

Caracterización de fuerza, resistencia y función pulmonar en sujetos con enfermedades neuromusculares con el polimorfismo R577X del gen ACTN3

Characterization of strength, endurance and lung function in subjects with neuromuscular diseases with the R577X polymorphism of the ACTN3 gene

Eduardo Cifuentes-Silva^{a,b,e}, Daniel Bueno-Buker^b,
Constanza Pastene-Maureira^{c,e}, Alejandro Pacheco-Valles^{d,f}

^aEscuela de Kinesiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Santiago de Chile (USACH). Santiago, Chile

^bHospital Dr. Exequiel González Cortés. San Miguel, Chile.

^cHospital Dr. Eduardo Schütz Schroeder. Puerto Montt, Chile.

^dDepartamento de Kinesiología Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Católica del Maule. Talca, Chile.

^eKinesiólogo.

^fTecnólogo Médico.

Recibido: 15 de septiembre de 2021; Aceptado: 26 de marzo de 2023

¿Qué se sabe del tema que trata este estudio?

El polimorfismo R577X del gen ACTN3 determina la expresión de la proteína alfa-actinina 3 en la musculatura humana. Los sujetos sin ACTN3 generan menor fuerza muscular. Las enfermedades neuromusculares (ENM) generan pérdida acelerada de fuerza muscular por su curso natural. La interacción de ambas variables puede ser de gran interés.

¿Qué aporta este estudio a lo ya conocido?

Presentamos los resultados de la genotipificación de R577X de ACTN3 de un grupo de pacientes con ENM y su caracterización en base a función pulmonar, fuerza y resistencia muscular. Los sujetos presentaron alteraciones espirométricas ventilatorias restrictivas y disminución de la fuerza muscular al contrastarlo con los valores de referencia. No fue posible establecer una relación con el polimorfismo del gen ACTN3. Este es el primer estudio sobre el polimorfismo R577X de ACTN3 y las ENM en Chile.

Resumen

El polimorfismo R577X del gen ACTN3 determina la expresión de la proteína alfa-actinina 3 en la musculatura humana. El genotipo homocigoto XX no logra sintetizar alfa-actinina 3 y se asocia a una menor fuerza muscular que el genotipo RR. Las enfermedades neuromusculares (ENM) generan pérdida acelerada de fuerza muscular, y su relación con el gen ACTN3 no ha sido establecida. **Objetivo:** Describir las variables de fuerza, resistencia muscular respiratoria y función pulmonar en

Palabras clave:

Proteína ACTN3;
Polimorfismo Genético;
Enfermedades
Neuromusculares;
Músculos
Respiratorios;
Fuerza Muscular

pacientes con ENM que presentan el polimorfismo R577X del gen ACTN3. **Pacientes y Método:** Estudio observacional descriptivo. Fueron evaluados 6 sujetos entre 10 y 14 años, con diagnóstico de ENM atendidos en el Hospital Dr. Exequiel González Cortés, Santiago, Chile. Fueron genotipificados con el polimorfismo R577X de ACTN3 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La medición de función pulmonar se realizó con espirometría. La fuerza muscular se evaluó con Presión inspiratoria máxima (PIMax), Presión espiratoria máxima (PEMax) y Fuerza prensil manual (FPM). La resistencia muscular respiratoria fue evaluada mediante tiempo límite (TLim). **Resultados:** La mediana y percentil 25-75 [Med(p25-p75)] del porcentajes de límite inferior (%Li) para FPM, PIMax y PEmax fue: 36,01 (16,88-53,30)%, 68,88 (41,07-89,59)% y 38,74 (27,74-56,90)% respectivamente. La Med(p25-p75) de TLim fue 299,0 (113,3-356,3) segundos. La genotipificación del polimorfismo R577X de ACTN3: en 2 sujetos fue XX, en 2 RX y en 2 RR. **Conclusiones:** Los sujetos presentaron alteraciones espirométricas ventilatorias restrictivas y disminución de la fuerza muscular al contrastarlo con los valores de referencia. No se pudo establecer relación con el polimorfismo del gen ACTN3.

Abstract

The ACTN3 R577X polymorphism determines the expression of alpha-actinin 3 protein in human muscle. The homozygous XX genotype fails to synthesize alpha-actinin 3 and is associated with lower muscle strength than the RR genotype. Neuromuscular diseases (NMD) generate an accelerated loss of muscle strength, and their relationship with the ACTN3 gene has not been established. Objective: To describe the variables of strength, respiratory muscle endurance, and lung function in patients with NMD who present the ACTN3 R577X polymorphism. **Patients and Method:** Descriptive observational study. Six subjects between 10 and 14 years old, with a diagnosis of NMD, treated at the Hospital Dr. Exequiel González Cortés in Santiago, Chile, were evaluated. They were genotyped with the ACTN3 R577X polymorphism by polymerase chain reaction (PCR). Lung function was measured by spirometry. Muscle strength was evaluated with maximal inspiratory pressure (MIP), maximal expiratory pressure (MEP), and grip strength (GS). Respiratory muscle endurance was evaluated by time limit (TLim). **Results:** The median and 25–75th percentile [Med(p25-p75)] of the lower limit percentages (%Li) for GS, MIP, and MEP were: 36.01% (16.88-53.30), 68.88% (41.07-89.59), and 38.74% (27.74-56.90), respectively. The Med(p25-p75) of TLim was 299.0 (113.3-356.3) seconds. Regarding the genotyping of the ACTN3 R577X polymorphism, in 2 subjects it was XX, in 2 RX, and in 2 RR. **Conclusions:** The subjects presented restrictive ventilatory spirometric alterations and decreased muscle strength when compared with the reference values. No relationship could be established with the ACTN3 gene polymorphism.

