

Evaluación de la acción terapéutica de células madre en la Distrofia Muscular de Duchenne, Salto-Uruguay, 2017.

INSTITUCIÓN:

Polo de Desarrollo Universitario en Biofísicoquímica, CENUR Litoral Norte, sede Salto.

ORIENTADORES:

Prof. Dr. R. Daniel Peluffo

Prof. Adj. Ana G. Sánchez

INTEGRANTES:

Br. Keril Gianoni

Br. Angelina Grassi

Br. Jonatan Marchetti

Br. Agustín Martínez

Br. Erica Rodríguez

Br. Macarena Soto

Br. Valentina Vargas

Ciclo de Metodología II, 2017.

Grupo 101.

ÍNDICE

Resumen.....	3
Introducción.....	4
Marco Teórico.....	5
Objetivos.....	9
Resultados.....	10
Discusión y Sumario.....	15
Perspectivas.....	16
Bibliografía.....	17

Evaluación de la acción terapéutica de células madre en la Distrofia Muscular de Duchenne, Salto-Uruguay, 2017.

RESUMEN

La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva ligada al cromosoma X, la cual afecta en su mayoría a individuos del sexo masculino.

Esta alteración conlleva a una deficiencia de distrofina, una proteína estructural que forma parte de un complejo molecular presente en el sarcolema, que tiene entre sus diferentes funciones ofrecer un sitio de anclaje a la enzima óxido nítrico sintasa neuronal para su correcta actividad enzimática. La ausencia de distrofina determina entonces la insuficiente producción de óxido nítrico (NO). En esta patología se ve afectado el tejido muscular estriado, lo que genera atrofia en el músculo esquelético y miocardiopatía dilatada, siendo esta última la principal causa de muerte temprana en estos pacientes.

Hasta el día de hoy no existen tratamientos eficaces para DMD. Sin embargo recientes investigaciones científicas, que involucran el uso de células madre embrionarias e inducibles en modelos murinos parecen promisorias.

En la presente revisión discutiremos los beneficios del uso terapéutico de células madre en la progresión de la DMD.

Palabras clave: Distrofia muscular de Duchenne. Distrofina. Óxido nítrico sintasa. Fibrosis muscular. Miocardiopatía dilatada. Células madre.

INTRODUCCIÓN

La distrofia muscular de Duchenne es la enfermedad neuromuscular degenerativa más frecuente que afecta en su mayoría a varones, estando ligada al cromosoma X, siendo las mujeres fundamentalmente transmisoras de la enfermedad. Su mecanismo etiopatogénico reside en el déficit de distrofina, una proteína de fundamental importancia funcional y estructural, por ejemplo, en la producción de NO y en la estabilización de la membrana plasmática miocítica, durante la contracción del músculo estriado (1).

La utrofina es una proteína de similares características estructurales que es transcrita en la vida fetal, la cual compensaría la falta de distrofina en las primeras etapas de la vida de pacientes con DMD (2,3).

La distrofina pertenece a un complejo molecular involucrado en la estabilidad del citoesqueleto y es el anclaje de la NOS, una enzima crucial para la producción de óxido nítrico, por lo cual la ausencia de distrofina determinaría una mala función de este complejo y la incapacidad de captar la NOS en el sarcolema, con la consiguiente deficiencia en la producción de NO (4,5). Este proceso y las características de este complejo, que competen al conocimiento del mecanismo de desarrollo de la DMD, serán descritos con mayor detalle más adelante.

Como mencionamos anteriormente el tejido blanco de dicha enfermedad es el tejido muscular estriado, tanto esquelético como cardíaco (1), lo cual nos explica el porqué de los principales deterioros de la calidad de vida en estos pacientes, como la pérdida de la deambulación temprana, y lo que resulta más importante, la causa de muerte de los mismos, que apunta al desarrollo de una insuficiencia cardíaca progresiva que resulta mortal al final de la adolescencia (3).

En la mayoría de los estudios, el principal interés en conocer las causas de fallecimiento, sería el desarrollo de una terapéutica que mejore la morbimortalidad en los afectados por DMD. Debido a los múltiples avances tecnológicos y científicos, numerosos estudios han apuntado a las células madre como principales candidatas para este fin, demostrando progresos en los resultados obtenidos, aunque hasta ahora no se han logrado resultados concluyentes de su eficacia como potencial terapéutico.

MARCO TEÓRICO

La mutación en la DMD se encuentra ligada al brazo corto del cromosoma X, afectando a 1 en 3500 varones (1). Esta enfermedad ocurre debido a la mutación en el gen que codifica para distrofina generando una deficiencia en la síntesis de la misma. Esta es una proteína en forma de red de 400 kDa perteneciente a la superfamilia de proteínas β -espectrinas/ α -actinas (2,3). Su principal función es mecánica, uniendo elementos del citoesqueleto con la membrana celular, estabilizando así el sarcolema durante el tiempo de contracción mantenida de la fibra muscular. Esto permite la recuperación de la forma del miocito, dejando en claro el blanco tisular de la distrofina: el tejido muscular esquelético en sus dos variedades, estriado y cardíaco (3).

En los primeros años de vida, los pacientes que desarrollan la enfermedad se ven beneficiados por la acción de una proteína similar a la distrofina que compensa en cierta medida la falta de la misma, la utrofina. Esto se debe a que ambas proteínas presentan similitudes funcionales y estructurales (Fig. 1). Se ha descrito que durante el desarrollo del músculo fetal humano la utrofina se expresa en el sarcolema antes que la distrofina, disminuyendo sus niveles gradualmente en individuos normales a medida que aumenta la expresión de esta última, excepto en los pacientes con DMD en los que la utrofina se encuentra elevada posiblemente como método compensatorio a la falta de distrofina (6).

