



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

“TERAPIA GÉNICA EN LA DISTROFIA MUSCULAR
DE DUCHENNE”

“GENE THERAPY IN DUCHENNE MUSCULAR
DYSTROPHY”

Autor: María Escarda González

GRADO EN BIOLOGÍA

Junio, 2020

Índice

	Página
1. Introducción	1
1.1. Objetivos	1
1.2. Metodología	1
1.3. Síntomas	2
1.4. Gen de la distrofina	3
1.5. Distrofina	3
1.6. Distrofia muscular de Becker	8
2. Terapias génicas para la distrofia muscular de Duchenne	9
2.1. Omisión de exón	9
2.1.1. Eteplirsén (Exondis 51)	15
2.2. Lectura forzada del codón de stop prematuro	16
2.3. Terapia génica usando virus adeno-asociados (AAV)	18
2.4. Terapia génica con nucleasas	20
2.4.1. Nucleasas dedos de zinc (ZFN)	21
2.4.2. TALEN	22
2.4.3. CRISPR-CAS9	22
2.4.4. Diferencias entre los diferentes tratamientos con nucleasas	24
3. Conclusiones	26
4. Referencias	27

Resumen

La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es uno de los trastornos neuromusculares más comunes dentro de la población, se debe a una mutación en el gen de la distrofina situado en el cromosoma X, afectando a la producción de distrofina, lo que degenera los músculos progresivamente y acorta la vida de quienes lo padecen dándoles una esperanza de vida de 30 años. Actualmente, se está tratando con fármacos derivados de glucocorticoides. Sin embargo, a día de hoy, no existe una cura o tratamiento eficaz que mejore la calidad de vida de las personas que sufren de esta patología. En los últimos años se han desarrollado avances en el campo de la genética que proponen posibles tratamientos más eficaces a los preexistentes, entre ellos destaca la omisión de exón, para lo cual ya se ha desarrollado el medicamento “eteplirsén”, o la lectura forzada de codones de stop con los tratamientos a partir de “gentamicina” o “ataluren”. También, se está considerando la introducción de “mini-distrofinas” y “micro-distrofinas” de forma directa en el cuerpo de los pacientes a través de vectores víricos adeno-asociados (AAV). Además de otros tratamientos basados en nucleasas (ZFN, TALEN o CRISPR) para la reparación celular a través de las vías de unión de extremos no homólogos (NHEJ) o recombinación homóloga (HR).

Abstract

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is one of the most common neuromuscular disorders within the population, is due to a mutation in the dystrophin gene located on the X chromosome, impacting on the production of dystrophin which progressively degenerates the muscles and shortens the life of those who suffer it until the age of 30. Currently, it is being treated with glucocorticoids based drugs. However, nowadays, it doesn't exist an effective cure or treatment that may improve life quality to those who suffer from this pathology. In recent years, advances in the field of genetics have been developed which propose possible more effective treatments than the pre-existing ones, among them stands out exon skipping, for which the drug “eteplirsén” has already been developed, or forced reading of stop codons with treatments made of “gentamicin” or “ataluren”. Also, it is being considered the introduction of "mini-dystrophins" and "micro-dystrophins" directly into the body of patients through adeno-associated viral vectors (AAV). In addition, there are arising other treatments nuclease-based like (ZFN, TALEN or CRISPR) for cell repair through the non-homologous ends junction (NHEJ) or homologous recombination (HR) pathways.

Palabras clave: distrofia, distrofina, Duchenne, genética, tratamientos.

Key words: Duchenne, dystrophin, dystrophy, genetics, treatments.

Fdo:



MARÍA ESCARDA GONZÁLEZ

Abreviaturas

AAV; Virus adeno-asociados

ABD1; Dominio amino terminal de unión a actina

ABD2; Segundo dominio de unión a actina

AON; Oligonucleótidos antisentido

BMD; Distrofia muscular de Becker

CH1 y CH2; Regiones 1 y 2 de homología de calponina

CR; Dominio rico en cisteína

CT; Dominio C-terminal

DbBD; Distrobrevinas

DgBD; Proteína de membrana β -dístroglicano

DGC; Complejo distrofina-glicoproteína

DMD; Distrofia Muscular de Duchenne

Dp260, Dp140, Dp116 y Dp71; Isoformas cortas de la proteína distrofina

Dp427; Isoforma de la proteína distrofina canónica

ECM; Matriz extracelular

H1-H4; Bisagras ricas en prolina de la 1 a la 4

HR; Recombinación homóloga

iPSCs; Células madre pluripotentes inducidas

kb; Kilobase

kDa; Kilodalton

Mb; Megabases

NHEJ; Unión de extremos no homólogos

nNOS; Enzima óxido nítrico sintasa neuronal

PAM; Motivo adyacente protoespaciador

pb; Pares de bases

R1-R24; Repeticiones helicoidales triples similares a la espectrina de la 1 a la 24

SBD; Sintrofinas

sgRNA; RNA de guía corto

tracrRNA; RNA clave

ZFN; Nucleasas dedos de zinc

1. Introducción

La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es uno de los trastornos neuromusculares más comunes, el cual afecta aproximadamente a 1 de cada 3500-5000 niños recién nacidos, esta patología disminuye la calidad de vida de quien la padece y provoca la muerte prematura en el paciente (Cirak *et al.*, 2012; Chamberlain y Chamberlain, 2017). Actualmente no existe un tratamiento para la curar esta distrofia, se están utilizando fármacos derivados de glucocorticoides, los cuales han demostrado mejorar la fuerza muscular y las funciones motoras a corto plazo en los pacientes (Annexstad *et al.*, 2014). Sin embargo, en los últimos años, el campo de la genética ha desarrollado líneas de investigación de posibles terapias que podrían tratar eficazmente este trastorno, reduciendo la gravedad de los síntomas y aumentando la esperanza de vida de quien la padece.

1.1. Objetivos

El objetivo de este trabajo es el dar a conocer los avances en las nuevas terapias génicas orientadas a tratar la DMD, comparar su eficacia y sus posibles ventajas.

1.2. Metodología

Para la recopilación de información se ha recurrido a la base de datos “Pubmed”, realizando la búsqueda a partir de una serie de palabras clave como son: “Duchenne Muscular Dystrophy”, “Dystrophin” o “Gene therapy”. Y se han elegido los artículos en base a su actualidad y grado de impacto, además, se ha tenido en cuenta la relevancia de la revista y que su temática fuera específica del campo de la genética. Aquellos artículos cuyo acceso no fue posible a través de “Pubmed” se accedió a ellos a través de “Google Scholar”. Se han seleccionado un total de 50 artículos, de los cuales un 76% se han publicado dentro de los 10 últimos años, y un 20% de estos en los últimos 2 años.

Además de la ya mencionada “Pubmed”, se han consultado otras fuentes como webs de asociaciones destinadas a la difusión de esta enfermedad, las cuales ofrecen información sobre la enfermedad y los avances en los nuevos tratamientos que están surgiendo. Esta información ha resultado orientativa, pues varios de los artículos aquí recopilados han partido del conocimiento de las novedades terapéuticas que aportaban estos grupos de apoyo en sus webs. Entre algunas asociaciones consultadas destacan “Duchenne Parent Project España” y la “Federación Española de Enfermedades Neuromusculares”, ambas españolas, y “Muscular Dystrophy Association” de Estados Unidos.