Keywords:

ACTN3 Protein;
Genetic Polymorphism;
Neuromuscular
Disease;
Respiratory Muscles;
Muscle Strength

Introducción

La fuerza muscular tiene una importante influencia en las habilidades funcionales y se ha asociado positivamente con un mejor rendimiento en deportes, longevidad y calidad de vida¹.

Aunque los estímulos ambientales son un importante elemento que puede determinar el tamaño del músculo y de la fuerza muscular, el genoma juega un importante rol sobre los fenotipos². Se ha demostrado la influencia de los factores genéticos sobre las variaciones individuales de fuerza muscular y masa muscular promedio entre un 44 a 58%³, y uno de los genes que puede influir de forma importante en estos fenotipos musculares es el gen de la alfa-actinina 3 (ACTN3)^{4,5}.

Las alfa-actininas son una familia de proteínas de unión a la actina relacionadas con la distrofina, cuya función es la de asociarse al citoesqueleto en diferen-

tes tejidos del cuerpo⁶. En la actualidad se conocen 4 tipos de alfa-actininas: las alfa-actinina 1 y 4 se encuentran en todas las células del cuerpo, principalmente en el citoesqueleto y actuando como fijadores de membranas⁷. Las alfa-actininas 2 y 3 se ubica en el disco Z de la sarcómera, interactuando incluso con proteínas de membrana⁶. La alfa-actinina 2 se encuentra principalmente en el músculo cardíaco y en las fibras oxidativas. En cambio, la alfa-actinina 3 se encuentra limitada a un conjunto de fibras tipo II (todas las fibras IIa y el 50% de las IIb)⁸. El polimorfismo de ACTN3 R577X (o rs1815739) genera 3 posibles genotipos: homocigoto RR para la síntesis de alfa-actinina 3; heterocigoto RX, que sintetiza de igual forma la proteína funcional; y homocigoto XX que no logra sintetizar alfa-actinina 3⁹.

Para entender la función de la alfa-actinina 3 se han realizado estudios en modelos de ratones *knoc-*

kout (KO) del gen ACTN3 (ACTN3-KO) homólogo a la falta alfa-actinina 3 en el polimorfismo R557X humano. Por la ausencia de esta proteína se genera un aumento de la alfa-actinina 2 como fenómeno compensatorio¹⁰. Por otro lado, los ratones ACTN3-KO no presentan alteraciones físicas a la inspección, pero sí disminución del peso total, masa magra y masa muscular aislada, alterando la proporción y diámetro de fibras glicolíticas, pero no la cantidad total de fibras musculares¹¹. Al someterlos a ejercicios de resistencia, estos tienden a recorrer mayor cantidad de metros en una cinta rodante que los “*wild type*” (WT). En contraste los ACTN3-KO presentan menor fuerza de agarre, por lo tanto, menor potencia muscular^{10,11}.

Existen estudios que investigaron la relación del polimorfismo ACTN3 R577X en atletas y en población general, los cuales reportan que el alelo R (que expresa la proteína funcional) está sobrerrepresentado en atletas de fuerza explosiva y velocidad al compararlos con su grupo control en población griega¹², atletas de largo aliento australianos⁴, finlandeses¹³ e israelíes¹⁴. Otros autores han reportado esta sobre representación en jugadores de fútbol profesional españoles¹⁵, gimnastas artísticos italianos¹⁶ y atletas de potencia rusos¹⁷. De estos mismos estudios se ha desprendido que los sujetos que no expresan ACTN3 (portadores del genotipo XX) gozan de menor fuerza explosiva y velocidad respecto al grupo control o en comparación a los atletas si la poseen^{4,13-17}.

Las enfermedades neuromusculares (ENM) son un grupo de patologías en su mayoría heredables que pueden afectar la unión neuromuscular y fibra muscular. Funcionalmente se ve una disminución de fuerza y resistencia muscular asociado al curso natural de la enfermedad teniendo como consecuencia funcional respiratoria una alteración restrictiva¹⁸.

Existen estudios que han buscado relacionar la ACTN3 con las ENM, sin embargo, no logran establecer la ausencia de ACTN3 como una causa primaria de debilidad muscular¹⁹⁻²¹. Cabe destacar el estudio de Hogarth et al. el 2017²² donde se analizó retrospectivamente en sujetos con Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), la presencia o ausencia de ACTN3 como factor en la pérdida temprana de la deambulación (LoA por sus siglas en inglés), mostrando que los sujetos heterocigotos presentaron LoA de 1-2 años antes en comparación a los homocigotos RR y XX. Condición similar se observa en la fuerza de presión evaluada en un periodo de 4 años en sujetos de 6 a 10 años al comparar la medición inicial versus final²².

Considerando que la alfa-actinina 3 influye en la musculatura de deportistas y sujetos sanos y que las ENM generan pérdida acelerada de la fuerza muscular asociadas al curso natural de las mismas, sería in-

teresante caracterizar pacientes con ENM en función de ACTN3 para prescribir el ENM en relación con su carga genética, ya que a la fecha de este escrito no se encontraron estudios que describan las variables de fuerza y/o resistencia muscular respiratoria en sujetos con ENM que posean los distintos genotipos del polimorfismo R577X.

El objetivo de este estudio fue describir el comportamiento de fuerza, resistencia muscular respiratoria y función pulmonar en pacientes con ENM que presentan el polimorfismo R577X del gen ACTN3. Como objetivo secundario se propuso describir la frecuencia alélica y genotípica del polimorfismo R577X del gen ACTN3 en el grupo evaluado.

