DMB hallamos cuarenta y un miRNAs (figura 12) humanos que se expresaron diferencialmente con un nivel significativo ( $P < 0.05$ ), correspondientes al 14 % de las sondas de miRNAs humanos presentes en la matriz (figura 11).

Al emplear el método de linearización por SAM no se modificó el número de miRNAs (cuarenta y uno) descritos anteriormente. Estos resultados son presentados de acuerdo con su expresión a la alza en casos con distrofia muscular de Becker comparados con los controles (figura 12).

Después del filtrado de los datos mediante un gráfico de volcán se determinaron once miRNAs con alta expresión y dos miRNAs con baja expresión en DMB (figura 13).

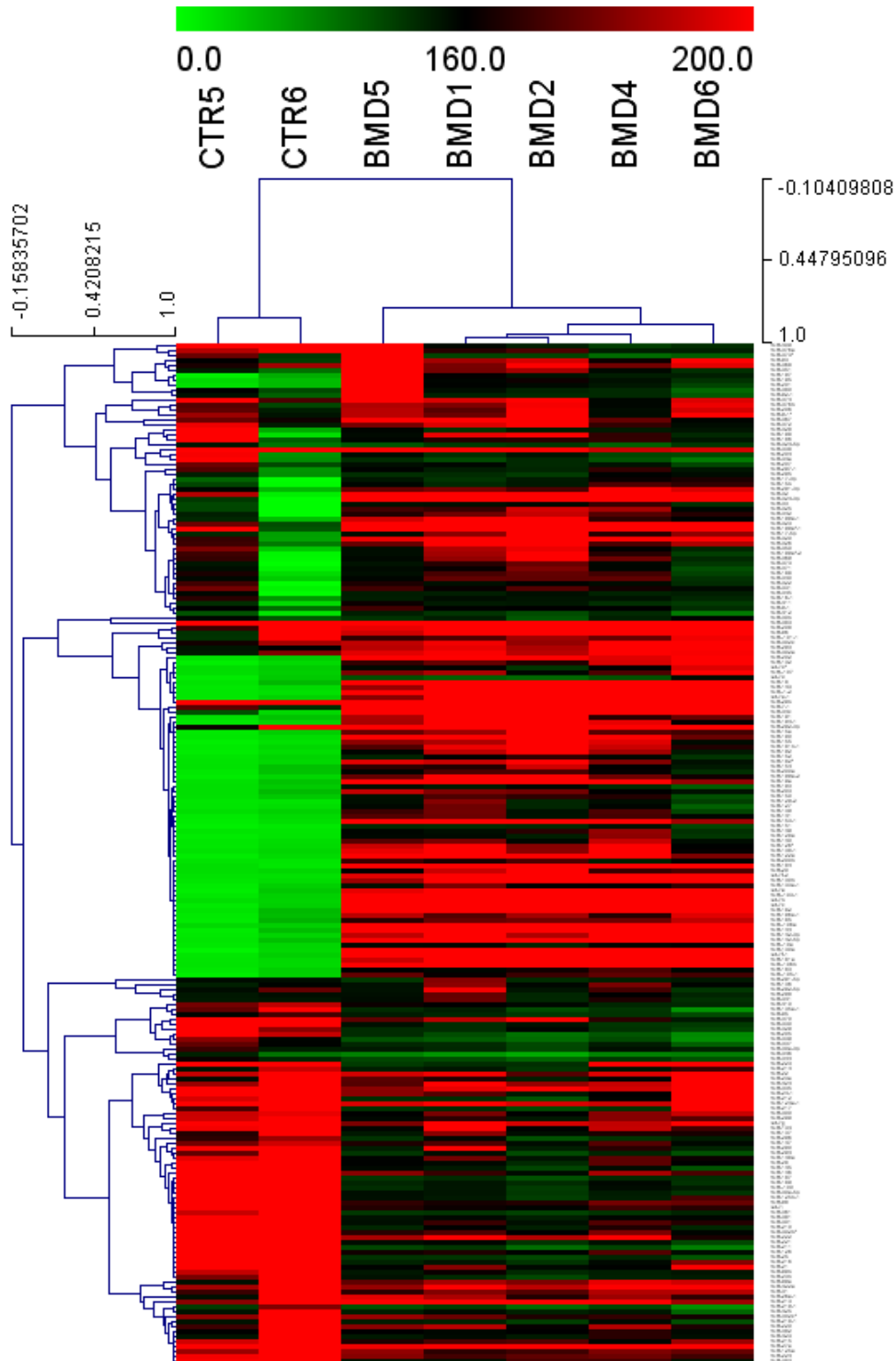


Figura 11. Mapa de calor de la expresión diferencial de los miRNAs entre controles sanos vs DMB resaltando que los miRNAs se encontraron con baja expresión en controles comparado con el grupo distrófico.

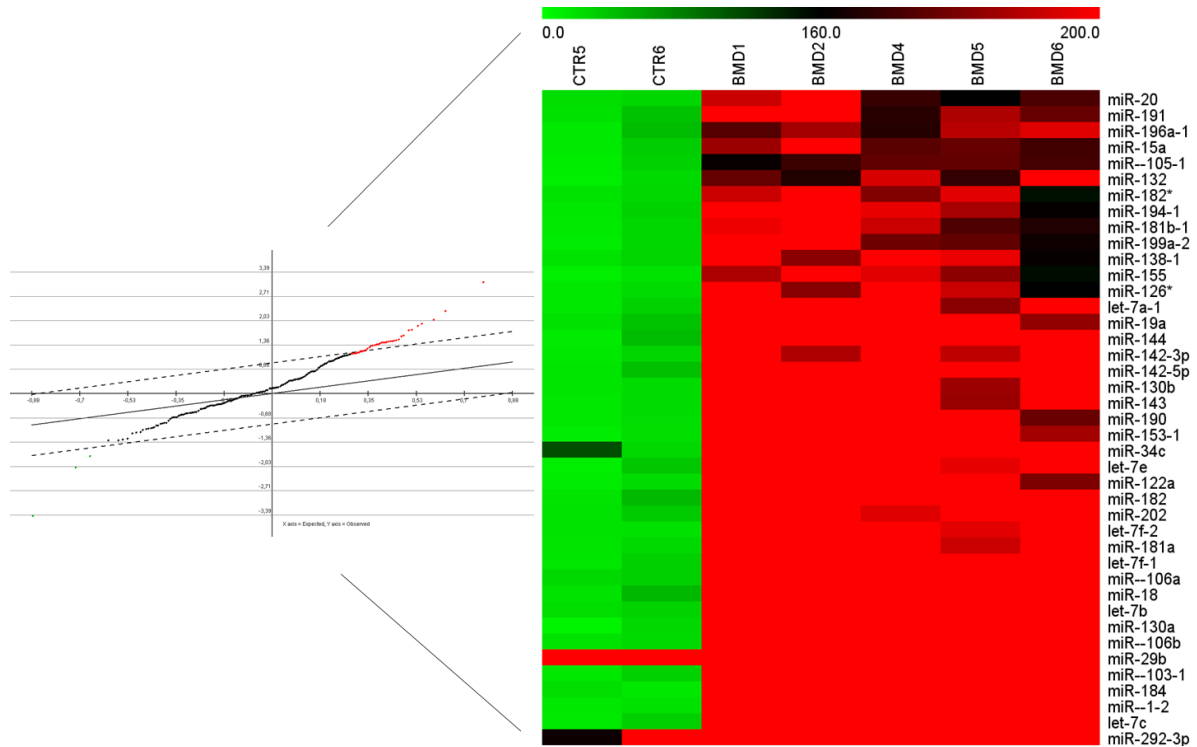


Figura 12. Gráfico SAM, que determina los miRNAs con expresión al alza (rojo) y a la baja (verde) en los casos distróficos. Mapa de calor de miRNAs con significancia positiva en DMB comparados con los controles (CTR 5 y 6).