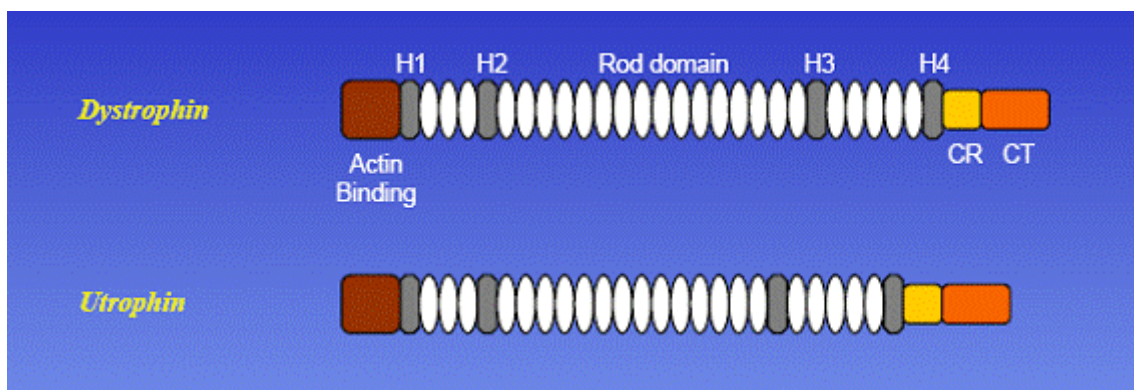


Fig. 1: Estructura molecular de distrofina y utrofina. Se observa la gran similitud estructural entre ambas proteínas. Imagen extraída de ref. 6

La distrofina se encuentra formando un complejo molecular en el citoesqueleto dentro del cual cumple su función. Este complejo asociado a distrofina/utrofina está formado por proteínas membranales y citoplasmáticas organizadas estructuralmente en 3 sub-complejos: sub-complejo distroglicano (Dg), sub-complejo sarcoglicano (Sg), el sub-complejo distrofina (Dp) y otras proteínas asociadas al citoesqueleto (Fig. 2). Estos complejos proteicos mantienen la estabilidad en los procesos de contracción y relajación muscular, así como

también están involucrados en mecanismos de señalización celular (5,6). La ausencia de distrofina desestabiliza este complejo dando lugar a la falla de su función, derivando en distintos tipos de distrofias musculares esqueléticas y miocárdicas, así como sucede en la DMD, como explicaremos posteriormente (2).

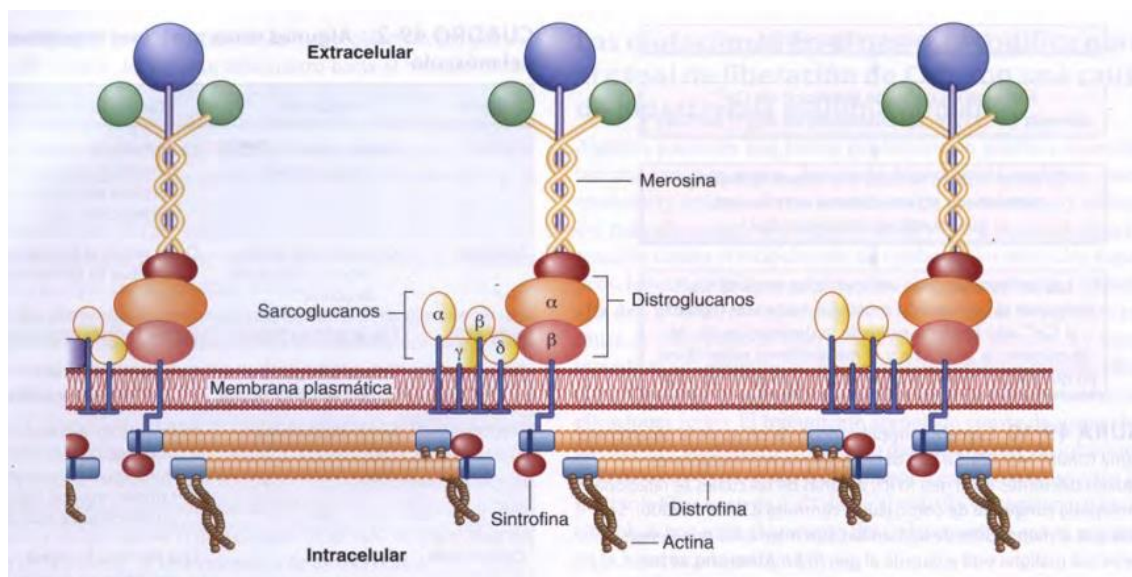


Fig. 2 Organización de la distrofina y demás proteínas que forman los complejos en relación a la membrana plasmática.

En la imagen se observa como la distrofina forma parte de un gran complejo relacionado a otros complejos proteínicos. El complejo de distroglicano se forma por un α -distroglicano que se asocia a merosina (proteína de la lamina basal), que une distroglicano y distrofina, mientras que la sintrofina se une al carboxilo terminal de la distrofina. Imagen extraída de ref. 2.

Como mencionamos anteriormente, además de proveer estabilización mecánica, el complejo distrofina-glicoproteínas (CGD) es responsable de reclutar la isoforma neuronal de la NOS en su estado funcional (4,5). La NOS es una enzima compuesta por dos subunidades, una con actividad oxigenasa y otra con actividad reductasa, de la cual existen al menos tres isoformas, dos de ellas constitutivas como lo son la endotelial (eNOS) y la neuronal (nNOS), y una inducible (iNOS). Las tres utilizan como sustrato la L-arginina, oxígeno y NADPH; como cofactores flavin mononucleotido (FMN), flavin adenina dinucleotido (FAD), tetra hidro biopterina (BH4) y en las isoformas constitutivas, un complejo calcio-calmodulina (Ca-CAM), dando como productos finales el óxido nítrico y citrulina (3,7) (Fig. 3).