Pacientes y Método

Estudio observacional descriptivo en una cohorte de pacientes atendidos en el Hospital Dr. Exequiel González Cortés (HEGC) de Santiago, Chile.

Participantes

Muestra por conveniencia de sujetos con diagnóstico médico de ENM, derivados para Rehabilitación respiratoria en la Unidad de Medicina Física y Rehabilitación del HEGC, por médico especialista en neurología, fisiatría o broncopulmonar infantil. Los sujetos fueron incluidos luego de la firma del consentimiento informado y consentimiento informado de sus tutores legales.

El reclutamiento de la cohorte completa que cumplieran los criterios de inclusión (ENM confirmada y comprensión de órdenes simples) de 15 sujetos no fue posible en el contexto de pandemia COVID-19. La muestra final fue de 6 sujetos (5 hombres y 1 mujer; mediana 12 años; 10-14 años (p25-p75)).

Los criterios de exclusión fueron: incapacidad de comprender las instrucciones de los *test* a evaluar, cursar una exacerbación respiratoria aguda, presentar un índice de masa corporal (IMC) sobre 30 Kg/m² y diagnóstico de patologías cardiometabólicas que generen variables confundentes.

Procedimientos

Primera etapa

Se realizó una evaluación kinésica. Se consideró la evaluación de fuerza prensil manual como predictor de pérdida de función muscular, según el protocolo de Gómez-Campos et al, mediante un dinamómetro hidráulico de mano Baseline^{®23}. Se registró la fuerza prensil en posición sedente, hombro aducido y neutralmente rotado, codo flectado en 90°. La prueba se realizó en 3 ocasiones con cada mano, registrando

en kilogramos el mejor valor obtenido. Para evaluar la función pulmonar se consideró la fuerza muscular respiratoria según protocolo de Black y Hyatt²⁴. Se solicitó ventilar a volumen corriente por cinco ciclos respiratorios a través de una pieza T con válvula unidireccional conectada con una silicona de 15 cm a un manómetro digital PCE-005²⁵, donde se registró la presión inspiratoria máxima (PIMax) y presión espiratoria máxima (PEMax) en cmH₂O. En ambas se seleccionó la mejor prueba de un mínimo de tres maniobras aceptables y reproducibles; el *peak* espiratorio de flujo tusígeno fue definido según protocolo de Lo-Mauro et al.²⁶ utilizando un flujómetro Mini Wright®; la espirometría fue realizada según protocolo SER con un pletismógrafo Platinum Elite RTD²⁷ por médico especialista en función pulmonar. Se le pidió al paciente una inspiración máxima, lenta y progresiva para luego realizar una maniobra espiratoria máxima, de forma rápida y forzada, hasta completar el vaciado de sus pulmones. Se debió conseguir un mínimo de tres maniobras (máximo 8 intentos) técnicamente satisfactorias que tuvieran variaciones menores a 5% entre estas. Solo se consideró la espirometría basal ya que al presentar una espirometría cuya alteración ventilatoria es de tipo restrictiva, se entiende que no se producen cambios significativos post aplicación de beta adrenérgicos²⁷. Para los cálculos de los porcentajes de límite inferior (%Li) en mediciones de fuerza muscular se utilizó el valor promedio de referencia según edad y sexo correspondiente a la variable de interés y se restó dos desviaciones estándar, consignando ese valor como el 100% del Li. La resistencia de la musculatura respiratoria se midió con la prueba de tiempo límite (TLim) según protocolo de Zenteno et al.²⁸. En breve, se aplicó una carga fatigante correspondiente al 40% de la PIMax evaluada previamente, a través de una válvula umbral *Inspiratory muscle training* (IMT) Philips® y se pidió al sujeto que realizara la respiración por medio de esta. Se consigna el tiempo en segundos en que el paciente logró ejecutar correctamente el ciclo respiratorio.

Segunda etapa

Se realizó la extracción de ADN leucocitario, mediante el método de solución salina modificado por Salazar et al.²⁹. Luego se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y un análisis de restricción enzimática (RFLP), técnica que detectó la presencia del polimorfismo rs1815739 del gen ACTN3 a través de los *primers* descritos por Druzhevskaya et al.¹⁷: 5'-CTGGGCTGGAAGACAGGAG-3' 5'-AGGGTGATGTA-GGGATTGGTG-3'. La PCR fue realizada en un volumen total de 25 ml que contenía 25 ng de DNA, 0,2 mmol/l de cada primer, 200 mmol/l de cada dNTP, 0,5 unidades de Dream Taq Green DNA polymerase

(#EP0712, Fermentas, Lithuania), y 2,5 µl de Dream Taq Green Buffer (#EP0711, Fermentas, Lithuania). Las condiciones de la PCR fueron: desnaturación inicial a 95 °C por 5 min y 30 ciclos compuestos por desnaturación a 95 °C por 30 segundos, hibridación a 54,5 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos, seguido por una extensión final a 72 °C por 10 min. El producto amplificado generó fragmentos de 291 pares de bases (bp), el cual fue sometido a una digestión enzimática vía la endonucleasa de restricción DdeI (Promega, USA) según indicaciones del fabricante por 14 horas a 37 °C, para luego analizar los fragmentos de restricción, en gel de agarosa al 2% (Biotium, USA). El genotipo RR se identificó por la presencia de un fragmento de 291 bp; el genotipo RX por fragmentos de 291, 183 y 108 bp, y el genotipo XX por dos fragmentos de 183 y 108 bp. Finalmente, se realizó un protocolo de control de calidad, donde se repitió aleatoriamente el 20% de los análisis de laboratorio con el objetivo de corroborar que las muestras se analizaron adecuadamente.