1.3. Síntomas

Las primeras manifestaciones de esta enfermedad se observan a la edad de 5 años, entre los primeros síntomas se encuentran: un retraso motor, anomalías en la marcha, caídas frecuentes y dificultad para levantarse del suelo. Se trata de un trastorno muscular progresivo, las fibras musculares sanas se van perdiendo y se reemplazan por fibrosis y grasa, lo que depara en que los tejidos musculares pierdan fuerza. Este debilitamiento muscular afecta tanto a los músculos respiratorios; dando lugar con el tiempo a una insuficiencia respiratoria, como al músculo cardíaco; resultando en una forma de miocardiopatía (figura 1). Hacia los 12 años tendrá lugar la pérdida de la ambulación, y pasados los 20 una muerte prematura por fallo cardiorrespiratorio, en caso de tener acceso a un soporte respiratorio y cardíaco se podría alargar la esperanza de vida, llegando hasta los 30 años de edad. Entre otros síntomas menos frecuentes encontramos la aparición de dificultad en el lenguaje, retraso del desarrollo, disfunción cognitiva y, en ocasiones, problemas gastrointestinales (Aartsma-Rus *et al.*, 2010; Falzarano *et al.*, 2015; Yiu y Kornberg, 2015; Chamberlain y Chamberlain, 2017).

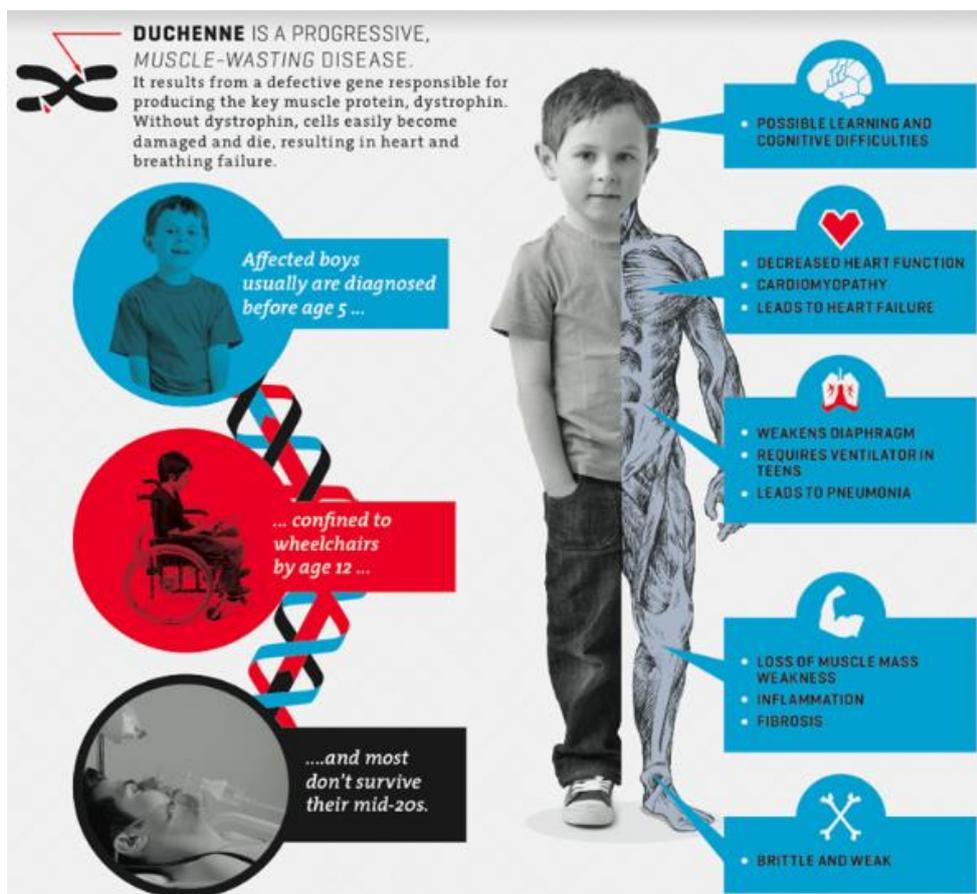


Figura 1: Representación del conjunto de síntomas habituales en un paciente con DMD (Antisense Therapeutics Limited, 2019).

1.4. Gen de la distrofina

La mutación tiene lugar en el gen de la distrofina, el cual se encuentra situado en el brazo corto del cromosoma X, en la región p21. Se trata del gen más grande dentro del genoma humano, abarca 2,4 Mb lo que representa aproximadamente un 1% del DNA del cromosoma. Estructuralmente está compuesto por 8 promotores y 79 exones (figura 2), los cuales se encuentran interrumpidos por grandes intrones que explican el gran tamaño del gen, la proteína que traducirá es la distrofina, con un tamaño de 427 kDa. El mRNA de la isoforma más grande de la distrofina es de 14 kb, que representa un 0,6% del peso total del gen (Aartsma-Rus *et al.*, 2010; Le Rumeur, 2015; Le *et al.*, 2018; Lim *et al.*, 2018).

Esta patología se hereda por un patrón recesivo ligado al cromosoma X, aunque, se cree que un tercio de los casos se deben a mutaciones espontáneas. Las mutaciones que tienen lugar en el gen son las siguientes: deleciones (en un 65% de los casos), duplicaciones (10%), mutaciones puntuales (10%) y otros reordenamientos más pequeños (15%). Estas mutaciones interrumpen el marco de lectura generando una proteína de la distrofina truncada, no funcional (Cirak *et al.*, 2012; Falzarano *et al.*, 2015; Chamberlain y Chamberlain, 2017).



Figura 2; Los 79 exones del gen de la distrofina son representados como: rectángulos; que contienen codones completos, y trapezoides; en los cuales una de dos bases de un codón, la primera o la última, está dividida entre los dos exones adyacentes (Kole y Krieg, 2015).

1.5. La distrofina

El músculo en humanos está compuesto por unas unidades estructurales llamadas sarcómeros, los cuales se extienden longitudinalmente formando miofibrillas que, en conjunto, están cubiertas por un sarcolema o membrana plasmática. La forma de conectar el sarcolema con los

sarcómeros es por medio de unas estructuras llamadas costámeros, las cuales previenen las rupturas de la membrana plasmática durante las contracciones musculares. La proteína distrofina se localiza en la cara citoplasmática del sarcolema, y se ensambla en los costámeros formando parte de un complejo denominado distrofina-glicoproteína (DGC), el cual se encarga de estabilizar la membrana plasmática de las células musculares estriadas o sarcolema, además de proteger las fibras musculares del daño y de la necrosis inducidos por la contracción a largo plazo (Muntoni *et al.*, 2003; Gao y McNally, 2015; Le Rumeur, 2015; Aoki *et al.*, 2016).

Aquellas mutaciones que impliquen la pérdida de función de los genes que codifican la distrofina desencadenan la inestabilidad de la membrana plasmática, resultando en la fuga de componentes celulares como la creatina quinasa desde el interior de las células musculares y la pérdida de las miofibrillas a causa de las frecuentes rupturas de la membrana plasmática durante las contracciones. Entendido esto concluimos que la distrofina es una proteína muy necesaria, pues cumple un papel estructural importante manteniendo unidos los elementos del andamiaje muscular. (Muntoni *et al.*, 2003; Gao y McNally, 2015; Le Rumeur, 2015).

Estructuralmente, la distrofina es una proteína citoplasmática con forma de barra, esta une la red intracelular del citoesqueleto con los componentes transmembrana del DGC, el cual, por medio de la distrofina, une la actina citoesquelética, los microtúbulos y los filamentos intermedios a la matriz extracelular (figura 3). Las proteínas asociadas a la distrofina que forman el complejo se pueden dividir en tres grupos según su localización con respecto a la célula, pudiendo ser: extracelulares, transmembranales o citoplasmáticas (Gao y McNally, 2015; Le Rumeur, 2015).