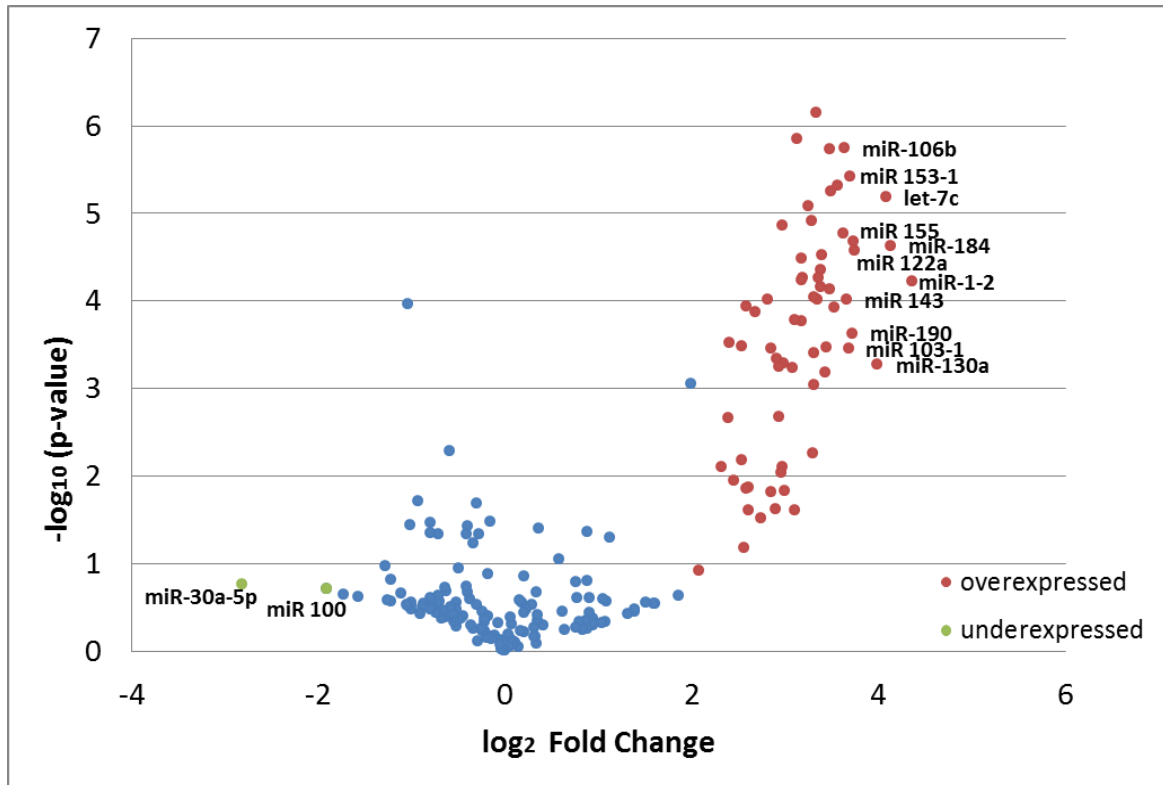


Figura 13. Gráfico de volcán muestra dos miRNAs expresados a la baja (verde) y 11 miRNAs expresadas al alza (rojo) que son denominados miRNAs significativos.

## **Mapa de calor comparativo entre distrofia muscular de Duchenne (DMD) vs distrofia muscular de Becker (DMB)**

Se realizó un análisis comparativo (SAM) de los miRNAs con expresión diferencial y se determinó que fueron sesenta y cinco miRNAs en CTR vs los grupos distróficos DMD vs DMB (Tabla 5).

De manera adicional se realizó un mapa de calor en el que se compararon los miRNAs encontrados expresados en DMD vs DMB y se observó que no hubo diferencias significativas en la expresión de ese grupo de miRNAs (cuarenta y uno) (figura 14). Esto se llevó a cabo puesto que en la bibliografía solamente se ha reportado perfiles de expresión en DMD ([Perry & Muntoni, 2016](#)) o DMB ([Brusa et al., 2020](#)); sin embargo, no hay en DMD vs DMB y, con este estudio se podría averiguar si es que existía un grupo de miRNAs específicos compartidos entre las distrofias

Mediante los datos obtenidos se realizó un análisis para determinar los miRNAs desregulados encontrados compartidos entre ambos grupos DMD y DMD reportando a sesenta y cinco miRNAs desregulados a la alza.

Adicionalmente, se comparó la tasa de cambio de los miRNAs para representarlos de manera gráfica se utilizó un diagrama de Venn (figura 15), en donde dentro del círculo verde encontramos a los miRNAs reportados en Duchenne que incluyen un grupo de cincuenta y nueve miRNAs mientras que en el círculo naranja se representan a los cuarenta y un miRNAs reportados en Becker, cabe resaltar que se encontró que 15 miRNAs se encontraban compartidos entre ambos grupos y es por esta razón que estos miRNAs son propuestos como posibles marcadores (miR-1-2, miR-184, miR-130a, miR-106b, miR-155, miR153-1, let-7f-2, miR-130b, let-7e,



miR-141, miR-20, miR-133a-1 miR-19a, miR-183, miR-34c) representado por la intersección de diagrama de Venn dicho análisis se llevó a cabo utilizando valor de cambio de 2 a  $-2$ (figura 15).