La nNOS se expresa principalmente en neuronas pero también en varios tejidos de origen no neuronal, siendo de importancia en este caso su participación en el miocito (8), localizándose en el citosol y en el retículo sarcoplásmico de estas células.

La isoforma inducible se encuentra principalmente en el citosol de algunas células que participan en la respuesta inmune (9), como macrófagos y neutrófilos (10). La eNOS se localiza sobre todo en la membrana de células

endoteliales de vasos sanguíneos (11), en el citosol de los macrófagos y en el subsarcolemma de los miocitos (12).

En los cardiomiocitos, el NO es generado por las tres isoformas de la NOS (13-15). Para que el NO pueda ejercer sus múltiples acciones cardíacas, las distintas NOS se expresan en determinados micro dominios celulares y sintetizan NO en la proximidad de su vía de señalización celular (13-16). Ello optimiza el radio de difusión del NO en los cardiomiocitos, evita su inactivación por radicales libres y mioglobina, a la vez que aumenta su disponibilidad.

El NO producido desempeña un papel fundamental en la función electromecánica en respuesta a la estimulación de los receptores adrenérgicos cardíacos, y regula a su vez la respuesta vegetativa potenciando el tono parasimpático e inhibiendo el simpático (17). Otra de las funciones cruciales del NO es su participación cardioprotectora en el miocardio isquémico, por sus acciones vasodilatadoras, antitrombóticas y la más importante de todas, su papel en la fase tardía del disociamiento isquémico (18, 19). En un miocardio insuficiente, hecho común en los pacientes con DMD, la inducción de la iNOS contribuye en gran forma a disminuir los efectos cardiotóxicos de las catecolaminas producidas por la estimulación de los receptores β_1 y β_2 adrenérgicos (20, 21).

A nivel intracelular el NO activa la guanilciclase soluble, produciendo un cambio conformacional en el sitio catalítico de esta enzima, que permite la conversión de guanosina 5-trifosfato a guanosina 3,5- monofosfato cíclica (GMPc), aumentando los niveles de este importante segundo mensajero hasta 100 veces (22-25), reduciendo la cantidad de calcio intracelular y permitiendo la relajación muscular mediada por proteínquinasas dependientes de GMPc. Cabe destacar que el mismo NO modula su propia producción mediante el control del transporte de L- arginina (26)

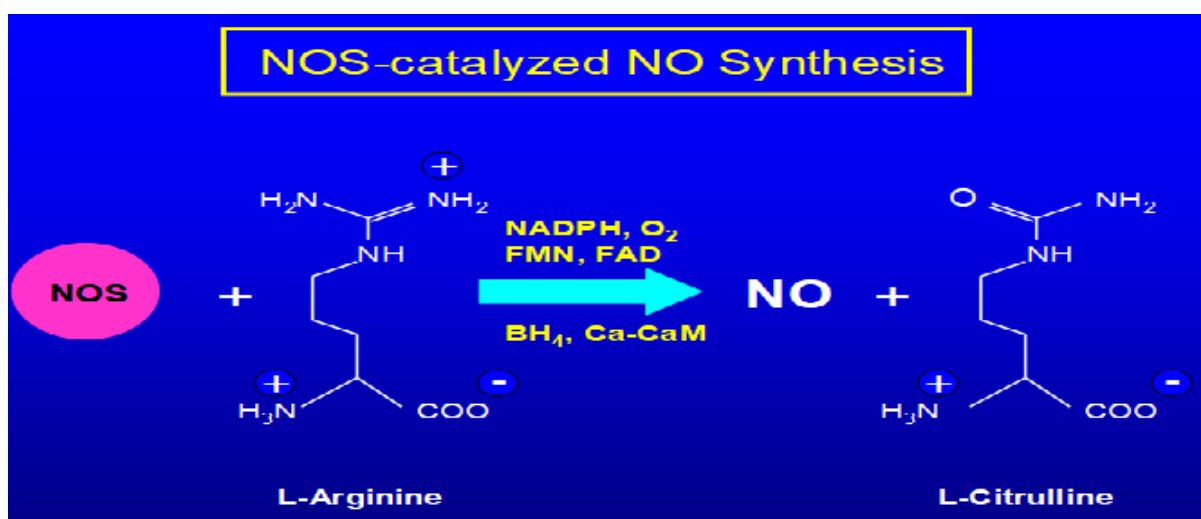


Fig. 3: Acción enzimática de la óxido nítrico sintasa. Conversión de L-arginina a NO y citrulina, mediada por la NOS y sus cofactores. (R. Daniel Peluffo – Material inédito)

Por lo visto hasta ahora en la DMD, la ausencia de distrofina en el complejo dificultaría el correcto reclutamiento de la NOS, la cual verá afectada su actividad enzimática mientras sus niveles de expresión se ven inalterados, dando como resultado final la disminución en la producción de NO (5). Hemos descrito que el NO participa en la relajación de músculo liso y estriado, por lo que su producción disminuida determina la caída del flujo sanguíneo a nivel de la vascularización cardíaca y esquelética (17-19).

En el tejido muscular esquelético, la isquemia conduce a una ruptura progresiva de las fibras musculares que serán reemplazadas por tejido conectivo, dando lugar a la fibrosis con la consecuente debilidad y atrofia muscular. Esto determina que los enfermos por DMD pierdan la deambulación y utilicen silla de ruedas antes de los 12 años, ya que es una enfermedad que suele comenzar a manifestarse a los 3 años de vida (27).