En el caso de las proteínas extracelulares encontramos el α -dístroglicano, una proteína de membrana periférica extracelular que actúa como receptor para la laminina-2, la cual realiza la función de unir el complejo distrofina-glicoproteína con la matriz extracelular (ECM). El α -dístroglicano se encuentra también estrechamente asociado con el β -dístroglicano, una proteína transmembrana que interactúa con la distrofina, y se encarga de anclarla a la membrana plasmática a la vez que interactúa con las proteínas de la matriz extracelular (figura 3) (Gao y McNally, 2015; Le Rumeur, 2015).

Por otra parte, el β -dístroglicano y el α -dístroglicano se encuentran estrechamente asociados con el subcomplejo sarcoglicano-sarcospan, con posición transmembranal, el cual consiste en un conjunto de proteínas entre las cuales diferenciamos, por una parte, las que forman el complejo sarcoglicano, siendo estas: α -sarcoglicano β -sarcoglicano γ -sarcoglicano y δ -

sarcoglicano, y por otra la proteína sarcospan con la cual forman este subcomplejo sarcoglicano-sarcospan (figura 3). La función de este subcomplejo es principalmente estructural, participando en la transducción de señales y en la mecanoprotección (Gao y McNally, 2015).

En último lugar tenemos la cara citoplasmática del sarcolema, en la que podemos localizar la proteína distrofina, la cual es capaz de mantener su lugar en la membrana al interactuar con el β -dístroglicano. Para estabilizar la membrana plasmática une el DGC al citoesqueleto por la red de actina que, a su vez, interactúa con los ligandos de la matriz extracelular (figura 3). Otros componentes del complejo que se encuentran en la cara citoplasmática son la α -dístrobrevina y dos sintrofinas, las cuales forman un triplete que se asocia con la distrofina y ancla la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) al sarcolema (figura 3). La distrofina cumple una función de señalización importante asociada a esta última enzima, la cual genera grandes cantidades de óxido nítrico cuando es estimulada, el óxido nítrico actúa como un vasodilatador que permite que la sangre llegue al músculo cuando está en contracción. La presencia de la distrofina es crucial para la estimulación de nNOS, pues sin su activación el músculo puede sufrir daños durante su contracción (Gao y McNally, 2015).

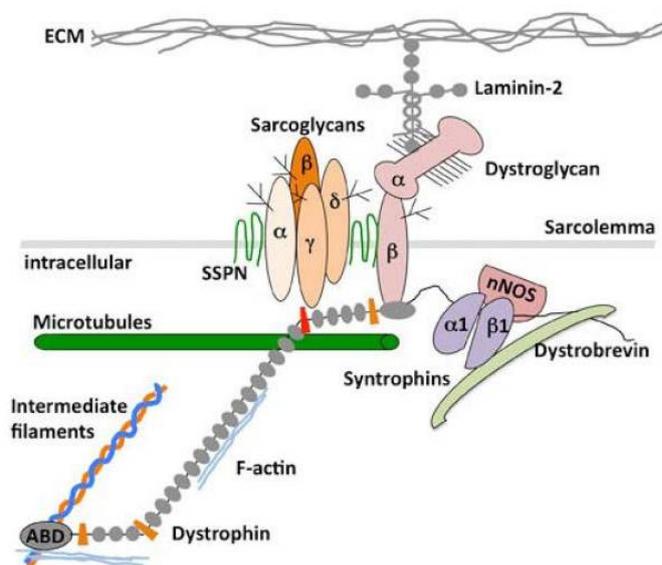


Figura 3: Complejo distrofina-glicoproteína (Gao y McNally, 2015).

La distrofina estructuralmente está formada por cuatro dominios principales; el amino terminal, el dominio de barra central, un dominio rico en cisteína y el terminal carboxilo (figura 4) (Gao y McNally, 2015).

El dominio amino terminal de unión a actina (ABD1) está codificado por los exones del 1 al 8, presenta dos regiones de homología de calponina CH1 y CH2 (figura 4). Este dominio de unión a actina convencionalmente se une directamente a la actina F (figura 3), uniendo a la distrofina con la red de actina subsarcolemal (Gao y McNally, 2015; Le Rumeur, 2015).

El dominio de la barra central se encuentra situado entre ABD1 y el dominio rico en cisteína (CR) (figura 4), se trata de un dominio largo con el que interactúan un gran número de proteínas, entre ellas están: la actina filamentosa, los filamentos intermedios, los microtúbulos y la enzima nNOS (figura 3). Este dominio es codificado por los exones 8 al 61 del gen, está compuesto por un total de 24 repeticiones helicoidales triples similares a la espectrina (R1-R24), las cuales se ven interrumpidas por bisagras ricas en prolina en 4 momentos (H1-H4) que proporcionan elasticidad a la proteína. En el centro de la barra, entre las repeticiones 11 y 17 de espectrina (R11-R17) existe además un segundo dominio de unión a actina (ABD2), el cual colabora con ABD1 para formar una fuerte asociación lateral con los filamentos de actina (figura 4) (Gao y McNally, 2015; Le Rumeur, 2015; Le *et al.*, 2018).

El tercer dominio (CR), se trata de un dominio rico en el aminoácido cisteína y es codificado por los exones 62 a 69 del gen. Este dominio y parte de la bisagra 4 (H4), forman el sitio de unión para la proteína de membrana β -dístroglicano (DgBD), la cual es la proteína asociada más importante para la distrofina (figura 4) (Le Rumeur, 2015; Le *et al.*, 2018).

El dominio C-terminal (CT) se encuentra codificado por los exones 69 a 79, es exclusivo de la distrofina, y contiene sitios de unión para las proteínas citoplasmáticas: sintrofinas (SBD) y distrobrevinas (DbBD) (figura 4), además de interactuar también con α - y β -dístroglicano, y el subcomplejo sarcoglicano-sarcospan (figura 3) (Gao y McNally, 2015; Le Rumeur, 2015; Le *et al.*, 2018).

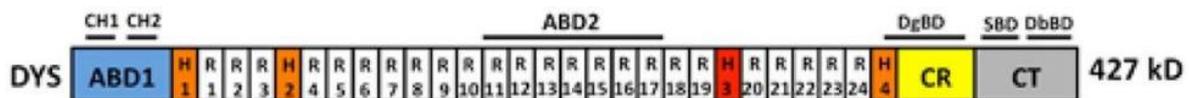


Figura 4: Estructura de la distrofina (Gao y McNally, 2015).

El gen de la distrofina tiene varios promotores que son activos de una manera específica en función del tejido y conducen a la expresión de distrofinas más largas o más cortas. Reconocemos tres isoformas de longitud completa que tienen el mismo número de exones y, además, el gen de la distrofina produce otras isoformas más cortas durante la transcripción primaria a través de eventos de empalme alternativos, es decir, eliminando intrones de forma

selectiva y también por medio de la exclusión de exones en proteínas que parten del mismo promotor. Estos eventos generan una mayor diversidad de proteínas y explican la regulación de expresión de las funciones de distrofina específicas de tejido (Muntoni *et al.*, 2003; Le Rumeur, 2015).