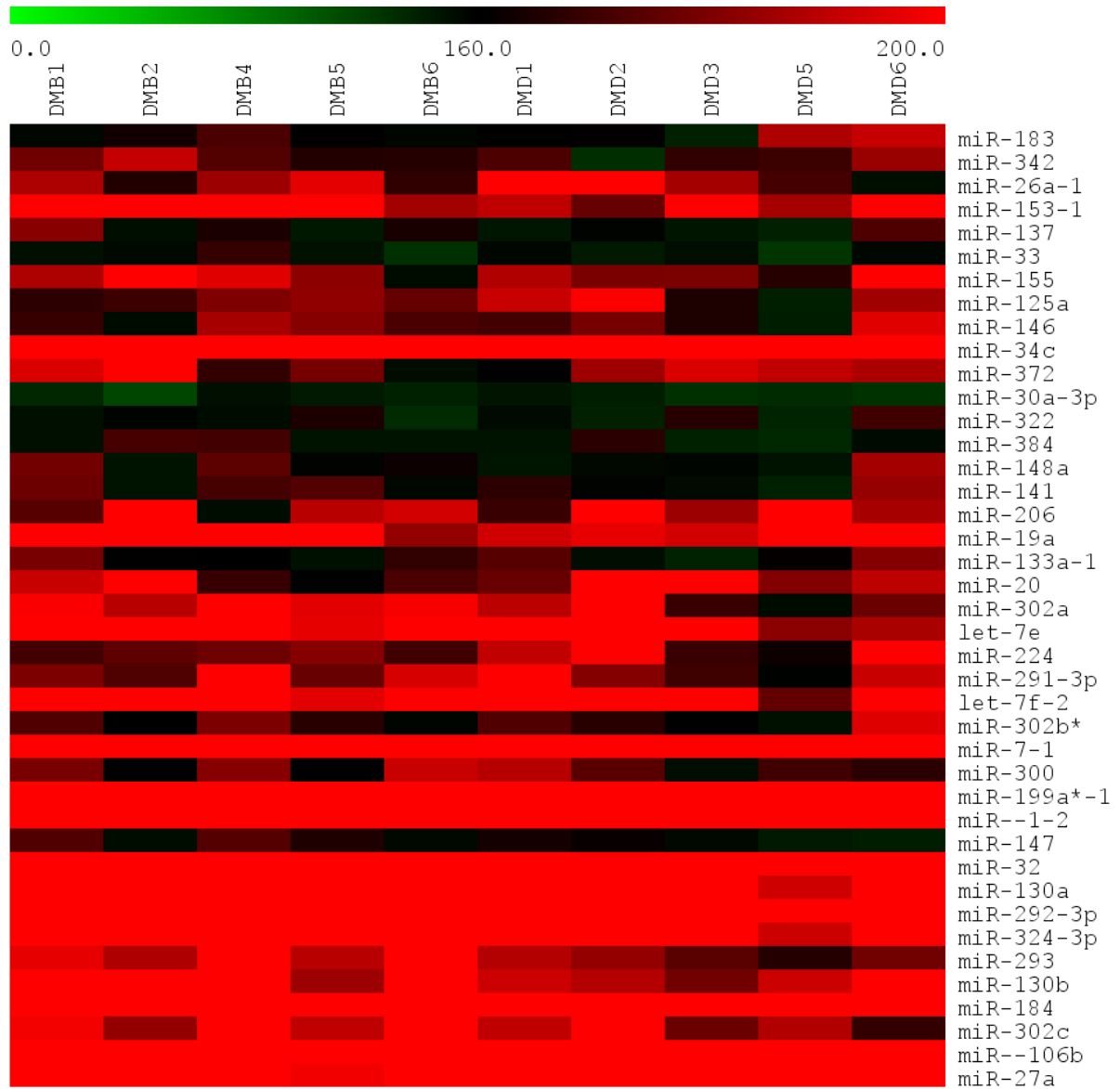
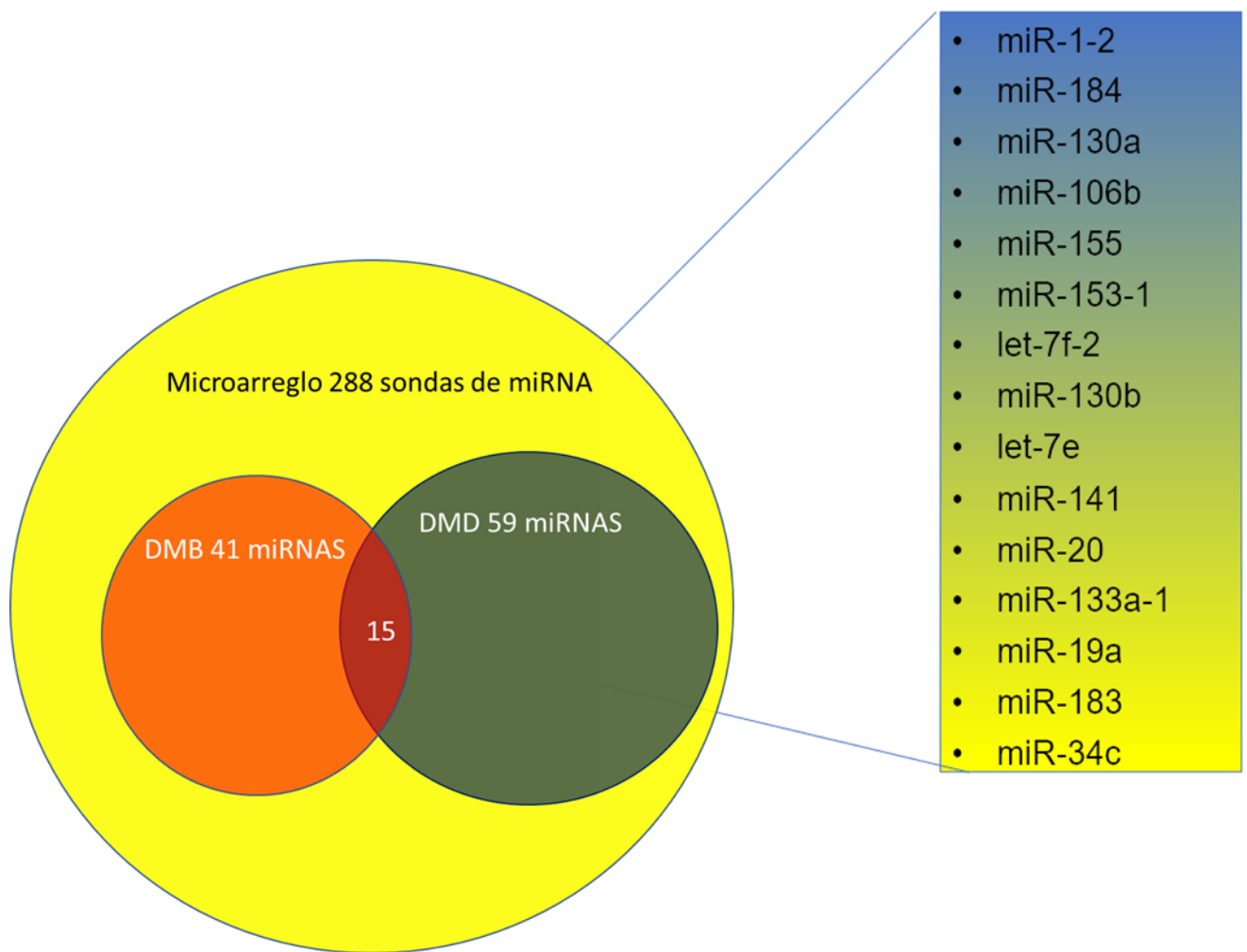


Figura 14. Mapa de calor de ambos grupos distróficos no se observan diferencias significativas en la expresión de los miRNAs entre ambos grupos DMD y DMB.

*Tabla 5. miRNAs encontrados regulados de manera similar en las Distrofias musculares Duchenne y Becker*

miRNA	BECKER				DUCHENNE			
	Fold change	log2 Fold change	pvalue	log10 pvalue	Fold change	log2 Fold change	P value	-log10 p value
miR-1-2	20.57	4.36	5.94E-05	4.23	22.98	4.52	2.54E-06	5.60
miR-184	17.51	4.13	2.32E-05	4.63	16.71	4.06	3.57E-06	5.45
let-7c	16.86	4.08	6.56E-06	5.18	14.77	3.88	2.99E-04	3.52
miR-130a	15.88	3.99	5.34E-04	3.27	14.49	3.86	8.44E-04	3.07
miR-122a	13.41	3.74	2.65E-05	4.58	12.37	3.63	2.18E-04	3.66
miR-155	13.31	3.73	2.11E-05	4.68	13.11	3.71	5.47E-06	5.26
miR-190	13.11	3.71	2.33E-04	3.63	14.20	3.83	3.60E-05	4.44
miR-153-1	12.92	3.69	3.74E-06	5.43	12.58	3.65	5.08E-05	4.29
miR-103-1	12.80	3.68	3.50E-04	3.46	10.59	3.40	5.94E-05	4.23
miR-143	12.65	3.66	9.59E-05	4.02	11.91	3.57	3.14E-06	5.50
miR-106b	12.44	3.64	1.80E-06	5.74	13.80	3.79	3.62E-06	5.44
let-7f-2	12.31	3.62	1.68E-05	4.77	12.09	3.60	5.12E-05	4.29
miR-151	11.84	3.57	4.78E-06	5.32	11.51	3.53	1.59E-04	3.80
miR-132	11.50	3.52	1.19E-04	3.92	11.99	3.58	3.83E-05	4.42
miR-181a	11.27	3.49	5.52E-06	5.26	11.83	3.56	6.36E-05	4.20
miR-192	11.13	3.48	7.28E-05	4.14	10.78	3.43	4.06E-05	4.39
miR-130b	11.13	3.48	1.87E-06	5.73	10.35	3.37	8.34E-07	6.08
miR-202	10.82	3.44	3.35E-04	3.47	9.67	3.27	6.56E-05	4.18
let-7a-1	10.80	3.43	6.51E-04	3.19	8.42	3.07	1.18E-04	3.93
miR-126*	10.53	3.40	2.95E-05	4.53	8.09	3.02	3.75E-03	2.43
miR-128a	10.45	3.38	6.93E-05	4.16	8.22	3.04	1.78E-03	2.75
miR-199a-2	10.41	3.38	4.40E-05	4.36	11.94	3.58	3.04E-05	4.52
miR-181b-1	10.20	3.35	5.38E-05	4.27	9.63	3.27	3.14E-05	4.50
let-7f-1	10.12	3.34	9.65E-05	4.02	7.71	2.95	6.74E-04	3.17
let-7b	10.05	3.33	7.06E-07	6.15	8.77	3.13	2.49E-04	3.60
miR-142-3p	9.93	3.31	9.07E-04	3.04	8.58	3.10	6.56E-05	4.18
miR-194-1	9.89	3.31	3.95E-04	3.40	14.60	3.87	7.58E-02	1.12
miR-149	9.87	3.30	9.06E-05	4.04	8.85	3.15	2.86E-04	3.54
let-7e	9.79	3.29	5.45E-03	2.26	9.00	3.17	5.13E-03	2.29
miR-200b	9.73	3.28	1.23E-05	4.91	11.92	3.58	5.39E-05	4.27
miR-140	9.49	3.25	8.28E-06	5.08	8.66	3.11	1.11E-04	3.95
miR-141	9.08	3.18	5.39E-05	4.27	8.83	3.14	2.63E-05	4.58
miR-129-2	9.06	3.18	1.69E-04	3.77	8.73	3.13	5.62E-05	4.25
miR-138-1	9.03	3.18	5.83E-05	4.23	8.75	3.13	6.91E-05	4.16
miR-182*	9.00	3.17	3.23E-05	4.49	8.27	3.05	9.20E-05	4.04