Análisis de datos

Los datos fueron analizados en el programa GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Los resultados se presentan como porcentajes, medianas y percentiles 25-75.

Consideraciones éticas

Este estudio fue aprobado por el Comité de ética del Servicio de Salud Metropolitano Sur, Chile y cumple con las normas éticas especificadas en la Declaración de Helsinki.

Resultados

De los 6 sujetos evaluados 2 presentaban distrofia muscular de Duchenne (DMD), 2 Atrofia muscular espinal (AME) tipo II y 2 sujetos AME tipo III. Las características demográficas y antropométricas de los participantes se detallan en la tabla 1. Al analizar la caracterización de la función pulmonar (tabla 2) destaca que la mayoría de la muestra presentó alteraciones restrictivas caracterizadas por una Capacidad Vital Forzada (CVF) bajo lo predicho, mientras que la relación Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo y CVF (VEF1/CVF) fue normal solo en el sujeto n° 5.

Las evaluaciones de fuerza muscular se registran en la tabla 3, y su relación al %Li en la figura 1. En ellas solo el sujeto n° 2 fue incapaz de realizar la prueba de fuerza prensil y coincidió con la menor evaluación de fuerza muscular respiratoria. Cabe destacar que solo el sujeto n° 3 fue el único con PIMax sobre el Li. Res-

Tabla 1. Características demográficas y parámetros fisiológicos de reposo del grupo estudiado

Características generales	
Hombres (n)	5/6
Dominancia D (n)	4/6
	Mediana (p25-p75)
Edad (años)	12 (10 - 14)
Peso (kg)	51 (35 - 59,25)
Talla (m)	1,43 (1,38 - 1,48)
IMC (Kg/m ²)	24,03 (19,01 - 27)
SatO ₂ (%)	98 (96,5 - 98,25)
FC (cxm)	95 (72,75 - 110,5)
FR (cxm)	23 (20 - 26,5)
PAS (mmHg)	119 (104,3 - 123)
PAD (mmHg)	66,5 (57,25 - 73,25)
PAM (mmHg)	81 (76,5 - 85)

Las variables edad, peso, talla, IMC, SatO₂, FC, FR, PAS, PAD, PAM con su respectiva mediana y percentil 25-percentil 75 (p25-p75). IMC: Índice de Masa Corporal, SatO₂: Saturación de oxígeno, FC: Frecuencia cardiaca, FR: Frecuencia respiratoria, PAS: Presión arterial sistólica, PAD: Presión arterial diastólica, PAM: Presión arterial media, Cxm: Ciclos por minuto.

pecto a la resistencia muscular respiratoria medida por el TLim, se obtuvieron valores del total de la muestra, mediana y percentil 25-75 [Med(p25-p75)] 299,0 (113,3-356,3) segundos.

Finalmente, la genotipificación (tabla 4), indica que los sujetos n° 5 y 6 presentaban total ausencia de la proteína ACTN3. De las mediciones de estos dos pacientes se destaca que el sujeto n° 5 obtuvo los segundos valores más bajos en fuerza y resistencia muscular respiratoria, con una espirometría en rango de normalidad y su rendimiento en la prueba de TLim fue el más bajo. El sujeto n° 6 se encontró dentro de los valores altos de fuerza y resistencia muscular respiratoria, con una espirometría restrictiva y con un rendimiento en la prueba de tiempo dentro del 50% más alto.

Discusión

Este estudio tuvo por objetivo describir el comportamiento de las variables de fuerza y resistencia muscular respiratoria en pacientes con ENM que presentan el polimorfismo R577X del gen ACTN3. Respecto a la espirometría 5 sujetos presentaron una alteración ventilatoria restrictiva posiblemente asociada al curso natural de las ENM. Mayer et al., evaluaron las espirometrías de 60 sujetos con DMD logrando establecer una caída de la CVF en un 5% por año independiente del uso o no de corticoides³⁰. En contraparte Meier et

Tabla 2. Evaluación de la función pulmonar mediante espirometría basal

Sujeto	CVF (L)	% T	VEF1 (L)	% T	VEF1/CVF (%)	FEF 25-75 (L/S)	% T	ALT VENT
1	2,27	63	1,47	50	65	0,76	25	RE
2	1,41	63	1,30	66	92	1,90	77	RE
3	1,37	57	1,20	57	88	2,10	79	RE
4	2,06	75	1,72	71	83	2,29	81	RE
5	2,35	91	2,19	97	93	2,59	97	N
6	3,14	82	2,70	82	86	3,05	82	RE
Med	2,17	69,00	1,60	68,50	87,00	2,20	80,00	
p25	1,40	61,50	1,28	55,25	78,50	1,62	64,00	
p75	2,55	84,25	2,32	85,75	92,25	2,71	85,75	

Las variables CVF, VEF1, VEF1/CVF, FEF 25-75 y %T con su respectiva mediana y percentil 25 - percentil 75 (p25-p75). La variable ALT VENT se expresa como categórica. CVF: Capacidad vital forzada, VEF1: Volumen espiratorio forzado en el primer segundo, VEF1/CVF: Relación Volumen espiratorio forzado en el primer segundo y Capacidad vital forzada, FEF 25-75: Flujo espiratorio medio, %T: Porcentaje del valor teórico (de la variable inmediatamente a la izquierda de esta), ALT VENT: Alteración ventilatoria, RE: Restrictiva, N: Normal.