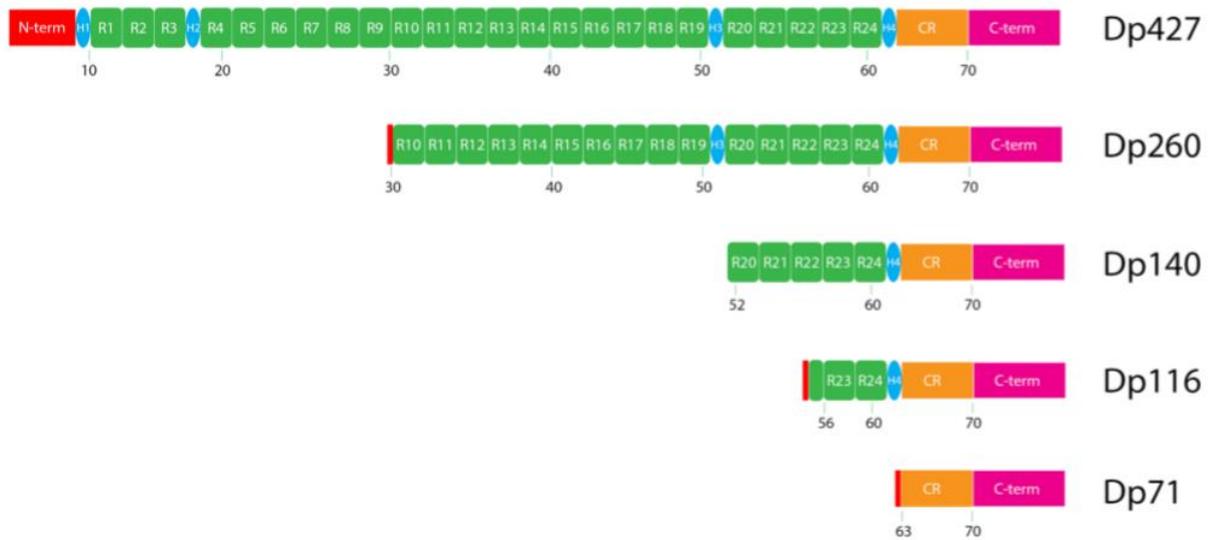


Figura 5: La proteína distrofina canónica, Dp427, y sus diferentes isoformas: Dp260, Dp140, Dp116 y Dp71. En rojo la región N-terminal, en verde las repeticiones de espectrina, en azul las bisagras, en naranja el dominio rico en cisteína y en rosa el dominio C-terminal (Shieh, 2018).

Podemos observar dos grupos de isoformas de la distrofina (figura 5):

- Las isoformas largas de la distrofina (Dp427) se encuentran en el músculo liso, estriado y cardíaco. En ellas, el dominio amino terminal tiene homología con α -actinina y contiene entre 232 y 240 aminoácidos dependiendo de la isoforma.
- Por otra parte, observamos las isoformas cortas, las cuales se encuentran en el cerebro y la retina principalmente. Para estas, el gen de la distrofina tiene cuatro promotores internos, que dan lugar a proteínas de distrofina más cortas carentes del dominio terminal de unión a actina, sin embargo, conservan el dominio carboxilo terminal, el cual contiene los sitios de unión para el distroglicano la distrobrevina, y la sintrofina.

Estas son:

- Dp260 se expresa en altas concentraciones en la retina y genera un producto proteico de 260 kDa.
- Dp140 se expresa en el cerebro, la retina y los tejidos renales, su producto proteico es de 140 kDa.
- Dp116 solo se expresa en nervios periféricos adultos, su producto proteico es de 116kDa.

- Dp71 se detecta en la mayoría de los tejidos no musculares, incluidos el cerebro, la retina, los riñones, el hígado y los pulmones, y está presente en el músculo cardíaco, pero no en el músculo esquelético. Su producto proteico es de 71kDa (Muntoni *et al.*, 2003; Le Rumeur, 2015).

1.6. Distrofia muscular de Becker

Una variante de este trastorno es la Distrofia muscular de Becker (BMD), cuya diferencia genética frente a la Distrofia muscular de Duchenne es que, pese a las mutaciones en el gen, el marco de lectura de su RNA no se ve interrumpido, lo que da como resultado una proteína que conserva el dominio esencial C-terminal y, pese a estar parcialmente truncada, es funcional (figura 6). Esta hipótesis del marco de lectura se sostiene en un 90% de los casos, pues existen casos en los que pacientes con BMD tienen las mutaciones fuera del marco y pacientes con DMD dentro del marco, que generalmente involucran los exones 3-7 (Aartsma-Rus *et al.*, 2010).

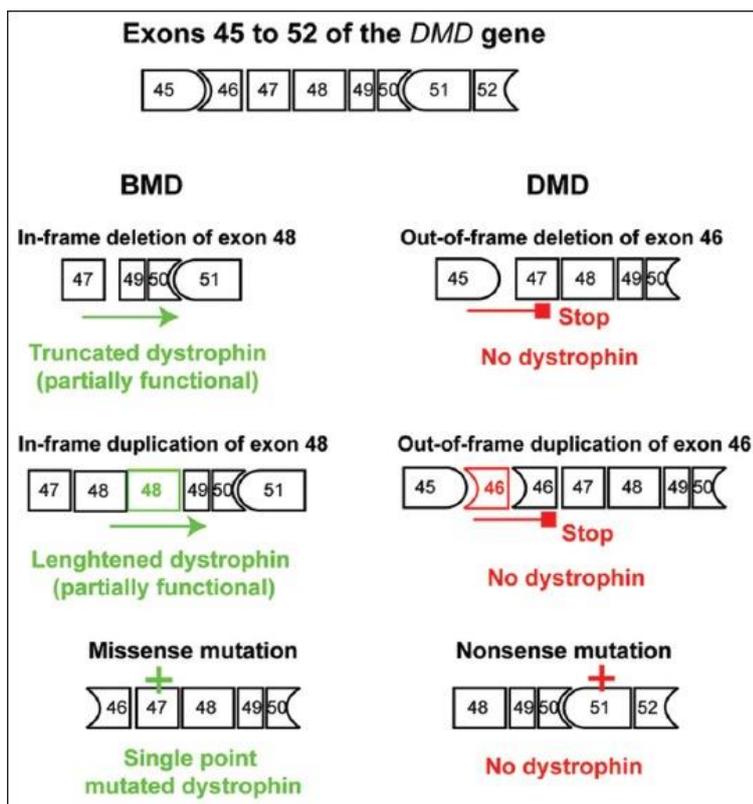


Figura 6: Distintas mutaciones en los exones 45-52 del gen de la distrofina y sus fenotipos correspondientes. Los cuadrados representan exones, aquellos cuyas caras sean lisas indican que el exón codifica un codón completo, mientras que aquellos de caras curvas, su primera o última base necesitan del exón anterior o posterior para codificar un codón completo (Le Rumeur, 2015).

Respecto a las diferencias fenotípicas, los pacientes con BMD expresan un fenotipo de la enfermedad mucho menos grave, además de una progresión más lenta de la misma. Entre los

propios pacientes con BMD observamos también una elevada variedad fenotípica, presentando desde hiperCKemia o elevación de la enzima muscular creatinquinasa (normalmente asintomática), calambres, mioglobina en la orina, y, en ocasiones, una debilidad muscular progresiva simétrica y posterior atrofia. Sabemos que hay zonas dentro del gen de la distrofina que son más imprescindibles que otras, y en función del tipo de mutación y su posición dentro del gen el fenotipo de la enfermedad será diferente. Este razonamiento concluyó en la idea de transformar aquellos fenotipos de DMD más severos en otros de BMD, expresando la mutación en la parte menos vulnerable del gen de la distrofina (Taglia *et al.*, 2015).

2. Terapias génicas para la Distrofia Muscular de Duchenne

A continuación, se presenta una recopilación de las distintas terapias génicas existentes con las que se podría tratar a pacientes con DMD, en función de su orden de aparición tenemos: el salto u omisión del exón, lectura forzada del codón de stop prematuro, la terapia génica con virus adeno-asociados (AAV) y terapia génica con nucleasas, dentro de la cual se encuentran; nucleasas dedos de zinc (ZFN), TALEN y CRISPR-Cas9.