<b>miR-106a</b>	8.73	3.13	1.42E-06	5.85	8.17	3.03	2.32E-04	3.63
<b>miR-15a</b>	8.61	3.11	1.66E-04	3.78	8.31	3.06	2.22E-04	3.65
<b>miR-105-1</b>	8.58	3.10	2.46E-02	1.61	7.90	2.98	7.31E-04	3.14
<b>miR-18</b>	8.47	3.08	5.78E-04	3.24	7.37	2.88	1.79E-03	2.75
<b>miR-144</b>	7.94	2.99	1.48E-02	1.83	8.73	3.13	7.95E-04	3.10
<b>miR-127</b>	7.93	2.99	5.21E-04	3.28	7.06	2.82	1.22E-04	3.91
<b>miR-20</b>	7.86	2.97	1.36E-05	4.87	8.47	3.08	3.74E-06	5.43
<b>miR-133a-1</b>	7.85	2.97	7.82E-03	2.11	7.75	2.95	1.55E-03	2.81
<b>miR-142-5p</b>	7.80	2.96	9.02E-03	2.04	7.10	2.83	1.27E-03	2.90
<b>miR-19a</b>	7.63	2.93	5.65E-04	3.25	7.59	2.92	3.65E-04	3.44
<b>miR-10a</b>	7.62	2.93	2.09E-03	2.68	7.07	2.82	1.30E-04	3.89
<b>miR-107</b>	7.52	2.91	4.54E-04	3.34	6.09	2.61	1.17E-04	3.93
<b>miR-182</b>	7.46	2.90	2.40E-02	1.62	8.28	3.05	4.34E-04	3.36
<b>miR-191</b>	7.22	2.85	3.45E-04	3.46	7.81	2.96	7.24E-04	3.14
<b>miR-183</b>	7.21	2.85	1.53E-02	1.81	7.50	2.91	1.98E-04	3.70
<b>miR-152</b>	7.04	2.82	9.52E-05	4.02	6.56	2.71	6.79E-04	3.17
<b>miR-196a-1</b>	6.66	2.74	3.00E-02	1.52	8.47	3.08	6.42E-02	1.19
<b>miR-139</b>	6.41	2.68	1.32E-04	3.88	6.09	2.61	9.54E-05	4.02
<b>miR-195</b>	6.10	2.61	2.46E-02	1.61	5.50	2.46	7.80E-04	3.11
<b>miR-200a</b>	6.08	2.60	1.35E-02	1.87	6.40	2.68	4.72E-03	2.33
<b>let-7d*</b>	6.00	2.59	1.15E-04	3.94	4.62	2.21	8.89E-03	2.05
<b>miR-197</b>	5.99	2.58	1.41E-02	1.85	6.25	2.64	2.26E-02	1.65
<b>miR-185</b>	5.89	2.56	6.58E-02	1.18	6.98	2.80	6.69E-03	2.17
<b>miR-150</b>	5.78	2.53	3.30E-04	3.48	5.08	2.35	1.03E-03	2.99
<b>miR-154</b>	5.77	2.53	6.61E-03	2.18	5.05	2.34	2.22E-03	2.65
<b>miR-203</b>	5.47	2.45	1.11E-02	1.95	6.09	2.61	8.93E-04	3.05
<b>miR-193</b>	5.28	2.40	2.98E-04	3.53	6.24	2.64	2.07E-04	3.68
<b>miR-201</b>	5.26	2.39	2.14E-03	2.67	5.23	2.39	1.72E-03	2.76
<b>Let-7d</b>	4.98	2.32	7.89E-03	2.10	5.32	2.41	4.86E-02	1.31
<b>miR-34c</b>	4.20	2.07	1.20E-01	0.92	4.83	2.27	6.85E-02	1.16
<b>miR-30a-5p</b>	0.14	-2.82	1.73E-01	0.76	0.15	-2.75	1.74E-01	0.76
<b>miR-100</b>	0.27	-1.91	1.96E-01	0.71	0.20	-2.32	1.77E-01	0.75



*Figura 15. Se realizó una comparación entre la tasa de cambio de los miRNAs y al hacer el diagrama de Venn se observa que hay 15 miRNAs compartidos entre ambos grupos, obteniendo así el perfil de expresión de 15 miRNAs que podrían ser utilizados como blanco.*

### **Análisis in silico de miRNAs relacionados con la diferenciación de las células satélite.**

Para seleccionar los miRNAs blanco factibles para la validación de los resultados utilizando hibridación *in situ* en el tejido, se realizó un análisis *in silico* con distintas bases de datos (*Target scan, miRBase, miRDB, Diana, Myo-REG*). La búsqueda se inició a partir de los 15 miRNAs obtenidos del clúster en común entre los pacientes con DMD y DMB. Estos se correlacionaron con los reportados previamente como relacionados con los marcadores (*PAX3, PAX7, MYOD, MDFIC* y *PAXBP1*) implicados en miogénesis. Con toda esta información generamos un mapa de interacción con Myo-REG en el cual se reportan los miRNAs reguladores de marcadores implicados en el proceso de diferenciación de la célula satélite. Por ejemplo, *PAX3* que es regulado por miR-1-2, let-7f-2 y let-7e. *PAX7* por su parte se encontró regulado por miR-1-2 y miR-133a, *PAXBP1* se encontró regulado por miR-130a, miR-155, miR-153-1, mientras *MDFIC* es regulado por miR-130a, miR-130b, miR-19, let-7f-2, let-7e. Sin embargo, *MYOD* y *MDFI* no reportaron ser posiblemente regulados por algún miRNA dentro del conjunto de 15 miRNAs propuesto en este estudio. Por lo que podemos inferir que estos 15 miRNAs se encuentran implicados en el proceso de activación de las células satélite (figura 16).