Tabla 3. Evaluaciones de fuerza muscular

Sujeto	FPM (Kg)	%Li	PIMax (cmH ₂ O)	%Li	PEMax (cmH ₂ O)	%Li	PEFT (L/Min)	CAT PEFT	TLim (s)
1	9,5	22,5	100	84,03	55	42,31	285	EF	354
2	0,0	0,0	35	35,71	22	17,19	150	IN	121
3	9,1	64,1	68	106,25	40	56,34	180	IN	296
4	9,1	49,7	70	71,43	45	35,16	280	EF	363
5	6,8	37,2	42	42,86	40	31,25	250	ME	90
6	9,1	34,9	65	66,32	75	58,59	250	ME	302
Med	9,10	36,01	66,50	68,88	42,50	38,74	250,00		299,00
p25	5,10	16,88	40,25	41,07	35,50	27,74	172,50		113,30
P75	9,20	53,30	77,50	89,59	60,00	56,90	281,30		356,30

Las variables FPM, PIMax, PEmax, PEFT, %Li y TLim con su respectiva mediana y percentil 25 - percentil 75 (p25-p75). La variable CAT PEFT se expresa como categórica. FPM: Fuerza prensil manual, PIMax: Presión inspiratoria máxima, PEmax: Presión espiratoria máxima, PEFT: Peak espiratorio de flujo tusígeno y %Li: Porcentaje del límite inferior del valor teórico (de la variable inmediatamente a la izquierda de esta), TLim: Tiempo límite, CAT PEFT: Categorización peak espiratorio de flujo tusígeno, EF: Eficiente, ME: Medianamente eficiente, IN: Ineficiente.

Tabla 4. Análisis molecular polimorfismo rs1815739 de ACTN3

Sujeto	Dg	Análisis molecular R577X	
		PCR-RFLP	ACTN3
1	DMD	CC	(+)
2	AME II	CC	(+)
3	AME II	CT	(+)
4	AME III	CT	(+)
5	DMD	TT	(-)
6	AME III	TT	(-)

Las variables Dg, PCR-RFLP y ACTN3 se expresa como categóricas. Dg: Diagnóstico, RFLP: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, ACTN3: Gen de la alfa-actinina 3, DMD: Distrofia muscular de Duchenne, AME II: Atrofia muscular espinal tipo 2, AME III: Atrofia muscular espinal tipo 3, CC: Homocigoto dominante, CT: Heterocigoto, TT: Homocigoto recesivo, (+): Presente, (-): Ausente.

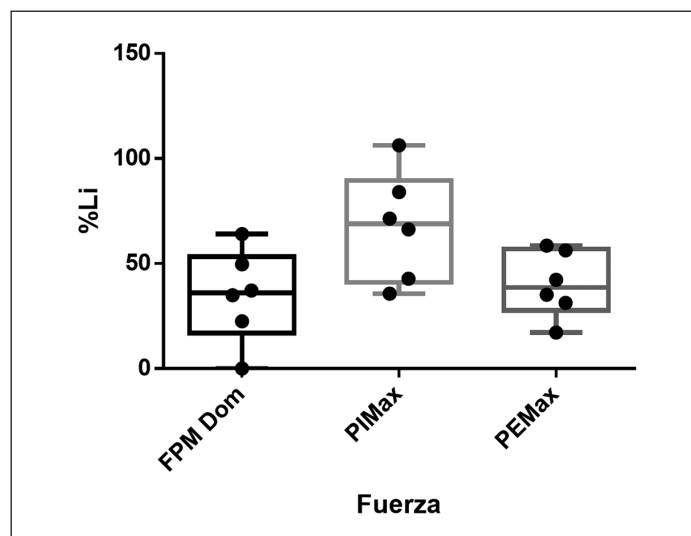


Figura 1. Evaluaciones de fuerza en relación con los valores de referencia. En cada caja se exhiben las variables FPM de su mano dominante, PIMax y PEmax. Cada uno de los puntos representa el valor obtenido por cada sujeto y los bigotes representan los valores mínimos y máximos. %Li: Porcentaje del límite inferior. FPM: Fuerza prensil manual, PIMax: Presión inspiratoria máxima, PEmax: Presión espiratoria máxima.

al., en un análisis de 64 sujetos con DMD logra determinar una caída al año del CVF en un 8,7%³¹, previa suspensión de corticoides, y los valores iniciales de espirometría fueron calificados como una alteración ventilatoria restrictiva. En nuestro estudio no se suspendió corticoides en el caso de las DMD.

En relación a la espirometría y el polimorfismo de ACTN3, Bello et al., buscaron asociar caída de la espirometría en DMD y el gen ACTN3, no logrando establecer una relación entre ambas variables³². Para

el caso de la espirometría en AME, Khirani et al., en 7 sujetos AME II y 9 sujetos AME III lograron determinar la caída anual de CVF en un 9,8% y 4,2% respectivamente³³. Este deterioro y debilidad muscular general de las ENM hace que presenten deformidades costales, disminuyendo la capacidad vital y presentándose como un patrón funcional respiratorio restrictivo relacionado a la mala capacidad tusígena, hipoventilación, hipercapnia, hipertensión pulmonar y trastornos respiratorios del sueño³⁴.