2.1. Omisión del exón

En 1990 nació la idea de manipular el empalme del transcrito en pacientes con DMD, de tal manera que el marco de lectura se restableciera por medio de la omisión de uno o más exones permitiendo la producción de una proteína similar a la de BMD y su conversión a un fenotipo más leve (Aartsma-Rus *et al.*, 2010). En 1996 se reportó que el salto de exón en el gen de la distrofina podría darse utilizando oligonucleótidos antisentido (AON) complementarios a la secuencia de reconocimiento del exón, estos se unen específicamente a su secuencia diana ocultando un exón a la maquinaria de empalme, haciendo que el exón se omita (Pramono *et al.*, 1996). Es en este punto que surge la estrategia conocida como salto de exón u omisión del exón, con la cual, el genoma de pacientes con DMD podría ser modificado, reanudando el marco de lectura a fin de producir una distrofina truncada pero funcional, lo que resultaría en una disminución de los síntomas y generaría un fenotipo de la enfermedad más leve en pacientes (figura 7) (Le Rumeur, 2015).

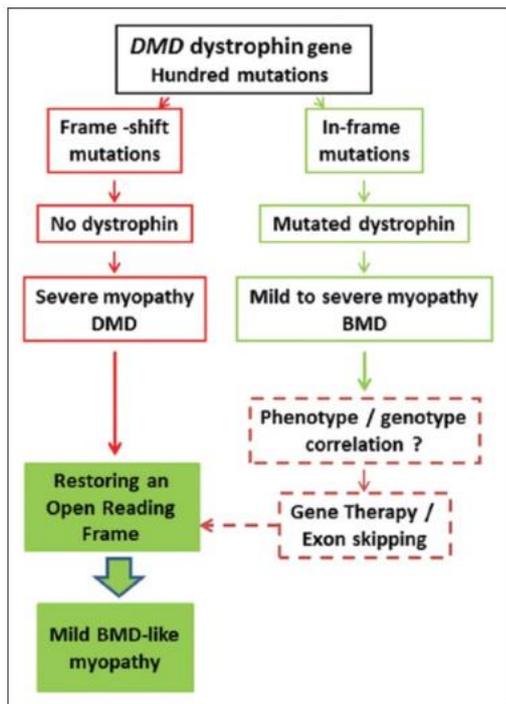


Figura 7: Esquema que representa una posible solución terapéutica para reducir los síntomas en pacientes con DMD, la cual consiste en la reconstrucción del marco de lectura por el salto de exón, lo que generaría una proteína distrofina funcional simulando un fenotipo leve de un paciente con BMD (Le Rumeur, 2015).

En el mRNA de la distrofina las deleciones más frecuentes en pacientes con DMD terminaban en el exón 50 (codón de stop prematuro), y abarcaban los exones 49-50, 48-50, 47-50 y 45-50, además de la deleción en el exón 52, interrumpiendo con ello la traducción del marco de lectura, y evitando la traducción de la distrofina. El salto adicional del exón 51 inducido por el oligonucleótido dirigido al exón 51 (figura 8) restauraría el marco de lectura, lo que se espera que beneficie a un total del 14% de los pacientes con la enfermedad. Por su parte, el salto de otros exones como el 45, 53 y 44 debería beneficiar a un 9%, 8,1% y un 7,6% de los pacientes respectivamente. Aun recuperando el marco de lectura, se espera que produzca una proteína de la distrofina parcialmente suprimida pero funcional (Kole y Krieg, 2015).

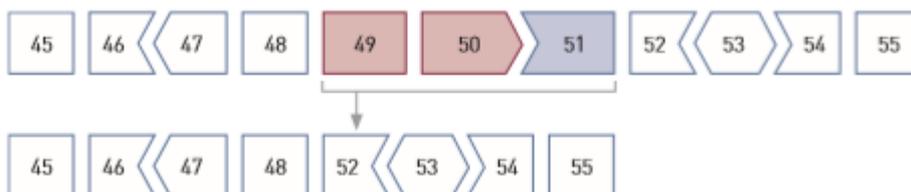


Figura 8: Representación del principio del salto de exón. El paciente presenta una deleción en los exones 49-50. Por medio del bloqueo del exón 51 podemos empalmar los exones 48-52 y a su vez restaurar el marco de lectura, logrando un producto del gen de la distrofina parcialmente funcional (Annexstad *et al.*, 2014).

Esto es conocido como salto de monoexón (figura 8), aunque aparentemente es una buena estrategia para restaurar el marco de lectura y la producción de la distrofina, en ocasiones la

mutación requiere una estrategia distinta. En el siguiente caso (figura 9) podemos ver dos pacientes con mutaciones, el primero con una mutación puntual (DL90.3) y el segundo con una deleción (DL470.2), ambos, por la posición en la que ha tenido lugar la mutación, no se podrían restaurar el marco de lectura con el salto de un solo exón. Por otra parte, el salto de doble exón por la acción combinada de dos AON, permitía restaurar el marco de lectura (Aartsma-Rus *et al.*, 2004).

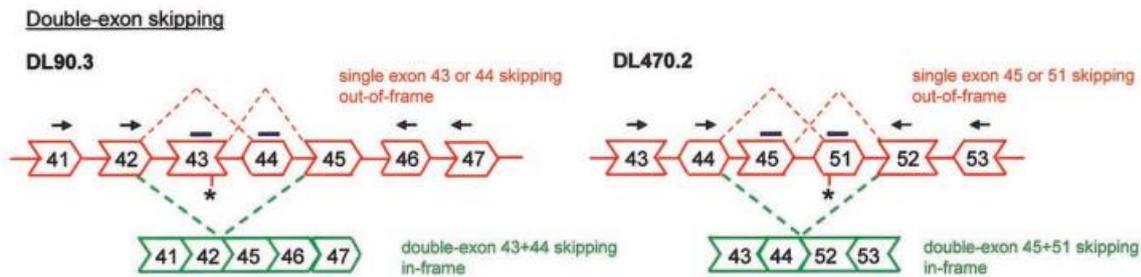


Figura 9: Dos pacientes con mutaciones en el gen de la distrofina: el paciente DL90.3, tiene una mutación puntual en el exón 43 y el paciente DL470.2 presenta una deleción de los exones 46 al 50 (Aartsma-Rus *et al.*, 2004).

Por este mecanismo también es posible restaurar mutaciones por duplicación, la complicación que presentan se encuentra en que el AON que apunta al exón con la duplicación tienen un exón similar adyacente, el duplicado, y es difícil saber a cuál se dirigirá. Como se muestra en la siguiente imagen (figura 10), el salto doble de exón permitiría restaurar el marco de lectura con mayor efectividad que el salto de monoexón, pues en función de la posición de la mutación puede ser conveniente el uso de un exón adicional para restaurar el marco de lectura (Aartsma-Rus *et al.*, 2007).

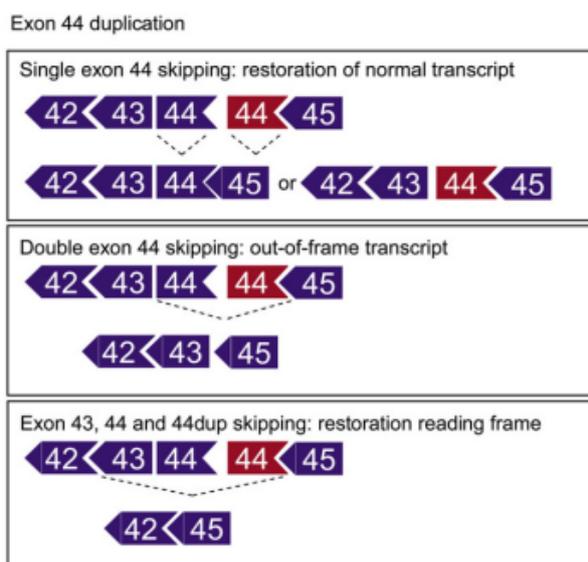


Figura 10: Tres estrategias planteadas para la restauración del marco de lectura y la producción de una distrofina funcional en el caso de un paciente con duplicación en el exón 44 (Aartsma-Rus *et al.*, 2007).