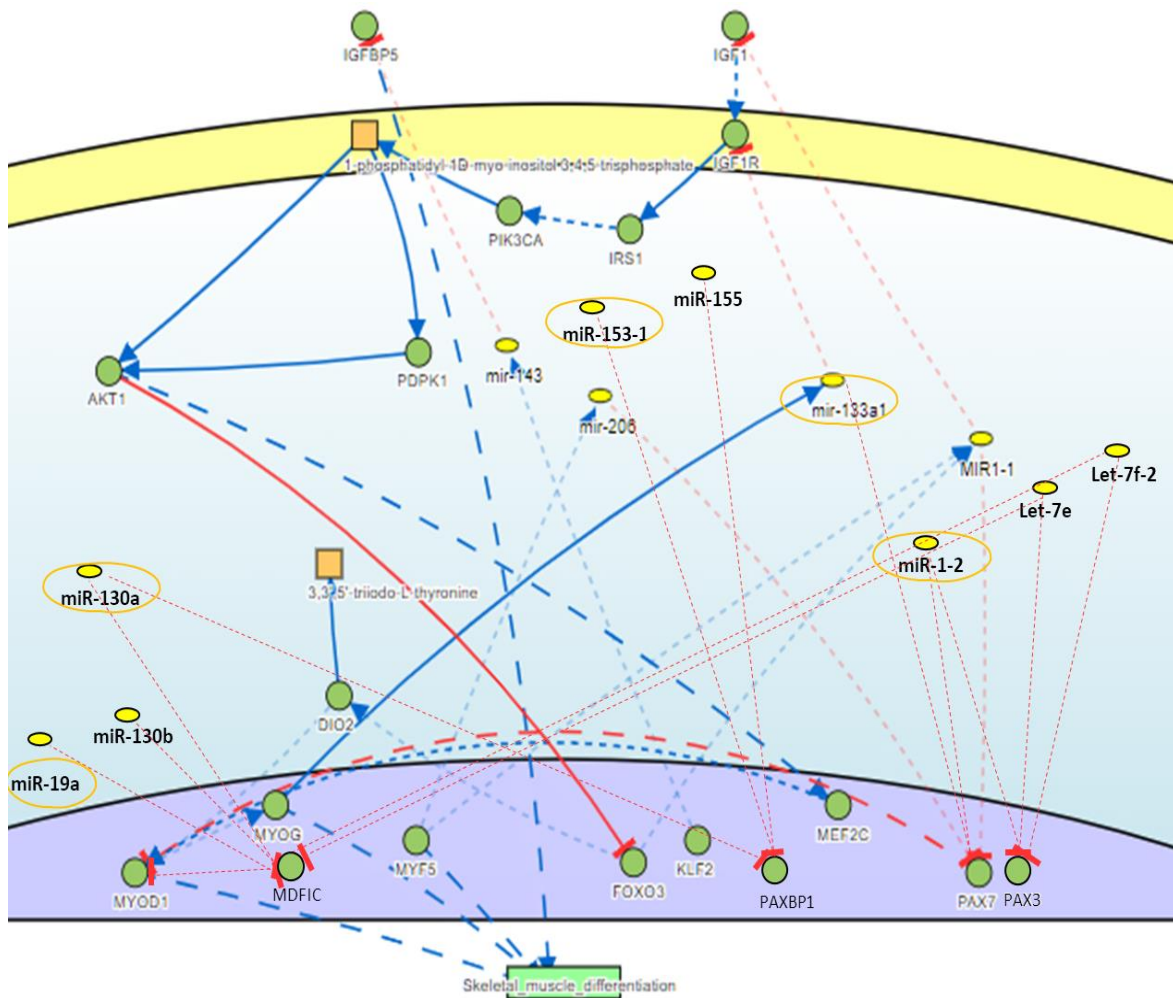


Figura 16. Red de interacción de los miRNAs y se determinaron 9 miRNAs de los 15 pertenecientes al conjunto encontrado en los pacientes con DMD y DMB, de los cuales solo 5 (círculos amarillos) se encuentran sobrexpresados (miR-130a, miR-133a1, miR-1-2, miR-153-1, miR-19a).

## Discusión

Mediante el análisis de los datos obtenidos con los microarreglos se determinaron 15 miRNAs expresados a la alza en los grupos distróficos: miR-1-2, miR-184, miR-130a, miR-106b, miR-155, miR153-1, let-7f-2, miR-130b, let-7e, miR-141, miR-20, miR-133a-1 miR-19a, miR-183, miR-34c. De esos 15 miRNAs obtenidos con el análisis *in silico* encontramos 9 miRNAs: miR1-2, let-7f-2 y let-7e, miR-133a, miR-130a, miR-155, miR-153-1, miR-130b, miR-19 que juegan un papel importante en la diferenciación de las células satélite a través de procesos de regulación de diversas proteínas como *PAX3*, *PAX7*, *PAXBP1*, *MDFIC*. Esta información sugiere que dichos miRNAs podrían estar implicados en la inhibición de los procesos de activación de la CS, por lo que la proliferación de las CS de reserva se ve afectada. Debido a esto, la diferenciación producida no es suficiente para regenerar los tejidos dañados. Cabe señalar que de los 9 miRNAs anteriormente descritos, en la revisión sistematizada se encontraron reportados 5 miRNAs (miR-1 (Amirouche et al., 2017; Bulaklak et al., 2018; Galimov et al., 2016; Hindi & Kumar, 2016; X. Li et al., 2014), -155 (Nie et al., 2016), let-7f, let-7e (Mohamed, Hajira, Lopez, & Boriek, 2015), -133a (W. Liu, Sheng, Nie, Wen, & Mo, 2020; Mohamed et al., 2015; Pelosi, Coggi, Forcina, & Musaro, 2015; Pietraszek-Gremplewicz et al., 2018; Roberts et al., 2012; Sanson et al., 2020)) implicados en procesos de diferenciación de las CS.

El miR-1 conocido como regulador de la diferenciación, su expresión podría ser reprimida durante el daño muscular en ratones mdx/miR-206<sup>-/-</sup> (N. Liu et al., 2012), KO TRAF6/PAX7CrE (Hindi & Kumar, 2016), mdx/miR-155<sup>-/-</sup> (Nie et al., 2016), KO miR-29a/PAX7CrE (Galimov et al., 2016), y en un ratón con el exón 23 inhibido (Cacchiarelli et al., 2010), miR-1 se encontró regulado a la baja. Interesantemente



la expresión de miR-1 está relacionada con el paciente distrófico tanto Duchenne como Becker, resultados similares fueron reportados en un modelo murino mdx. Pese a que son pocos los trabajos que refieren los blancos putativos de miR-1, es claro que la función principal está basada en la regulación negativa de la diferenciación, pues inhibe *PAX7*, *MIOGENINA*, *TNF- $\alpha$* , *HDAC2*, *MYOD* y *MYF5* (Cacchiarelli et al., 2010; Galimov et al., 2016; Hindi & Kumar, 2016; N. Liu et al., 2012; Nie et al., 2016).

Por lo que respecta a miR-155, estudios experimentales empleando ratones KO miR-155 (Nie et al., 2016), revelaron que la expresión de *SOCS1* (Supresor de señal de citocinas) reprime los procesos inflamatorios posterior a un daño inducido, esto debido a que *SOCS1* regula negativamente la expresión de citocinas proinflamatorias como *IL-6*, *INF $\gamma$* , *MCP-1* y de *TNF- $\alpha$* . Estos hechos son congruentes con la presencia de miR-155 en pacientes con distrofia, reportada por los arreglos de expresión. Adicional a esta información, los análisis *in silico* sugieren que *PAXBP1* es blanco putativo de miR-155, por tanto, a su vez controla la transcripción de *PAX7* y, con ellos, la activación de las CS (Nie et al., 2016).

Por otro lado, se reportó la expresión al alza de los miR let-7f y let-7e (Mohamed et al., 2015) en un modelo mdx sometido a estiramiento muscular y se determinó la participación de let-7e como inhibidor de proteínas de matriz Extracelular (ECM) implicados en fibrosis como *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL24A1*, *COL27A1*, *ITGA1*, *ITGA4*, *SCD1* y *THBS1*. Sin embargo, la expresión de let-7f no determinó un papel concluyente para dicho miR en la regulación de la diferenciación de las CS. Por lo que la presencia de let-7e en pacientes distróficos reportado en los

microarreglos va de la mano con la presencia de daño. Por su parte el análisis *in silico* determinó que *PAX3* y *MDFIC* son blancos de ambos miRNAs por lo que la quiescencia, proliferación y diferenciación de las CS podría verse afectada a través de este mecanismo (Mohamed et al., 2015).

Adicionalmente, miR-133a fue el miRNA más estudiado, al menos 7 artículos distintos lo mencionan. Estos estudios se llevaron a cabo principalmente en modelos experimentales de daño como mdx/miR-206<sup>-/-</sup> (N. Liu et al., 2012), KO miR29a/PAX7CrE (Galimov et al., 2016), en mdx con delección del exón 23 (Cacchiarelli et al., 2010), en el DKO mdx/miGF-1F (Pelosi et al., 2015) y ratones mdx tratados con cardiotoxina este miR fue reportado con mayor frecuencia como regulador indirecto del aumento *TGF-β* que promueve la fibrosis así como la regulación *SMAD3* y *SMAD5* que regulan la capacidad regenerativa del músculo esquelético y de formación de miofibras y miotubos a través de la activación de la calcineurina que, a su vez, es encargada de iniciar la diferenciación del músculo esquelético activando *MEF-2C* y *MYOD*. También aumenta la expresión de *TNF-α* quien actúa como regulador positivo de miR-1 y miR-206 reportados como inhibidores de citocinas proinflamatorias reguladas por *SOCS1* como *INFr*, *IL-6* Y *MCP-1* (Taetzsch et al., 2021). Estos datos justifican la expresión de miR-133a en pacientes con distrofia muscular reportada en los microarreglos. Mientras que el análisis *in silico* determinó que este miRNA se encontraba regulado mediante la expresión de *MIOGENINA*, por lo que se podría concluir que el papel de este miRNA se encuentra principalmente regulando la diferenciación de las CS.