Respecto a la Fuerza prensil manual (FPM) en DMD, existen estudios que proponen que esta se relacionaría con el deterioro funcional, pero no son concluyentes para indicar esta medición como de rutina para evaluar a estos sujetos³⁵. Bulut et al., en 38 sujetos, edades promedio $12,02 \pm 1,99$ años, correlacionaron la FPM con funcionalidad en DMD no ambulantes, reportando una fuerza promedio de $1,45 \pm 1,99$ (Kg) de fuerza³⁶. Estos valores están por debajo de lo obtenido en nuestra muestra pese a la similitud etaria entre ambos estudios. En AME, no se encontraron reportes de valores específicos para FPM. Se ha demostrado que ambas enfermedades comparten una debilidad muscular, pudiendo tener un comportamiento funcional similar³⁷. En el caso del sujeto 2, marcó 0 Kg en la prueba de FPM y su diagnóstico es AME II. De los 4 sujetos con Alfa-actinina 3 (+), 3 tienen valores altos de FPM, y de los 2 con Alfa-actinina 3 (-) solo 1 presenta valores bajos, no obstante, por el tipo de estudio no es posible establecer asociación de las variables.

Para el cuidado de pacientes con DMD se recomienda asistir la tos y realizar entrenamiento muscular respiratorio (EMR) cuando tienen una PIMax menor a $60 \text{ cmH}_2\text{O}$ ³⁴, y/o se encuentre bajo el límite inferior de los valores de referencia según edad y sexo²⁸, como es el caso de los sujetos 2 y 5. De ellos, el sujeto 2 es alfa-actinina 3 (+) y su diagnóstico es AME, por lo que se podría realizar EMR a una mayor carga de trabajo o, en términos prácticos, mayor cantidad de cmH_2O , ya que teóricamente su tejido muscular no presenta deficiencias de distrofina, haciendo pensar que este respondería de mejor forma a una contracción muscular en comparación a un sujeto con DMD. En contraparte, el sujeto 5 tiene DMD y alfa-actinina 3 (-) por lo que hay que ser conservador en su EMR.

Al análisis de la PEMax, categorización de la tos y alfa-actinina 3, se observa que 2 de los 4 sujetos alfa-actinina 3 (+) presentan tos ineficiente y PEMax bajas. Todas las fases de la tos se ven alteradas en las ENM siendo la más importante la fase inspiratoria para el *clerance* mucociliar, sin embargo, la fase expulsiva también influye³⁸ y se ha demostrado que si un sujeto realiza EMR inspiratorio también mejora la PEMax³⁹.

Respecto a los %Li de las 3 mediciones de fuerza, solo el sujeto 3 se encuentra sobre el %Li en su evaluación de PIMax. El resto de la muestra en todas las evaluaciones se encuentran bajo el límite inferior confirmando la debilidad muscular de la cohorte. Por la naturaleza del estudio y la falta de grupo control no se puede afirmar que estos valores por debajo del %Li sean producto de la presencia de polimorfismo de ACTN3 o bien a la evolución natural de las ENM o sus diferentes diagnósticos subyacentes.

La prueba de TLim se realizó con el fin de evaluar la resistencia muscular respiratoria al 40% de la PIMax

según recomendación nacional²⁸, no existiendo valores de referencia para esta variable, lo que limita un mayor análisis de la misma. En el ámbito clínico la prueba de TLim tiene utilidad al ejecutar un protocolo de EMR para evaluar en un mismo sujeto la efectividad de este en un periodo de tiempo determinado.

La genotipificación y análisis de PCR nos muestran 2 sujetos alfa-actinina 3 (-) y 4 alfa-actinina 3 (+) obteniendo proporciones similares a los reportados en población chilena no deportista⁴⁰. Los datos de genotipificación deberían ser analizados con cautela, ya que 2 de los sujetos son homocigoto dominante (RR), 2 heterocigoto (RX) y 2 homocigoto recesivo (XX). Hogarth et al., demostraron el efecto protector a la injuria muscular en sujetos con DMD homocigotos versus heterocigotos para ACTN3. Estos últimos perdían el hito de marcha de 1 a 2 años antes que los homocigotos²². Los mismos autores demostraron que ratas KO para los genes DMD y ACTN3 presentan sobreexpresión de calcineurina, AMPK (proteína kinasa activada por AMP) y Pgc1- α (proteína coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas), concluyendo que se genera una conversión fenotípica de fibras musculares rápidas a lentas entregando un "efecto protector"²².

Dial et al., reportaron el rol de AMPK y Pgc1- α como agentes fundamentales a través del ejercicio en la conservación de la unión neuromuscular y la biogénesis mitocondrial³⁷, ambos mecanismos de señalización también son activados en sujetos con DMD cuando realizan actividad física.

Destacar que lo mencionado tanto para pacientes AME como DMD podría tomar relevancia a la hora de prescribir terapia física en pacientes con ACTN3 no obstante por la naturaleza del estudio no es posible generar algún tipo de conclusión o recomendación.

Cabe señalar que este es el primer estudio en Chile sobre el rs1815739 de ACTN3 y ENM. La principal proyección del estudio sería entregar una herramienta con fundamento molecular para que complemente las herramientas clínicas ya existentes, orientados a determinar las cargas de entrenamiento adecuadas, tanto en resistencia como en fuerza muscular.

Entre las limitaciones de nuestro estudio destacan el reducido tamaño de muestra y la falta de seguimiento para evaluar el efecto de las intervenciones en este grupo de pacientes, y la falta de un grupo control. El estudio en pacientes de un centro de salud único igualmente representa un sesgo en la selección, determinando características particulares en la muestra que no necesariamente son representativas de la población. Otros factores a tener en cuenta en la obtención de los resultados son condiciones basales de los sujetos, evolución clínica las ENM o las intervenciones previas tanto farmacológicas o de rehabilitación las que

podrían influir en los resultados obtenidos más que el polimorfismo en sí. Estos aspectos toman relevancia para considerar la extrapolación de nuestros resultados hacia el resto de la población pediátrica con ENM.