A nivel del tejido muscular cardíaco, dicha falta de NO genera un proceso similar. La isquemia, junto a las alteraciones del ciclo cardíaco (inotropismo y cronotropismo), genera una disfunción sistólica progresiva, es decir una falla en la eyección de sangre oxigenada debido al déficit muscular miocárdico, en la cual están involucrados mecanismos de fibrosis, inflamación y remodelación miocárdica, dando lugar a una miocardiopatía dilatada. Entendemos como miocardiopatía a las afecciones difusas del miocardio las cuales alteran la función ventricular constituyendo un grupo heterogéneo de etiologías muy diversas, frecuentemente de causas genéticas. Como mencionamos anteriormente la principal alteración es en el ciclo cardíaco durante la sístole ventricular, por lo que hablamos de una miocardiopatía dilatada (28).

Esta patología se manifiesta clínicamente por síntomas y signos de insuficiencia cardíaca (disnea, fatiga, ingurgitación yugular, hepatomegalia, edemas, etc.), arritmias auriculares o ventriculares, síncope, ictus cerebral embólico, muerte súbita, etc.

Como consecuencia de esta severa patología las personas afectadas por DMD mueren en su gran mayoría por insuficiencia cardíaca, y en segundo lugar por falla respiratoria a edades muy tempranas, por lo general antes de los 20 años (27, 28).

OBJETIVOS:

Objetivo general:

- Evaluar críticamente el estado del conocimiento de la acción terapéutica de las células madre en pacientes con Distrofia Muscular de Duchenne.

Objetivos específicos:

- Discutir la asociación entre la miocardiopatía y la distrofina en la Distrofia muscular de Duchenne.
- Estudiar el efecto de las células madre a nivel de otros tejidos del organismo.
- Comparar los resultados realizados en abordajes terapéuticos que utilizan diferentes tipos de células madre.

RESULTADOS

El abordaje terapéutico de la DMD incluye una variedad de terapias génicas y enfoques farmacológicos. Sin embargo en los últimos años se han realizado investigaciones y experimentos con células madre por su gran potencial en enfermedades de naturaleza degenerativa. Las células madre se han definido como células clonogénicas capaces de autorrenovarse y diferenciarse en múltiples líneas celulares (29, 30). Se plantea que a partir de estas células se reemplazarían las fibras musculares que se pierden en la progresión de la DMD (31).

En las últimas investigaciones, las células madre con potencial de diferenciación se obtuvieron a partir de la aorta de ratones sanos y se inyectaron en ratones mdx (ratones con mutaciones inducidas en el cromosoma X que no expresan distrofina) (38), las cuales son mesangioblastos. Estas son células multipotenciales originadas a partir del mesodermo que cuentan con la capacidad de diferenciarse en varios tipos de células mesenquimales, como células musculares lisas, y estriadas cardíacas y esqueléticas (32, 33).

La función de los mesangioblastos sería la regeneración de las fibras musculares afectadas a partir de la proliferación, formación y reparación de las mismas, lo que a su vez conllevaría un aumento de la concentración de estas fibras (34).

También promoverían la expresión de proteínas específicas del músculo, lo cual contribuye a la formación de sus fibras. Clínicamente esto se manifiesta con un aumento en la movilidad y función muscular (35).

Entre la bibliografía relevada seleccionamos la investigación: **“Efficacy of fetal stem cells in Duchenne muscular dystrophy therapy”** propuesto por Sych N et al. en 2013. (ref. 36) Este estudio evalúa el impacto de la terapia de células madre fetales (FSC) en individuos con DMD, buscando como resultado posibles efectos beneficiosos en la calidad de vida de estos pacientes y en el pronóstico funcional de los mismos.

La metodología se basó en suspensiones que contienen células madre hematopoyéticas hepáticas y nerviosas cerebrales, obtenidas de fetos humanos de 5-9 semanas de edad, aplicándose dicha intervención a pacientes con DMD.

En el grupo de estudio se obtuvo mejoras neurológicas las cuales fueron evaluadas con la Escala de Brooke, la misma evalúa la capacidad funcional de las extremidades superiores en niños con DMD y atrofia del músculo espinal. En cuanto a la calidad de vida hubo avances en la capacidad física y en la salud mental, la cual engloba el rol emocional, social y espiritual de los mismos (Fig. 4)

Antes de someterse al estudio, los pacientes con DMD, tenían alteraciones del ritmo en el electrocardiograma, tales como: taquicardia sinusal, extrasístoles

auriculares y ventriculares, bloqueos aurículoventriculares evidenciados por acortamientos de intervalos PQ y elementos de isquemia como ondas T negativas y depresión del segmento ST. Luego de la intervención se evidenció aumento de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y reducción de la precarga (volumen diastólico final).

En lo que respecta a la función y ventilación respiratoria se logró un aumento en la capacidad vital forzada y en el volumen espiratorio forzado en el primer minuto.

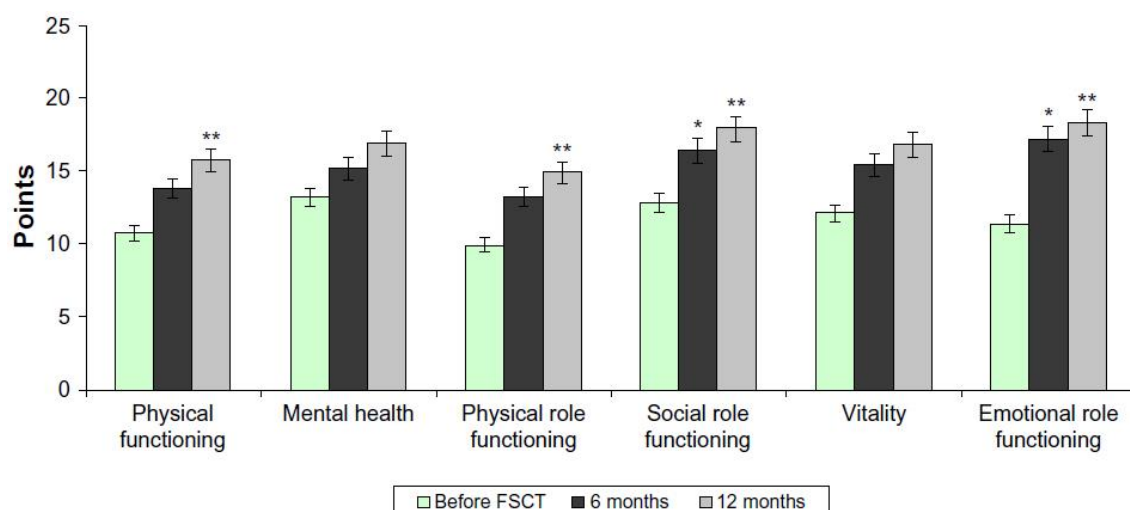


Fig. 4. Calidad de vida en el grupo de estudio a los 6 y 12 meses luego de la aplicación de FSC. Nótese las mejoras significativas (** $p < 0.01$) en el funcionamiento físico, emocional y social respecto del grupo control. Figura extraída de ref. 35.