## **Conclusiones**

Al realizar una comparación entre los miRNAs seleccionados a partir de las muestras de DMD y DMB, el análisis *in silico* y de acuerdo con lo publicado por otros autores, se sugiere que miR-1 y miR-133a afectan la diferenciación de las células satélite a miocitos.

Sin embargo, debido a que miR-133a se encontró implicado en procesos de inflamación durante el daño, se puede proponer que miR-1 podría ser utilizado como blanco potencial para la hibridación *in situ*.

## Anexos

### 9.1 Título Artículo de Revisión

**“MicroRNAs asociados con la capacidad de regeneración de las células satélites en las distrofias musculares Review”**

Molina-Osorio J <sup>1,3</sup>., González-Márquez H <sup>2</sup>., Díaz Rosas G <sup>3</sup>., Contreras-Ramos A <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Biología Experimental-Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, <sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-División de Ciencias Biológicas y de la Salud-Lab. Expresión Génica, Proteómica, <sup>3</sup>Hospital Infantil de México Federico Gómez-Lab. de Investigación en Biología del Desarrollo y teratogénesis experimental.

### 9.2 Tinción de Hematoxilina- Esoina

Solución Hematoxilina de Haris

REACTIVO	Cantidad
Hematoxilina de Harris C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	2.5 gr
Alumbre de amonio de potasio AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 12H <sub>2</sub> O	50 gr
Óxido rojo de mercurio HgO	2.5 gr
Alcohol 96% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	25 ml
Agua destilada	500 ml

Procedimiento

1.- La Hematoxilina de Harris se disuelve en 25 ml de alcohol al 96% calentando ligeramente.

2.- Calentar el agua e ir disolviendo el alumbre lentamente hasta disolverse por completo.

3.- Retirar del fuego y agregar la Hematoxilina disuelta previamente en el alcohol.

4.- Calentar a fuego alto y cuando se inicia el hervor retirar el recipiente.

5.- Agregar el óxido rojo de mercurio, agitar muy bien y seguir calentando a fuego lento hasta que la solución tome un color Rojo-Purpura

6.- dejar enfriar la solución rápidamente en agua de la llave

5.- Filtrar mínimo 3 veces

nota: Dejar madurar mínimo 8 días

### Solución Eosina De Carnegie

REACTIVO	Cantidad
Eosina $C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$	4 gr
Alcohol 96% $C_2H_5OH$	100 ml
Agua destilada	300 ml

### Procedimiento

1.- Disolver la eosina en agua

2.- Añadir el alcohol dejar madurar en un frasco claro durante 3 semanas

nota: Guardar en el mismo frasco

### 9.3 Solución de PBS 1X

Reactivo	[concentración 1X]	[concentración 2X]
NaCl	4.00g	11.94g

KCl	0.10g	0.10g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.72g	8.51g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.12g	3.48
H <sub>2</sub> O	500 mL	1000 mL

Nota: Disolver por completo los reactivos anteriormente enlistados en H<sub>2</sub>O

### 9.3.1 PBS-Tween 20

Para preparar el PBS-Tween 20 se debe adicionar 500uL de Tween 20 (C<sub>58</sub>H<sub>114</sub>O<sub>26</sub>; FW 1,1227.52) a 1L de PBS .

### 9.4 Recuperador de Antígeno

La solución recuperadora de Antígeno se prepara diluyendo 10mL de Concentrated (10X) Antigen Retrieval Citra Plus Solution en 90 mL de H<sub>2</sub>O. Este debe de conservarse a 4°C.

### 9.5 Bloqueador de proteínas

La solución bloqueadora se prepara diluyendo 1mL del reactivo Universal Blocking (10X) en 10mL de H<sub>2</sub>O.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aartsma-Rus, A., Ginjaar, I. B., & Bushby, K. (2016). The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Medical Genetics*, 53(3), 145-151. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103387
- Alcántara-Ortigoza, M. A., Reyna-Fabián, M. E., González-del Angel, A., Estandia-Ortega, B., Bermúdez-López, C., Cruz-Miranda, G. M., & Ruíz-García, M. (2019). Predominance of Dystrophinopathy Genotypes in Mexican Male Patients Presenting as Muscular Dystrophy with A Normal Multiplex Polymerase Chain Reaction DMD Gene Result: A Study Including Targeted Next-Generation Sequencing. *Genes*, 10(11). doi:10.3390/genes10110856
- Amirouche, A., Jahnke, V. E., Lunde, J. A., Koulmann, N., Freyssenet, D. G., & Jasmin, B. J. (2017). Muscle-specific microRNA-206 targets multiple components in dystrophic skeletal muscle representing beneficial adaptations. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 312(3), C209-C221. doi:10.1152/ajpcell.00185.2016
- Asher, D. R., Thapa, K., Dharia, S. D., Khan, N., Potter, R. A., Rodino-Klapac, L. R., & Mendell, J. R. (2020). Clinical development on the frontier: gene therapy for duchenne muscular dystrophy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 20(3), 263-274. doi:10.1080/14712598.2020.1725469
- Bernabe-García, M., Rodríguez-Cruz, M., Atilano, S., Cruz-Guzmán, O. D. R., Almeida-Becerril, T., Calder, P. C., & González, J. (2019). Body composition and body mass index in Duchenne muscular dystrophy: Role of dietary intake. *Muscle & Nerve*, 59(3), 295-302. doi:10.1002/mus.26340
- Bernabe-García, M., Rodríguez-Cruz, M., Atilano, S., Cruz-Guzmán, O. d. R., Almeida-Becerril, T., Calder, P. C., & González, J. (2019). Body composition and body mass index in Duchenne muscular dystrophy: Role of dietary intake. *Muscle & Nerve*, 59(3), 295-302. doi:<https://doi.org/10.1002/mus.26340>
- Boettger, T., Wust, S., Nolte, H., & Braun, T. (2014). The miR-206/133b cluster is dispensable for development, survival and regeneration of skeletal muscle. *Skeletal Muscle*, 4, 13. doi:10.1186/s13395-014-0023-5
- Brusa, R., Magri, F., Bresolin, N., Comi, G. P., & Corti, S. (2020). Noncoding RNAs in Duchenne and Becker muscular dystrophies: role in pathogenesis and future prognostic and therapeutic perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(21), 4299-4313. doi:10.1007/s00018-020-03537-4
- Bulaklak, K., Xiao, B., Qiao, C., Li, J., Patel, T., Jin, Q., . . . Xiao, X. (2018). MicroRNA-206 Downregulation Improves Therapeutic Gene Expression and Motor Function in mdx Mice. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 12, 283-293. doi:10.1016/j.omtn.2018.05.011
- Butterfield, R. J. (2019). Congenital Muscular Dystrophy and Congenital Myopathy. *Continuum (Minneapolis, Minn)*, 25(6), 1640-1661. doi:10.1212/con.0000000000000792
- Cacchiarelli, D., Martone, J., Girardi, E., Cesana, M., Incitti, T., Morlando, M., . . . Bozzoni, I. (2010). MicroRNAs Involved in Molecular Circuitries Relevant for the Duchenne Muscular Dystrophy Pathogenesis Are Controlled by the Dystrophin/nNOS Pathway. *Cell Metabolism*, 12(4), 341-351. doi:10.1016/j.cmet.2010.07.008