En ocasiones, para lograr mantener el marco de lectura abierto, no siempre es suficiente hacer uso de un solo tipo de AON o dos, sino que es necesario todo un coctel de estos. En el caso que se presenta a continuación (figura 11) tenemos una deleción que va del exón 48 al 50 (ambos incluidos), el resultado de esto es un marco de lectura cerrado y una distrofina disfuncional. Para solucionarlo se han aplicado AON dirigidos a los exones 45-55, lo que restaura el marco de lectura y genera una proteína truncada pero funcional. Esta estrategia es la denominada salto de exón múltiple (Echigoya *et al.*, 2018).

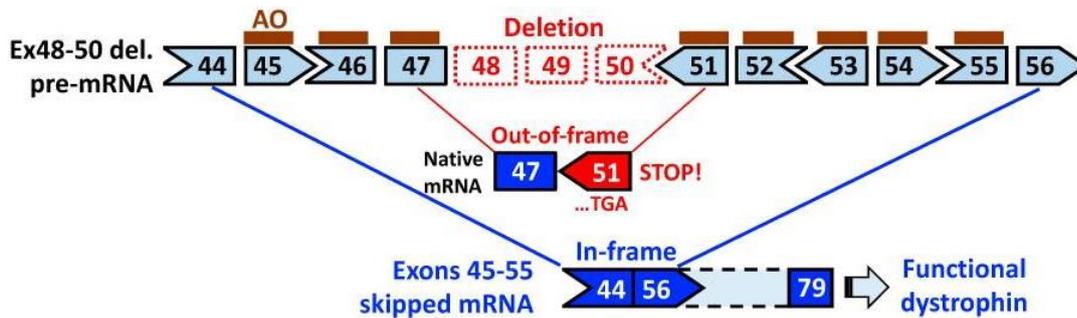


Figura 11: Aplicación de una combinación de AON dirigidos a los exones 45-55 para la restauración del marco de lectura y la producción de una proteína distrofina funcional (Echigoya *et al.*, 2018).

En el trabajo realizado por Bérud y colaboradores en 2007 se estudiaron 254 pacientes con DMD y diferentes deleciones en el gen de la distrofina, observaron que el salto de un solo exón en la restauración del marco de algunas de las deleciones más frecuentes, deparaba en un código de stop prematuro, apoyándose en el estudio de Aartsma-Rus y colaboradores en 2004, el cual afirma que la focalización en 20 eventos de salto de monoexón podría ser beneficioso para un 75% de los pacientes, llegaron a la conclusión de que el salto de exón múltiple puede ser una solución más eficaz al salto de monoexón. Esto extendería significativamente este porcentaje pudiendo abarcar la mayoría de las mutaciones y disminuiría la especificidad de mutación. Esto presenta una limitación para aquellos pacientes con mutaciones potencialmente críticas situadas en los dominios N-terminal o C-terminal ricos en cisteína, y aquellos involucrados en la región promotora, el primer exón o las translocaciones, sin embargo, estas mutaciones son raras, representan solo un porcentaje cercano al 8% de todas las mutaciones (Aartsma-Rus *et al.*, 2004).

Como se observa en la gráfica a continuación (figura 12), se predice que el salto de exón múltiple entre los exones 45-55 rescataría a un 63% de los pacientes con una o más deleciones en este rango del gen y a un 45% de los pacientes totales con DMD, este porcentaje es mayor frente al aproximado 14% de los rescatados por el salto de exón 51 (Bérud *et al.*, 2007).

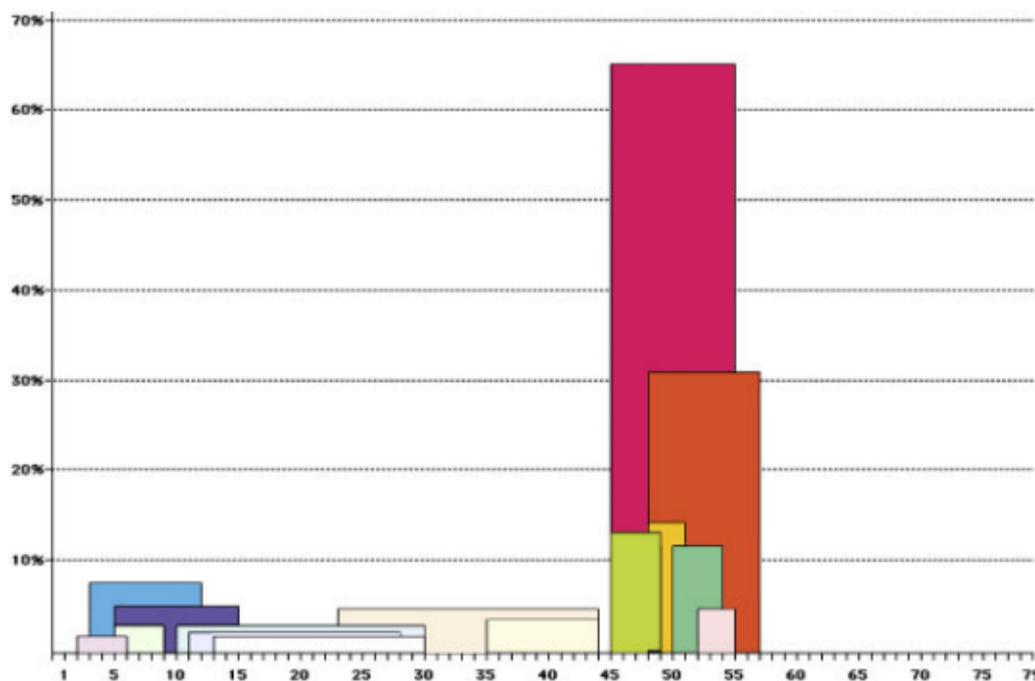


Figura 12: Salto de exón múltiple del gen DMD. El eje X representa los exones del gen de la distrofina. El eje Y es el porcentaje de pacientes que puede rescatar cada salto de multiexón (Béruod *et al.*, 2007).

Respecto a los efectos de la eliminación de los exones 45-55, se ha observado que pacientes con BMD que compartían la delección del exón 45-55 del gen de la distrofina, generalmente muestran una afección muscular menos severa frente a otros fenotipos de la enfermedad. Esta gran supresión muestra un fenotipo mucho menos severo que las delecciones de exones individuales en los pacientes con DMD (Taglia *et al.*, 2015).

Además del ya mencionado punto caliente entre los exones 45-55, existe un segundo en las mutaciones por delección, que se encuentra entre los exones 1-22. Es importante tener esto en cuenta ya que se calcula que entre un 92-96% de las mutaciones de los pacientes comienzan y terminan en exones situados en estos dos puntos calientes (Echigoya *et al.*, 2018).

Respecto a la eficacia que pueden presentar las distintas estrategias, el salto del monoexón ha demostrado un buen potencial terapéutico para corregir el marco de lectura en numerosas ocasiones, reparando el marco de lectura y generando una proteína distrofina truncada pero funcional. Por su parte, el salto de dobles exones, ha probado tener una eficacia similar al salto de monoexón, por lo que su aplicación es idónea en aquellos casos de mutaciones que no puedan repararse por la aplicación de un solo tipo de AON (Aartsma-Rus *et al.*, 2004).

La eficacia del salto de exón múltiple, por otra parte, es más controvertida. Tenemos el ejemplo de un estudio realizado en ratones mdx (un modelo de ratón con una mutación puntual en el gen de la distrofina), los cuales presentaban una mutación en el exón 52. Se les aplicó un cóctel

de AON *in vivo* dirigido a los exones 45-55 durante 18 semanas repitiendo la dosis cada dos semanas, el resultado fue la restauración de un 5-27% (figura 13) de los niveles normales de distrofina acompañados de una mejora en la fuerza muscular (Echigoya *et al.*, 2015).