Podemos concluir que se observaron grandes mejoras a nivel de la capacidad funcional, sistema cardiorespiratorio y calidad de vida. Por lo tanto afirmamos la eficacia de las células madre fetales como alternativa terapéutica en la DMD.

Las FSC han demostrado gran potencial expansivo y proliferativo, inmunogenicidad más baja, fenotipo más estable, grandes efectos inmunomoduladores, menor senescencia y mayor eficacia terapéutica. Se plantea entonces la opción de utilizarlas como terapia teniendo en cuenta otro tejido blanco, como puede ser el estriado en su variedad cardíaca, realizando una intervención directa a pesar de tener presente el carácter invasivo de dicha metodología.

En la revisión: “**Perspectives of stem cell therapy in Duchenne muscular dystrophy**” propuesto por Mirella Meregalli et al. en 2013 (ref. 37), se describen los diferentes tipos de células madre miogénicas y su posible uso para disminuir la progresión en la DMD.

Los autores observaron grandes dificultades en cuanto a la supervivencia y migración de estas células desde el sitio de inyección al tejido muscular afectado.

Doherty et al. (ref. 98 dentro de ref. 37) demostraron que los pericitos, los cuales forman parte del endotelio, tienen carácter multipotencial, ya que se

diferencian en varios linajes celulares y participan en la regeneración miogénica.

Skuk et al. (ref. 101 dentro de ref. 37) evaluaron la seguridad, eficacia y efectos adversos que pueden proporcionar las células madre en la reconstrucción del músculo esquelético. En lo que respecta a la seguridad hicieron hincapié en evitar el rechazo del injerto inmunológico. Para obtener mayor eficacia consideraron combinar la terapia de dichas células con terapia génica o farmacológica, para disminuir el riesgo inmunitario anteriormente mencionado.

Van Deutekom et al. (ref. 104 dentro de ref. 37) sugieren que una única inyección intramuscular de mioblastos y derivados musculares en dicha enfermedad podría ser eficaz y segura, mientras los autores de la presente revisión, Meregalli et al. proponen la inyección intraarterial de las células madre propias del paciente para tratar las enfermedades musculares degenerativas, como sucede en DMD.

También agregan que la distribución sistémica intraarterial de las células madre sería la manera más conveniente para que logren acceder a todos los músculos del organismo. En lo que concierne a las estrategias terapéuticas, afirman que es necesario incrementar la proliferación y capacidad de migración de dichas células, y a su vez tener un perfil de seguridad en los procedimientos de terapias que realizan modificaciones genéticas.

En la investigación **“Injection of Vessel-Derived Stem Cells Prevents Dilated Cardiomyopathy and Promotes Angiogenesis and Endogenous Cardiac Stem Cell Proliferation in mdx/utrn $-/-$ but not aged mdx mouse models for Duchenne Muscular Dystrophy”** publicada por Ju Lan Chun et al, 2012 (ref. 38), plantean que los mesangioblastos son capaces de regenerar la distrofina, y en cuanto a la función cardíaca, sugieren que en casos donde se desarrolló miocardiopatía dilatada existe una disminución y alivio de la sintomatología, mientras que en los que aún no se manifestó, dichas células madre presentan el suficiente potencial como para prevenir la remodelación cardíaca en pacientes con DMD.

La metodología utilizada se basó en la inyección de mesangioblastos derivados de la aorta en el ventrículo izquierdo de ratones mdx/utrn $-/-$ y en mdx/utrn $+/-$ en comparación con un grupo control. Los resultados y datos fueron analizados mediante inmuno-histoquímica, ingeniería genética y ecocardiogramas seriados para evaluar la función cardíaca, antes y después del trasplante de células madre.

En cuanto a los resultados podemos destacar que los mesangioblastos lograron diferenciarse en cardiomiocitos y expresaron in vitro marcadores cardíacos y proteínas como: tropomiosina, troponina I y la α actinina.

En el ecocardiograma no se observaron cambios significativos a nivel del grosor del ventrículo izquierdo o tabique interventricular, tampoco en la dilatación ventricular ni en la fracción de eyección. En lo que respecta al volumen diastólico final o precarga y contracción ventricular, en ratones mdx/utrn $-/-$ tampoco se encontraron cambios respecto del control.

Por lo tanto el trasplante de mesangioblastos retrasa el desarrollo de miocardiopatía dilatada.

En cuanto a la restauración de la distrofina se logró observar un aumento en su expresión a nivel del músculo cardíaco en ratones mdx/utrn^{-/-} luego del trasplante de los mesangioblastos, acompañado de un incremento de la angiogénesis (Fig. 5).