- Carmen, L., Maria, V., Morales-Medina, J. C., Vallelunga, A., Palmieri, B., & Iannitti, T. (2019). Role of proteoglycans and glycosaminoglycans in Duchenne muscular dystrophy. *Glycobiology*, 29(2), 110-123. doi:10.1093/glycob/cwy058
- Chen, J.-F., Tao, Y., Li, J., Deng, Z., Yan, Z., Xiao, X., & Wang, D.-Z. (2010). microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *The Journal of Cell Biology*, 190(5), 867-879. doi:10.1083/jcb.200911036
- Comi, G. P., Niks, E. H., Cinnante, C. M., Kan, H. E., Vandenborne, K., Willcocks, R. J., . . . Bettica, P. U. (2022). Characterization of patients with Becker muscular dystrophy by histology, magnetic resonance imaging, function, and strength assessments. *Muscle & Nerve*, 65(3), 326-333. doi:10.1002/mus.27475
- Crist, C. G., Montarras, D., Pallafacchina, G., Rocancourt, D., Cumano, A., Conway, S. J., & Buckingham, M. (2009). Muscle stem cell behavior is modified by microRNA-27 regulation of Pax3 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(32), 13383-13387. doi:10.1073/pnas.0900210106
- Das, A., Das, A., Das, D., Abdelmohsen, K., & Panda, A. C. (2020). Circular RNAs in myogenesis. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 1863(4), 194372. doi:10.1016/j.bbagr.2019.02.011
- Day, K., Shefer, G., Richardson, J. B., Enikolopov, G., & Yablonka-Reuveni, Z. (2007). Nestin-GFP reporter expression defines the quiescent state of skeletal muscle satellite cells. *NIH*, 249-259. doi:DOI: 10.1016 / j.ydbio.2006.12.026
- Dey Bijan, K., Gagan, J., & Dutta, A. (2011). miR-206 and -486 Induce Myoblast Differentiation by Downregulating Pax7. *Molecular and Cellular Biology*, 31(1), 203-214. doi:10.1128/MCB.01009-10
- Duan, D., Goemans, N., Takeda, S. i., Mercuri, E., & Aartsma-Rus, A. (2021). Duchenne muscular dystrophy. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 13. doi:10.1038/s41572-021-00248-3
- Dumont, N. A., Bentzinger, C. F., Sincennes, M. C., & Rudnicki, M. A. (2015). Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Compr Physiol*, 5(3), 1027-1059. doi:10.1002/cphy.c140068
- Escobar-Cedillo, R. E., López-Hernández, L., Miranda-Duarte, A., Curiel-Leal, M. D., Suarez-Ocón, A., Sánchez-Chapul, L., . . . Gómez-Díaz, B. (2021). Genetic analysis of muscular dystrophies: our experience in Mexico. *Folia Neuropathol*, 59(3), 276-283. doi:10.5114/fn.2021.109426
- Feige, P., Brun, C. E., Ritso, M., & Rudnicki, M. A. (2018). Orienting Muscle Stem Cells for Regeneration in Homeostasis, Aging, and Disease. *Cell Stem Cell*, 23(5), 653-664. doi:10.1016/j.stem.2018.10.006
- Fukada, S.-i., Akimoto, T., & Sotiropoulos, A. (2020). Role of damage and management in muscle hypertrophy: Different behaviors of muscle stem cells in regeneration and hypertrophy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1867(9), 118742. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118742>



- Gagan, J., Dey, B. K., Layer, R., Yan, Z., & Dutta, A. (2011). MicroRNA-378 Targets the Myogenic Repressor MyoR during Myoblast Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(22), 19431-19438. doi:10.1074/jbc.m111.219006
- Galimov, A., Merry, T. L., Luca, E., Rushing, E. J., Mizbani, A., Turcekova, K., . . . Krutzfeldt, J. (2016). MicroRNA-29a in Adult Muscle Stem Cells Controls Skeletal Muscle Regeneration During Injury and Exercise Downstream of Fibroblast Growth Factor-2. *Stem Cells*, 34(3), 768-780. doi:10.1002/stem.2281
- Gochicoa-Rangel, L., Vargas, M. H., Alonso-Gómez, J. L., Rodríguez-Moreno, L., Martínez-Briseño, D., Baños-Mejía, O., & Torre-Bouscoulet, L. (2016). Respiratory impedance in patients with Duchenne muscular dystrophy: Respiratory Impedance in Duchenne Muscular Dystrophy. *Pediatric Pulmonology*, 51(10), 1072-1079. doi:10.1002/ppul.23434
- Grounds, M. D., Terrill, J. R., Al-Mshhdani, B. A., Duong, M. N., Radley-Crabb, H. G., & Arthur, P. G. (2020). Biomarkers for Duchenne muscular dystrophy: myonecrosis, inflammation and oxidative stress. *Disease models & mechanisms*, 13(2). doi:10.1242/dmm.043638
- Guglieri, M., Bushby, K., McDermott, M. P., Hart, K. A., Tawil, R., Martens, W. B., . . . Griggs, R. C. (2017). Developing Standardized Corticosteroid Treatment for Duchenne Muscular Dystrophy. *Contemporary clinical trials*, 58, 34-39. doi:10.1016/j.cct.2017.04.008
- Halevy, O., Piestun, Y., Allouh, M. Z., Rosser, B. W. C., Rinkevich, Y., Reshef, R., . . . Yablonka-Reuveni, Z. (2004). Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 231(3), 489-502. doi:10.1002/dvdy.20151
- Hernández Ramírez, P. (2006). Medicina regenerativa II: Aplicaciones, realidad y perspectivas de la terapia celular. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 22(1), 0-0. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0864-02892006000100002&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0864-02892006000100002&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- Hindi, S. M., & Kumar, A. (2016). TRAF6 regulates satellite stem cell self-renewal and function during regenerative myogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 126(1), 151-168. doi:10.1172/jci81655
- Hrach, H. C., & Mangone, M. (2019). miRNA Profiling for Early Detection and Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). doi:10.3390/ijms20184638
- Karthik, N., & Taneja, R. (2021). Histone variants in skeletal myogenesis. *Epigenetics*, 16(3), 243-262. doi:10.1080/15592294.2020.1795606
- Klimczak, A., Kozłowska, U., & Kurpisz, M. (2018). Muscle Stem/Progenitor Cells and Mesenchymal Stem Cells of Bone Marrow Origin for Skeletal Muscle Regeneration in Muscular Dystrophies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 66(5), 341-354. doi:10.1007/s00005-018-0509-7
- Kuang, S., Gillespie, M. A., & Rudnicki, M. A. (2008). Niche Regulation of Muscle Satellite Cell Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell*, 2(1), 22-31. doi:10.1016/j.stem.2007.12.012

- Lanza, G., Pino, M., Fisicaro, F., Vagli, C., Cantone, M., Pennisi, M., . . . Bellomo, M. (2020). Motor activity and Becker's muscular dystrophy: lights and shadows. *The Physician and Sportsmedicine*, 48(2), 151-160. doi:10.1080/00913847.2019.1684810
- LaPelusa, A., & Kentris, M. (2020). Muscular Dystrophy. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Lepper, C., Conway, S. J., & Fan, C. M. (2009). Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements. *Nature*, 460(7255), 627-631. doi:10.1038/nature08209
- Li, E. W., McKee-Muir, O. C., & Gilbert, P. M. (2018). Cellular Biomechanics in Skeletal Muscle Regeneration. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 126, pp. 125-176): Elsevier.
- Li, X., Li, Y., Zhao, L., Zhang, D., Yao, X., Zhang, H., . . . Ying, H. (2014). Circulating Muscle-specific miRNAs in Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 3(7), e177. doi:10.1038/mtna.2014.29
- Liu, N., Williams, A. H., Maxeiner, J. M., Bezprozvannaya, S., Shelton, J. M., Richardson, J. A., . . . Olson, E. N. (2012). microRNA-206 promotes skeletal muscle regeneration and delays progression of Duchenne muscular dystrophy in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 122(6), 2054-2065. doi:10.1172/jci62656
- Liu, W., Sheng, L., Nie, L., Wen, X., & Mo, X. (2020). Functional interaction between long non-coding RNA and microRNA in rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(12), e23489. doi:<https://doi.org/10.1002/jcla.23489>
- Lopez, J. R., Kolster, J., Zhang, R., & Adams, J. (2017). Increased constitutive nitric oxide production by whole body periodic acceleration ameliorates alterations in cardiomyocytes associated with utrophin/dystrophin deficiency. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 108, 149-157. doi:10.1016/j.yjmcc.2017.06.004
- Lozano-Velasco, E., Vallejo, D., Esteban, F. J., Doherty, C., Hernández-Torres, F., Franco, D., & Aránega, A. E. (2015). A Pitx2-MicroRNA Pathway Modulates Cell Proliferation in Myoblasts and Skeletal-Muscle Satellite Cells and Promotes Their Commitment to a Myogenic Cell Fate. *Mol Cell Biol*, 35(17), 2892-2909. doi:10.1128/mcb.00536-15
- Maggio, I., Chen, X., & Gonçalves, M. A. F. V. (2016). The emerging role of viral vectors as vehicles for DMD gene editing. *Genome Medicine*, 8. doi:10.1186/s13073-016-0316-x
- Mashinchian, O., Pisconti, A., Le Moal, E., & Bentzinger, C. F. (2018). The Muscle Stem Cell Niche in Health and Disease. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 126, pp. 23-65): Elsevier.
- Mohamed, J. S., Hajira, A., Lopez, M. A., & Boriek, A. M. (2015). Genome-wide Mechanosensitive MicroRNA (MechanomiR) Screen Uncovers Dysregulation of Their Regulatory Networks in the *mdm* Mouse Model of Muscular Dystrophy \*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(41), 24986-25011. doi:10.1074/jbc.M115.659375
- Morrison, B. M. (2016). Neuromuscular Diseases. *Semin Neurol*, 36(5), 409-418. doi:10.1055/s-0036-1586263