Conclusiones

La espirometría de los sujetos de estudio presenta una alteración ventilatoria restrictiva. La fuerza muscular respiratoria y fuerza prensil manual se encuentran con disminuidas al contrastarlas con los valores de referencia.

Un tercio de la muestra analizada no expresaba la proteína alfa-actinina 3, de acuerdo al análisis genético. Sería importante confirmar esta frecuencia en una muestra mayor de sujetos con enfermedades neuromusculares con el fin de relacionar el comportamiento de la fuerza y función pulmonar de estos sujetos.

Responsabilidades Éticas

Protección de personas y animales: Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación hu-

mana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos: Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado: Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Financiamiento

Este proyecto ha recibido apoyo del Departamento de Kinesiología de la Universidad Católica del Maule, quienes aportaron con laboratorios y equipos que permitieron realizar este estudio, y al proyecto interno UCM-434211, que aportó los insumos necesarios para los análisis de laboratorio.

Referencias

- Newman AB, Simonsick EM, Naydeck BL, Boudreau RM, Kritchevsky SB, Nevitt MC, et al. Association of long-distance corridor walk performance with mortality, cardiovascular disease, mobility limitation, and disability. *Jama*. 2006;295(17):2018-26. doi:10.1001/jama.295.17.2018
- Stewart CE, Rittweger J. Adaptive processes in skeletal muscle: molecular regulators and genetic influences. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. 2006;6(1):73-86.
- Arden NK, Spector TD. Genetic influences on muscle strength, lean body mass, and bone mineral density: a twin study. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1997;12(12):2076-81. doi:10.1359/jbmr.1997.12.12.2076
- Yang N, MacArthur DG, Gulbin JP, Hahn AG, Beggs AH, Eastal S, et al. ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. *American journal of human genetics*. 2003;73(3):627-31. doi:10.1086/377590
- Clarkson PM, Devaney JM, Gordish-Dressman H, Thompson PD, Hubal MJ, Urso M, et al. ACTN3 genotype is associated with increases in muscle strength in response to resistance training in women. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2005;99(1):154-63. doi:10.1152/jappphysiol.01139.2004
- Mills M, Yang N, Weinberger R, Vander Woude DL, Beggs AH, Eastal S, et al. Differential expression of the actin-binding proteins, alpha-actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. *Human molecular genetics*. 2001;10(13):1335-46. doi:10.1093/hmg/10.13.1335
- Honda K, Yamada T, Endo R, Ino Y, Gotoh M, Tsuda H, et al. Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *The Journal of cell biology*. 1998;140(6):1383-93. doi:10.1083/jcb.140.6.1383
- Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, et al. ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *American journal of human genetics*. 2013;92(3):431-8. doi:10.1016/j.ajhg.2013.01.015
- Beggs AH, Byers TJ, Knoll JH, Boyce FM, Bruns GA, Kunkel LM. Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(13):9281-8.
- MacArthur DG, Seto JT, Chan S, Quinlan KG, Raftery JM, Turner N, et al. An Actn3 knockout mouse provides mechanistic insights into the association between alpha-actinin-3 deficiency and human athletic performance. *Human molecular genetics*. 2008;17(8):1076-86. doi:10.1093/hmg/ddm380
- Seto JT, Quinlan KG, Lek M, Zheng XF, Garton F, MacArthur DG, et al. ACTN3 genotype influences muscle performance through the regulation of calcineurin signaling. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(10):4255-63. doi:10.1172/jci67691
- Papadimitriou ID, Papadopoulos C, Kouvatsi A, Triantaphyllidis C. The ACTN3 gene in elite Greek track and field athletes. *International journal of sports medicine*. 2008;29(4):352-5. doi:10.1055/s-2007-965339
- Niemi AK, Majamaa K. Mitochondrial DNA and ACTN3 genotypes in Finnish elite endurance and sprint athletes. *European journal of human genetics : EJHG*. 2005;13(8):965-9. doi:10.1038/sj.ejhg.5201438
- Eynon N, Duarte JA, Oliveira J, Sagiv M, Yamin C, Meckel Y, et al. ACTN3