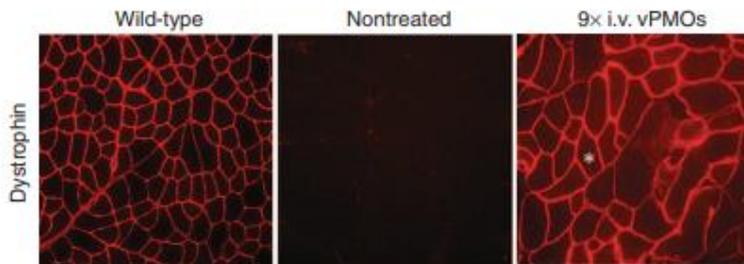


Figura 13: Prueba inmunohistoquímica para la observación de la distrofina en el músculo de ratones: en ratones silvestres (wild-type), en ratones sin tratar con mutación en el exón 52 del gen de la distrofina (Nontreated) y en ratones tratados 9 veces con inyecciones musculares de un conjunto seleccionado de AON dirigido a los exones 45-55 (9x i.v. vPMOs) (Echigoya *et al.*, 2015).

Los resultados son prometedores, sin embargo, en casos de mutaciones por duplicación el salto de exón múltiple resulta especialmente desafiante, pues la transcripción normal solo puede restaurarse por la omisión de varios paquetes de exones, lo que es menos eficiente que la omisión de un solo exón. Además, en las duplicaciones, a parte del exón objetivo hay otro similar adyacente, para el cual el salto de exón sería disruptivo, por lo que resulta difícil saber cuál de los dos ha sido el omitido. También hay que tener en cuenta que en el caso de las duplicaciones se puede restaurar el marco de lectura apuntando a una menor cantidad de exones duplicados, por lo que en estas sería más adecuado el salto de mono o dobles exones (Aartsma-Rus *et al.*, 2007).

De una selección de diseños de estructuras químicas análogas a oligonucleótidos que han sido probadas como agentes antisentido se han obtenido distintos AON complementarios, los cuales han sido desarrollados para conferirles una resistencia a la nucleasa, sin intervenir en la habilidad para hibridar con la zona diana correcta. Entre ellos destacan 2'OMe(PS) y PMO, son los más estudiados y actualmente se están utilizando en ensayos clínicos (figura 14) (Cirak *et al.*, 2012; Falzarano *et al.*, 2015; Echevarría *et al.*, 2018).

Respecto a su diferencia más destacada, encontramos que 2'OMe(PS) tiene carga negativa, por lo que presenta una mayor solubilidad, cualidad que le permite formar complejos con lípidos y otras proteínas catiónicas, en particular, se unen y modulan receptores de células inmunológicas lo que da como respuesta una serie de efectos secundarios asociados a inflamación y daño hepático. Por su parte, PMO no está cargado a pH fisiológico, lo que lo hace menos reactivo y

evita posibles interacciones inespecíficas con los componentes celulares (Heemskerk *et al.*, 2009; Falzarano *et al.*, 2015; Kole y Krieg, 2015).

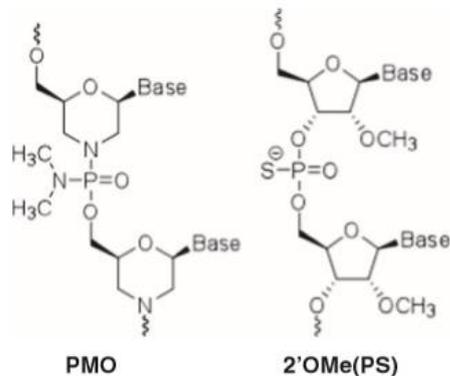


Figura 14: A la izquierda PMO, y a la derecha 2'OMe(PS) (Kole y Krieg, 2015).

En el trabajo realizado en 2009 por Mitrapant y colaboradores sobre ratones mdx, se comparó la eficiencia de PMO y 2'OMe(PS) *in vivo* e *in vitro*. PMO probó poder restaurar la síntesis de la proteína distrofina en su longitud casi completa tanto en células miogénicas en cultivo como en condiciones *in vivo*. Además, las PMO destacaron en la parte de trabajo *in vivo*, pues sus propiedades no-iónicas les proporcionaban una estabilidad y eficiencia para la inducción de proteínas constante y sostenida en el tiempo frente a la demostrada por las 2'OMe(PS).

2.1.1. Eteplirsén (Exondis 51)

El eteplirsén o Exondis 51 es un tratamiento basado en el salto de exón, también es la primera terapia para la distrofia muscular de Duchenne que ha sido aprobada por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos. Se compone de un tipo de AON del tipo PMO de 30 nucleótidos, los cuales hibridan con el exón 51 y hacen que se omita durante el empalme, corrigiendo el marco de lectura y produciendo distrofinas funcionales acortadas (Lim *et al.*, 2017).

Entre algunos beneficios, se observa una mejoría en la marcha de aquellos pacientes tratados (figura 15), pues al cabo de 4 años de tratamiento el 83% del grupo de paciente tratados con eteplirsén podían caminar, siendo solo un 15% dentro del grupo control, además, dentro del grupo que mantenía la ambulación, los tratados eran capaces de caminar 165 m más en 6 minutos frente al grupo control (Young y Pyle, 2016).

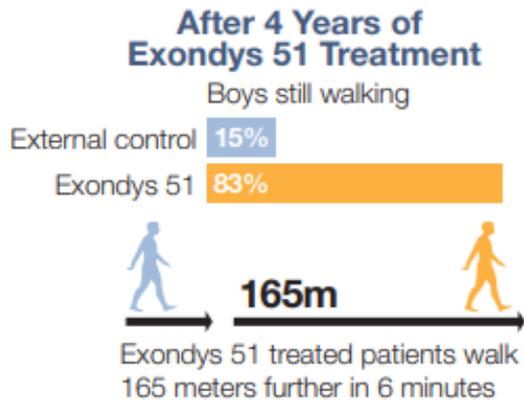


Figura 15: Resultado de un estudio de ambulaci3n en pacientes tratados con Exodys 51. Existe un mayor porcentaje de ambulantes en el grupo medicado frente al control, y se ha aumentado el recorrido de la marcha en aquellos individuos en los que se ha administrado el Exodys 51 (Young y Pyle 2016).

Adem1s de esto, por su naturaleza qu1mica, las PMO presenta una seguridad adicional asociada al hecho de que carecen de carga a pH fisiol3gico, lo que las hace, en gran medida, incapaces de interactuar con otras prote1nas (Lim *et al.*, 2017).

Por otra parte, la aprobaci3n acelerada de este medicamento se ha basado en un aumento de menos de un 1 % de la prote1na distrofina, no alcanzando el 30% necesario para proporcionar al paciente una mejora en su calidad de vida, por lo que este medicamento est1 lejos de ser curativo. Adem1s, es de utilidad solo para un sector concreto de pacientes con esta patolog1a, pues resulta 1nicamente adecuado para aquellos que presentan deleciones que terminan en el ex3n 50 y comienzan en el 52, lo que abarcar1a un 20,5% de los pacientes con mutaciones por delec3n, y un 14% de los pacientes totales con DMD (Lim *et al.*, 2017).

2.2 Lectura forzada del cod3n de stop prematuro

Otro enfoque es el de ignorar los codones de stop formados prematuramente, pues el 25% de los pacientes con DMD llevan peque1as mutaciones puntuales dentro de un ex3n y en un 10-15% de todos los pacientes con estas mutaciones sin sentido se produce un cod3n de stop prematuro (PTC) (figura 16). Este es adem1s un planteamiento que no solo ser1a aplicable a pacientes con DMD, pues 55 mutaciones sin sentido que conducen a codones de terminaci3n prematura son responsables de hasta el 30% de los trastornos gen1ticos heredables (Aartsma-Rus *et al.*, 2010).