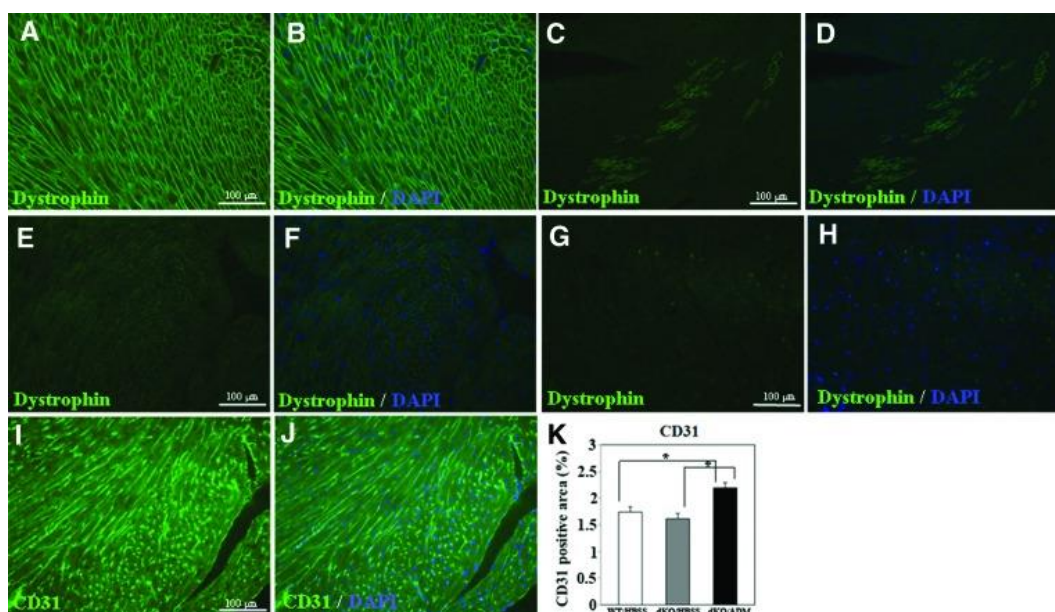


Fig. 5. Expresión de distrofina y angiogénesis en el músculo cardíaco de ratones mdx / utrⁿ -/- inyectados con mesangioblastos. Microscopía fluorescente se utilizó para analizar la expresión de distrofina y CD31 en los corazones control, mdx / utrⁿ -/-, y ratones mdx tras el trasplante de células o la inyección de solución salina. (A, B): Se usaron ratones control con inyección de solución salina como control positivo para la expresión de proteína de distrofina (verde). (C, D): Se detectó distrofina en algunas células del miocardio de ratones mdx / utrⁿ -/- tras la inyección de mesangioblastos derivados de la aorta (n = 5). (E, F): No se detectó distrofina en ratones mdx / utrⁿ -/- inyectados con solución salina (n = 4). (G, H): La distrofina no se detectó en el miocardio de ratones mdx después de la inyección de mesangioblastos derivados de aorta (ADM) (n = 4). (I-K): CD31 (verde), un marcador de células endoteliales, se detectó por microscopía inmunofluorescente y se cuantificó en todos los grupos de ratones. (A, C, E, G): Distrofina (verde). (B, D, F, H): Imágenes fusionadas de distrofina (verde) y DAPI (azul). (I, J): Imagen representativa de CD31 en miocardio control. (K): El análisis cuantitativo de la expresión de CD31 reveló una mayor expresión de CD31 en miocardio mdx / utrⁿ -/- inyectado con ADM que en miocardio mdx / utrⁿ -/- inyectado con solución salina o en ratones control pareados de edad inyectados con solución salina. Diferencia estadísticamente significativa (p < 0,05) entre los grupos indicados.

Por último se demostró una menor respuesta en ratones mdx ancianos con respecto a los más jóvenes, principalmente en lo que concierne a la función y remodelación cardíaca, con disminución del volumen diastólico final y aumento de la dilatación ventricular.

Lo mencionado anteriormente se explica por ausencia de expresión de la distrofina y la disminución de la angiogénesis, luego del trasplante de mesangioblastos en ratones mdx ancianos.

Cabe resaltar que además presentaron una supervivencia menor, encontrándose en etapas avanzadas de la enfermedad y con daños cardiovasculares irreversibles.

A partir de estos resultados los investigadores concluyeron que la inyección de mesangioblastos fue exitosa en ratones mdx jóvenes, debido a que se produjo expresión de distrofina a nivel del musculo cardiaco.

Además se obtuvieron beneficios funcionales en el corazón, mediante diferentes mecanismos como la inducción y estimulación de la angiogénesis y la proliferación celular, retrasando el desarrollo de la miocardiopatía dilatada.

Pero los ratones mdx que se encuentran en etapas avanzadas de la DMD y tienen instaurada la remodelación cardiaca, no mostraron beneficios ni retrasos en la misma. Teniendo en cuenta esto creemos conveniente comenzar precozmente con estudios diagnósticos de forma periódica, como por ejemplo electrocardiograma, ecocardiograma y radiografía de tórax, entre otros, para lograr detectar cambios y alteraciones en el miocardio, y a su vez en las otras capas cardíacas.

Ya que la DMD es una enfermedad hereditaria, con un patrón de herencia de tipo recesivo, opinamos que para el diagnóstico precoz sería conveniente indagar, desde la consulta obstétrica, si algún familiar posee la enfermedad, y así poder realizar los estudios convenientes desde el momento del nacimiento, para un adecuado seguimiento y tratamiento.

Consideramos que las investigaciones posteriores comiencen a incluir terapias dirigidas a prevenir y disminuir manifestaciones respiratorias, debido a que en etapas avanzadas de la DMD se produce insuficiencia respiratoria, lo cual contribuye a la morbimortalidad de estos pacientes.