- R577X polymorphism and Israeli top-level athletes. *International journal of sports medicine*. 2009;30(9):695-8. doi:10.1055/s-0029-1220731
15. Santiago C, González-Freire M, Serratos L, Morate FJ, Meyer T, Gómez-Gallego F, et al. ACTN3 genotype in professional soccer players. *British journal of sports medicine*. 2008;42(1):71-3. doi:10.1136/bjism.2007.039172
 16. Massidda M, Vona G, Calò CM. Association between the ACTN3 R577X polymorphism and artistic gymnastic performance in Italy. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2009;13(3):377-80. doi:10.1089/gtmb.2008.0157
 17. Druzhevskaya AM, Ahmetov, II, Astratenkova IV, Rogozkin VA. Association of the ACTN3 R577X polymorphism with power athlete status in Russians. *European journal of applied physiology*. 2008;103(6):631-4. doi:10.1007/s00421-008-0763-1
 18. Henderson RD, McCombe PA. Assessment of Motor Units in Neuromuscular Disease. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2017;14(1):69-77. doi:10.1007/s13311-016-0473-z
 19. North KN, Beggs AH. Deficiency of a skeletal muscle isoform of alpha-actinin (alpha-actinin-3) in merosin-positive congenital muscular dystrophy. *Neuromuscular disorders : NMD*. 1996;6(4):229-35. doi:10.1016/0960-8966(96)00361-6
 20. Vainzof M, Costa CS, Marie SK, Moreira ES, Reed U, Passos-Bueno MR, et al. Deficiency of alpha-actinin-3 (ACTN3) occurs in different forms of muscular dystrophy. *Neuropediatrics*. 1997;28(4):223-8. doi:10.1055/s-2007-973704
 21. North KN, Yang N, Wattanasirichaigoon D, Mills M, Eastal S, Beggs AH. A common nonsense mutation results in alpha-actinin-3 deficiency in the general population. *Nature genetics*. 1999;21(4):353-4. doi:10.1038/7675
 22. Hogarth MW, Houweling PJ, Thomas KC, Gordish-Dressman H, Bello L, Pegoraro E, et al. Evidence for ACTN3 as a genetic modifier of Duchenne muscular dystrophy. *Nature communications*. 2017;8:14143. doi:10.1038/ncomms14143
 23. Gómez-Campos R, Andruske CL, Arruda M, Sulla-Torres J, Pacheco-Carrillo J, Urra-Albornoz C, et al. Normative data for handgrip strength in children and adolescents in the Maule Region, Chile: Evaluation based on chronological and biological age. *PloS one*. 2018;13(8):e0201033. doi:10.1371/journal.pone.0201033
 24. Black LF, Hyatt RE. Maximal respiratory pressures: normal values and relationship to age and sex. *The American review of respiratory disease*. 1969;99(5):696-702. doi:10.1164/arrd.1969.99.5.696
 25. Torres-Castro R, Sepúlveda-Cáceres N, Garrido-Baquedano R, Barros-Poblete M, Otto-Yáñez M, Vasconcello L, et al. Agreement between clinical and non-clinical digital manometer for assessing maximal respiratory pressures in healthy subjects. *PloS one*. 2019;14(10):e0224357. doi:10.1371/journal.pone.0224357
 26. LoMauro A, Romei M, D'Angelo MG, Aliverti A. Determinants of cough efficiency in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatric pulmonology*. 2014;49(4):357-65. doi:10.1002/ppul.22836
 27. Gutiérrez C. M, Beroiza W. T, Borzone T. G, Caviendes S. I, Céspedes G. J, Gutiérrez N. M, et al. Espirometría: Manual de procedimientos. *SERChile %J Revista chilena de enfermedades respiratorias*. 2018;34:171-88.
 28. Zenteno D, Puppo Gallardo H, Vera Uribe R, et al. Guías de rehabilitación para niños con enfermedades respiratorias crónicas. 2007.
 29. Salazar LA, Melo CE, Cavalli SA, Hinuy HM, Hirata MH, Hirata RDJRbac. Micrométodo para extracción de DNA genómico útil no diagnóstico molecular da hipercolesterolemia familiar. 2001;33(3):111-6.
 30. Mayer OH, Finkel RS, Rummey C, et al. Characterization of pulmonary function in Duchenne Muscular Dystrophy. *Pediatric pulmonology*. 2015;50(5):487-94. doi:10.1002/ppul.23172
 31. Meier T, Rummey C, Leinonen M, Spagnolo P, Mayer OH, Buyse GM. Characterization of pulmonary function in 10-18 year old patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2017;27(4):307-14. doi:10.1016/j.nmd.2016.12.014
 32. Bello L, D'Angelo G, Villa M, et al. Genetic modifiers of respiratory function in Duchenne muscular dystrophy. *Annals of clinical and translational neurology*. 2020;7(5):786-98. doi:10.1002/acn3.51046
 33. Khirani S, Colella M, Caldarelli V, et al. Longitudinal course of lung function and respiratory muscle strength in spinal muscular atrophy type 2 and 3. *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society*. 2013;17(6):552-60. doi:10.1016/j.ejpn.2013.04.004
 34. Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. *The Lancet Neurology*. 2018;17(4):347-61. doi:10.1016/s1474-4422(18)30025-5
 35. Mattar FL, Sobreira C. Hand weakness in Duchenne muscular dystrophy and its relation to physical disability. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2008;18(3):193-8. doi:10.1016/j.nmd.2007.11.004
 36. Bulut N, Gürbüz I, Yılmaz Ö, Aydın G, Karaduman A. The association of hand grip strength with functional measures in non-ambulatory children with Duchenne muscular dystrophy. *Archivos de neuro-psiquiatria*. 2019;77(11):792-6. doi:10.1590/0004-282x20190161
 37. Dial AG, Ng SY, Manta A, Ljubicic V. The Role of AMPK in Neuromuscular Biology and Disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2018;29(5):300-12. doi:10.1016/j.tem.2018.02.010
 38. Finder JD. Airway clearance modalities in neuromuscular disease. *Paediatric respiratory reviews*. 2010;11(1):31-4. doi:10.1016/j.prrv.2009.10.007
 39. Torres-Castro R, Christoforou C, Garrido D, Vera-Urribe R, Puppo HJJoR, Therapy CP. Efectos del entrenamiento de los músculos inspiratorios en niños y adolescentes con enfermedades neuromusculares. 2013;2(2):35-41.
 40. Bascuñan C, Pacheco A. Polimorfismo R577X de ACTN3 no está asociado a rendimiento físico en jóvenes chilenos no deportistas. *XIX Congreso latinoamericano de fisioterapia y kinesiología, Confederación latinoamericana de fisioterapia y kinesiología*. 2014.