- Nagata, Y., Partridge, T. A., Matsuda, R., & Zammit, P. S. (2006). Entry of muscle satellite cells into the cell cycle requires sphingolipid signaling. *J Cell Biol*, 174(2), 245-253. doi:10.1083/jcb.200605028
- Nakamura, A., & Takeda, S. (2011). Mammalian models of Duchenne Muscular Dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 184393. doi:10.1155/2011/184393
- Nie, M., Liu, J., Yang, Q., Seok, H. Y., Hu, X., Deng, Z. L., & Wang, D. Z. (2016). MicroRNA-155 facilitates skeletal muscle regeneration by balancing pro- and anti-inflammatory macrophages. *Cell Death & Disease*, 7, 14. doi:10.1038/cddis.2016.165
- Pelosi, L., Coggi, A., Forcina, L., & Musaro, A. (2015). MicroRNAs modulated by local mIGF-1 expression in mdx dystrophic mice. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7, 11. doi:10.3389/fnagi.2015.00069
- Perry, M. M., & Muntoni, F. (2016). Noncoding RNAs and Duchenne muscular dystrophy. *Epigenomics*, 8(11), 1527-1537. doi:10.2217/epi-2016-0088
- Pietraszek-Gremplewicz, K., Kozakowska, M., Bronisz-Budzynska, I., Ciesla, M., Mucha, O., Podkalicka, P., . . . Dulak, J. (2018). Heme Oxygenase-1 Influences Satellite Cells and Progression of Duchenne Muscular Dystrophy in Mice. *Antioxidants & Redox Signaling*, 29(2), 128-148. doi:10.1089/ars.2017.7435
- Przanowska, R. K., Sobierajska, E., Su, Z., Jensen, K., Przanowski, P., Nagdas, S., . . . Dutta, A. (2020). miR-206 family is important for mitochondrial and muscle function, but not essential for myogenesis in vitro. *The FASEB Journal*, 34(6), 7687-7702. doi:<https://doi.org/10.1096/fj.201902855RR>
- Reynolds, E. H., & Broussolle, E. (2018). Allbutt of Leeds and Duchenne de Boulogne: Newly discovered insights on Duchenne by a British neuropsychiatrist. *Rev Neurol (Paris)*, 174(5), 308-312. doi:10.1016/j.neurol.2017.07.012
- Roberts, T. C., Blomberg, K. E. M., McClorey, G., Andaloussi, S. E., Godfrey, C., Betts, C., . . . Wood, M. J. (2012). Expression Analysis in Multiple Muscle Groups and Serum Reveals Complexity in the MicroRNA Transcriptome of the mdx Mouse with Implications for Therapy. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 1(8), e39. doi:10.1038/mtna.2012.26
- Rodríguez-Cruz, M., Atilano-Miguel, S., Barbosa-Cortés, L., Bernabé-García, M., Almeida-Becerril, T., Cárdenas-Conejo, A., . . . Maldonado-Hernández, J. (2019). Evidence of muscle loss delay and improvement of hyperinsulinemia and insulin resistance in Duchenne muscular dystrophy supplemented with omega-3 fatty acids: A randomized study. *Clinical Nutrition*, 38(5), 2087-2097. doi:10.1016/j.clnu.2018.10.017
- Salant, G. M., Tat, K. L., Goodrich, J. A., & Kugel, J. F. (2020). miR-206 knockout shows it is critical for myogenesis and directly regulates newly identified target mRNAs. *RNA Biology*, 17(7), 956-965. doi:10.1080/15476286.2020.1737443
- Sanson, M., Vu Hong, A., Massourides, E., Bourg, N., Suel, L., Amor, F., . . . Israeli, D. (2020). miR-379 links glucocorticoid treatment with mitochondrial response in Duchenne muscular dystrophy. *Scientific Reports*, 10(1), 9139. doi:10.1038/s41598-020-66016-7

- Seale, P., Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., & Rudnicki, M. A. (2000). Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. *Cell Press* 102, 777-786.
- Shi, D. L., & Grifone, R. (2021). RNA-Binding Proteins in the Post-transcriptional Control of Skeletal Muscle Development, Regeneration and Disease. *Front Cell Dev Biol*, 9, 738978. doi:10.3389/fcell.2021.738978
- Stedman, H. H., Sweeney, H. L., Shrager, J. B., Maguire, H. C., Panettieri, R. A., Petrof, B., . . . Kelly, A. M. (1991). The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, 352(6335), 536-539. doi:10.1038/352536a0
- Sun, C., Shen, L., Zhang, Z., & Xie, X. (2020). Therapeutic Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy: An Update. *Genes (Basel)*, 11(8). doi:10.3390/genes11080837
- Szigyarto, C. A.-K., & Spitali, P. (2018). Biomarkers of Duchenne muscular dystrophy: current findings. *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease*, 8, 1-13. doi:10.2147/DNND.S121099
- Taetzsch, T., Shapiro, D., Eldosougi, R., Myers, T., Settlage, R. E., & Valdez, G. (2021). The microRNA miR-133b functions to slow Duchenne muscular dystrophy pathogenesis. *Journal of Physiology-London*, 599(1), 171-192. doi:10.1113/jp280405
- Thada, P. K., Bhandari, J., & Umapathi, K. K. (2020). Becker Muscular Dystrophy. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Wang, Y. X., & Rudnicki, M. A. (2012). Satellite cells, the engines of muscle repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(2), 127-133. doi:10.1038/nrm3265
- Yamane, A., Akutsu, S., Diekwisch, T. G., & Matsuda, R. (2005). Satellite cells and utrophin are not directly correlated with the degree of skeletal muscle damage in mdx mice. *Am J Physiol Cell Physiol*, 289(1), C42-48. doi:10.1152/ajpcell.00577.2004
- Zammit, P. S., Golding, J. P., Nagata, Y., Hudon, V., Partridge, T. A., & Beauchamp, J. R. (2004). Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol*, 166(3), 347-357. doi:10.1083/jcb.200312007



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00244

Matrícula: 2193801644

Estudio de la asociación entre el perfil de expresión de MicroRNAs con la capacidad de regeneración de las células satélite durante las distrofias musculares Duchenne y Becker.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 1 del mes de agosto del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. GUADALUPE DIAZ ROSAS  
DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA  
DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO  
DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: JACQUELINE MOLINA OSORIO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:


APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



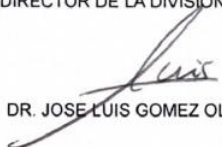
JACQUELINE MOLINA OSORIO  
ALUMNA

REVISÓ




MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS



DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA



DRA. GUADALUPE DIAZ ROSAS

VOCAL



DRA. ROXANA URI MIRANDA LABRA

VOCAL



DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO

SECRETARIO



DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