SUMARIO Y DISCUSIÓN

- El tratamiento de la DMD actualmente presenta un abordaje multimodal, incluyendo terapias genéticas y tratamientos farmacológicos asociados o no a terapias con células madre.
- Los mesangioblastos extraídos de la aorta inyectados en ratones mdx presentaron carácter multipotencial promoviendo la proliferación y regeneración en múltiples tejidos, principalmente en el tejido muscular estriado cardíaco y esquelético, por lo que podrían demostrar beneficios en la progresión de la enfermedad.
- Al inyectarse en el tejido muscular cardíaco, los mesangioblastos, promueven la angiogénesis y la expresión de proteínas cardíacas junto con la distrofina.
- La inyección intraarterial es otra forma de administración de mesangioblastos, dando lugar a una distribución sistémica de las células, abarcando toda la musculatura afectada del organismo.
- Las células madre fetales pueden considerarse como opción terapéutica, ya que ofrecieron una mejoría en la capacidad funcional a nivel del sistema cardiorrespiratorio, es decir en cuanto a la miocardiopatía dilatada e insuficiencia respiratoria; y también en el musculo esquelético, determinando así un cambio positivo en la calidad de vida.
- Cuando ya se desarrolló miocardiopatía dilatada, la terapia con células madre no resulta eficiente.
- La terapia con células madre, hoy día y claramente a futuro, es un procedimiento terapéutico muy prometedor. Ha demostrado muchos beneficios y ventajas, ya mencionados anteriormente, pero aún no se ha podido profundizar en ciertos aspectos como la miocardiopatía dilatada e insuficiencia respiratoria, las cuales son las causas de muerte. Por lo tanto queda mucho por avanzar, analizar y descubrir sobre el tema.

PERSPECTIVAS

Como hemos descripto y analizado en detalle, las células madre parecen ser candidatas al tratamiento definitivo de la DMD. El hecho de que hasta el día de hoy haya varios estudios experimentales y revisiones respecto al tema demuestra el interés en este tipo de aproximación terapéutica. Se avanza en corregir imperfecciones para lograr que este sea un tratamiento efectivo. Sin embargo no descartamos la posibilidad de que este no sea realmente el camino a seguir.

Aunque las células madre, especialmente las mesangioblasticas, han demostrado resultados promisorios a la hora de ser puestas a pruebas en ratones mdx, quedan aún muchos errores por ser resueltos y muchas preguntas por responder.

Pero detengámonos un minuto a preguntarnos acerca de la información ofrecida y a la atención que le han dado los investigadores al objetivo experimental con células madre. A cualquier lector le debe haber llamado la atención el hecho de que la amplia mayoría o casi todos los estudios tienen como objetivo, el tejido muscular esquelético. Siendo que hemos analizado y existen suficientes evidencias que la causa de muerte en los pacientes con DMD es en realidad cardiorrespiratoria. Entonces nos preguntamos: ¿qué lleva a los investigadores a estudiar el efecto terapéutico en el tejido muscular esquelético en tan amplia mayoría respecto al cardíaco? Tal vez estamos pasando por alto algo que demuestre que en caso de encontrar efectividad en el tejido esquelético también lo encontremos en el cardíaco, pero se sabe que estos tejidos que comparten similitudes histológicas, también presentan sus diferencias ¿Qué sucedería si el tejido muscular estriado cardíaco en experimentos y/o investigaciones no responde de igual forma? Llama la atención que estamos frente a tejidos con semejanzas pero con diferente respuesta al tratamiento. Ante esta situación debemos ser fehacientes de que la medicina no es una ciencia exacta, más aún si nuestro objetivo involucra seres humanos. Afirmando lo anterior existen diferentes tratamientos que al aplicarlos en un mismo tejido pueden variar de una persona a otra.

En cuanto a la miocardiopatía dilatada, es importante indagar porque no existen mejorías estructurales y funcionales con terapias de células madre en etapas avanzadas de la DMD donde ya se instauró la remodelación cardíaca.

En un futuro se podrían investigar terapias génicas como elección terapéutica, las cuales pueden ser una opción prometedora como las células madre.

Referencias bibliográficas

1. Ramachandran J, Schneider JS, Crassous P-A, Zheng R, Gonzalez JP, Xie L-H, Beuve A, Fraidenraich D, Peluffo RD. Nitric Oxide Signaling Pathway in Duchenne Muscular Dystrophy Mice: Upregulation of L-arginine Transporters. *Biochem J.* 2013; 449:133-142.
2. David A. Bender, Robert K. Murray, Kathleen M. Botham, Peter J. Kennely, Victor W. Rodwell PAW. *Bioquímica de Harper*. 28va Edición. España: McGraw-Hill; 2012.
3. Linares SG. Identificación mediante MLPA(Multiplex ligation-Dependent probe Amplification) de las deleciones y duplicaciones de la Distrofia Muscular de Duchenne en varones afectados y mujeres portadoras pertenecientes a la población andaluza. Granada: Universidad de Granada; 2015 (citado 19 Sep 2017). Disponible en: <https://hera.ugr.es/tesisugr/25319802.pdf>
4. Blake DJ, Tinsley JM, Davies KE. Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin. *Brain Pathol.* 1996;6:37–47.
5. Campbell KP & Kahl SD. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature.* 1989; 338: 259-62.
6. <https://www.duchenne-spain.org> (INTERNET). España. Duchenne Spain. (Fecha de comienzo 2012; citado 28/9/2017). Disponible en: <https://www.duchenne-spain.org/investigacion/posibilidades-de-tratamiento/estabilizacion-de-la-membrana-celular-muscular/utrofina/>.
7. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86:9030-9033.
8. Förstermann U. Regulation of nitric oxide synthase expression and activity. En: Mayer B, ed. *Handbook of experimental pharmacology: nitric oxide*. Vol. 143. Berlin: Springer, 2000.
9. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell Press.* 1994; 78:915-918.
10. Brenman J, Bredt S. Nitric oxide signaling in the nervous system. *Methods Enzymol.* 1996; 269:119-129.
11. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:6368-6371.
12. McCaslin P, Seikwan OH. Nitric oxide and glutamate receptors. En: Stone T ed. *CNS Neurotransmitters and Neuromodulators: Glutamate*. Nueva York: CRC Press, 1995. p. 159-173.

13. Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res.* 2003; 93: 388-398. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12958142>
14. Hare JM. Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol.* 2003; 35: 719-729. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12818561>
15. Schulz R, Rassaf T, Massion PB, Kelm M, Balligand JL. Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther.* 2005; 108: 225-256. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15949847>
16. Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, et al. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature.* 2002; 416: 337-339, disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11907582#>.
17. Choate JK, Danson EJ, Morris JF, Paterson DJ. Peripheral vagal control of heart rate is impaired in neuronal NOS knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281: H2310-H2317. Disponible en Medline
18. Takimoto Y, Aoyama T, Keyamura R, Shinoda E, Hattori R, Yui Y, et al. Differential expression of three types of nitric oxide synthase in both infarcted and non-infarcted left ventricles after myocardial infarction in the rat. *Int J Cardiol.* 2000; 76:135-145. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11104868#>.
19. Jones SP, Greer JJ, Van Haperen R, Duncker DJ, De Crom R, Lefer DJ. Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates congestive heart failure in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:4891-4896. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12676984#>
20. Recchia FA, McConnell PI, Bernstein RD, Vogel TR, Xu X, Hintze TH. Reduced nitric oxide production and altered myocardial metabolism during the decompensation of pacing-induced heart failure in the conscious dog. *Circ Res.* 1998; 83:969-979. Disponible en Medline
21. Heymes C, Vanderheyden M, Bronzwaer JG, Shah AM, Paulus WJ. Endomyocardial nitric oxide synthase and left ventricular preload reserve in dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1999; 99: 3009-3016. Disponible en Medline
23. Laurence L Brunton, John S Lazo, Keith L Parker. Goodman y Gilman`s The Pharmacological Basis of Therapeutics. *Occup Environ Med.* 2007; 64. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2078485/>
24. Mark J D Griffiths, Timothy W Evans. Inhaled Nitric Oxide Therapy in Adults. *N Engl J Med.* 2005; 353: 2683-2695. Disponible en https://www.researchgate.net/profile/Mark_Griffiths4/publication/7398815_Inhaled_Nitric_Oxide_Therapy_in_Adults/links/540834600cf2c48563b8ca17/Inhaled-Nitric-Oxide-Therapy-in-Adults.pdf
25. Paresh Dandona, Chaudhuri A, Aljada A. Endothelial dysfunction and

- hypertension in diabetes mellitus. *Med Clin N Am*. 2004; 88:911–931. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15308385>.
26. Zhou J, Kim D, Peluffo RD. Nitric oxide can acutely modulate its biosynthesis through a negative feedback mechanism on L-arginine transport in cardiac myocytes. *Am J Physiol*. 2010; 299:C230-9
 27. Nowak KJ, Davies KE. Distrofia muscular de Duchenne y la distrofina: patogénesis y oportunidades para el tratamiento. 2004. *EMBO Rep* 5: 872876.
 28. F. Navarro- Lopez, C. Rozman. Miocardiopatías: Medicina Interna. Edicion XVI.Barcelona - España.Elsevier; 2009, 5579-5589.
 29. Tedesco FS, Dellavalle A, DiazManera J, Messina G, Cossu G Reparación de músculo esquelético: potencial de regeneración de las células madre de músculo esquelético. *J Clin Invest*- 2010;120: 1119.
 30. Yamanaka S. Una nueva mirada a las células iPS. *Cell*:137; 1317.
 31. Takahashi K, Yamanaka. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126: 663- 676. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16904174>
 32. Minasi MG, Riminucci M, De Angelis L *et al.*: The mesoangioblast: a multipotent, selfrenewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development*. 2002; 129, 2773–2783. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015303>
 33. Sampaolesi M, Torrente Y, Innocenzi A *et al.*: Cell therapy of α sarcoglycan null dystrophic mice through intraarterial delivery of mesoangioblasts. *Science*. 2003; 301: 487–492. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12855815>
 34. Tanaka KK, Hall JK, Troy AA, Cornelison DD, Majka SM& Olwin BB. Syndecan-4-expressing muscle progenitor cells in the SP engraft as satellite cells during muscle regeneration. *Cell Stem Cell*. 2009; 4, 217–225. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19265661>.
 35. Burkin DJ, Wallace GQ, Nicol KJ, DJ Kaufman, Kaufman SJ: Aumento de expresión de la integrina $\alpha 7\beta 1$ reduce la distrofia muscular y restaura la viabilidad en ratones distróficos. *J. Cell Biol*. 2001; 152:1207 1218. Disponible en [CrossRef] [Medline] [CAS].
 36. Sych N, Klunnik M, Ivankova O, Matyaschuk I, Demchuk M, Novytska A, et al. Efficacy of fetal stem cells in Duchenne muscular dystrophy therapy. *Journal of Neurorestoratology*. 2013; 2: 37-46. Disponible en: <https://www.dovepress.com/efficacy-of-fetal-stem-cells-in-duchenne-muscular-dystrophy-therapy-peer-reviewed-article-JN>.

37. Mirella Meregalli, Andrea Farini, Marzia Belicchi, Daniele Parolini, Letizia Cassinelli, Paola Razini, et al. Perspectives of stem cell therapy in Duchenne muscular dystrophy. *FEBS*. 2013; 280: 4251–4262. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.12083/full#>.
38. Chun, J. L., O'Brien, R., Song, M. H., Wondrasch, B. F., & Berry, S. E. Injection of Vessel-Derived Stem Cells Prevents Dilated Cardiomyopathy and Promotes Angiogenesis and Endogenous Cardiac Stem Cell Proliferation in mdx/utrn^{-/-} but Not Aged mdx Mouse Models for Duchenne Muscular Dystrophy. *Stem Cells Translational Medicine*. 2013; 2:159. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3659755/>