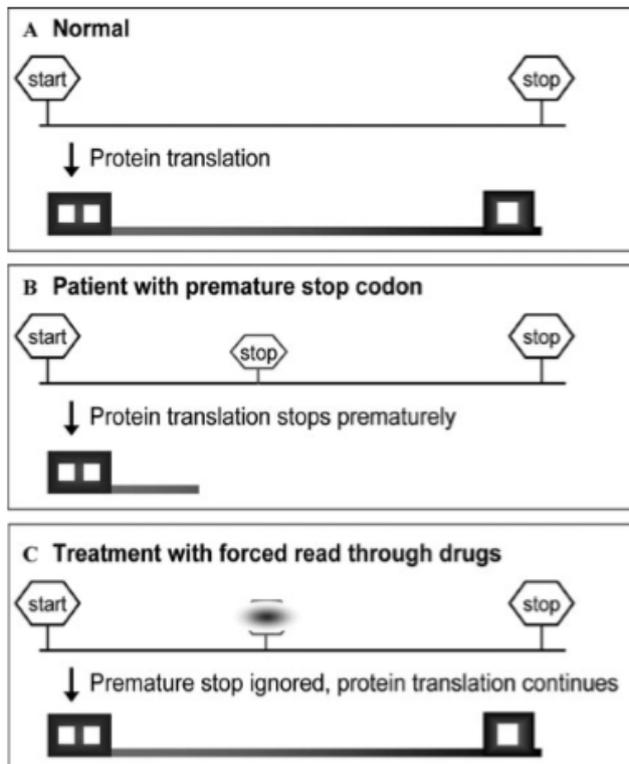


Figura 16: A; La traducción de la proteína completa a partir de un mRNA sin codones prematuros. B; La traducción de una proteína incompleta por la presencia de una mutación que resulta en un codón de stop prematuro en el mRNA. C; La proteína completa traducida en un mRNA con un codón de stop prematuro pero reprimido gracias al tratamiento con fármacos (Aartsma-Rus *et al.*, 2010).

Se ha descubierto que los antibióticos de la clase aminoglucósidos podrían obligar a las células normales y aberrantes a ignorar los codones de stop durante la traducción de proteínas. Hasta el momento, la mayoría de las investigaciones se han realizado con gentamicina, un antibiótico aminoglucósido que interactúa con la maquinaria de traducción, concretamente con la subunidad ribosómica 40S, cuando reconoce un codón de stop. Esta interacción induce la introducción de un aminoácido en los codones de stop en el mRNA y, por lo tanto, permite que continúe la traducción del mRNA (Aartsma-Rus *et al.*, 2010; Pichavant *et al.*, 2011; Namgoong y Bertoni, 2016).

En un estudio realizado por Malik y colaboradores en 2010 se observó la eficacia de este antibiótico en ratones mdx, los resultados mostraron una disminución del 50% de la creatina quinasa y una recuperación de hasta un 13-15% de los niveles normales de distrofina. Sin embargo, en estudios paralelos existe una gran variabilidad dentro de los resultados, esto se asocia a la presencia de concentraciones diferentes de isómeros de gentamicina, pues cada isómero tiene una potencia diferente y, por lo tanto, muchas veces no es la suficiente. Además, los resultados también se ven afectados por el hecho de que la respuesta del antibiótico se ve determinada en parte por el tipo de codón de stop. Por lo tanto, dado que la gentamicina tiene

efectos variables y exhibe también cierta toxicidad, se busca encontrar derivados más efectivos y menos tóxicos a este medicamento (Aartsma-Rus *et al.*, 2010; Pichavant *et al.*, 2011).

El Ataluren (PTC124) (figura 17), es una molécula que, aunque funciona y actúa de forma similar a la gentamicina, se diferencian en que este se une a la subunidad ribosómica 60S además de presentar una ausencia de toxicidad en pacientes y una buena tolerancia (Aartsma-Rus *et al.*, 2010; Pichavant *et al.*, 2011).

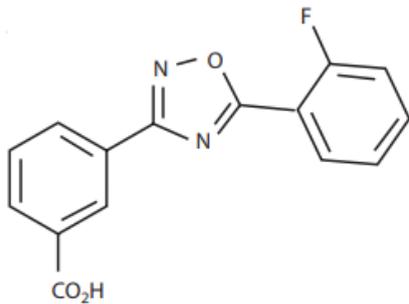


Figura 17: Ataluren: 3-[5-(2-fluorophenyl)-[1,2,4]oxadiazol-3-yl]-benzoic acid (Peltz *et al.*, 2013).

En el experimento realizado por Welch y colaboradores en el año 2007 se puso a prueba la eficacia de PTC124, valorando su capacidad de restauración de la distrofina en células de pacientes con DMD humanos y ratones. En los ratones la restauración fue de hasta un 60% en la relación distrofina:miosina, acompañado de un descenso en la concentración de creatina kinasa sérica y un aumento de un 25% en la distrofina.

Este tratamiento, a diferencia de en otros países de la Unión Europea, no está subvencionado por la sanidad española. Esto se debe a que en el año 2017 se rechazó su financiación apoyándose en el informe de posicionamiento terapéutico generado por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, en el cual se mencionaba que las evidencias de la eficacia del Ataluren eran frágiles y, por lo tanto, insuficientes (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2017).

2.3. Terapia génica usando virus adeno-asociados (AAV)

Dentro de la terapia génica se ha empezado a considerar el uso de los virus adeno-asociados (AAV), los cuales poseen la cualidad de que pueden intervenir en la transfección de material genético a las células. Estos se tratan de unos miembros de la familia de los parvovirus cuya cepa silvestre tiene un genoma de DNA monocatenario de 4,7 Kb, el cual posee genes *red* y *cap* necesarios para la replicación y encapsidación del DNA, sin embargo, requiere la ayuda de un virus auxiliar para replicarse. Para convertir este virus en un vector de suministro de genes

se requiere reemplazar los genes *cap*, manteniendo a su vez las repeticiones terminales invertidas que flanquean el genoma del virus, lo que conservaría la replicación y empaquetamiento en la cápside (Ramos y Chamberlain, 2015).

Una limitación de los AAV es su escasa capacidad de empaquetamiento de genoma exógeno (4,8 Kb), esto supone un problema pues el cDNA de la distrofina es especialmente grande (14 Kb) (Odom *et al.*, 2011).

Sin embargo, se han estudiado pacientes con BMD cuyas células generan pequeñas distrofinas teniendo grandes mutaciones internas. Estas observaciones condujeron al diseño de las llamadas 'micro-distrofinas' más pequeñas que la proteína original, que sí podrían administrarse por medio de vectores AAV (figura 18) (Ramos y Chamberlain, 2015).

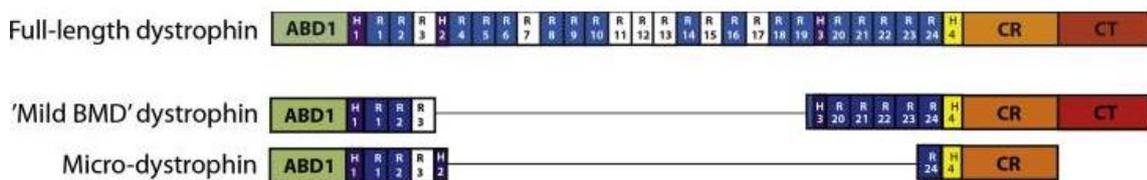


Figura 18: Arriba se muestra el gen de la distrofina en su longitud completa. En el medio tenemos el gen de la distrofina de un paciente con un fenotipo de BMD leve, el cual lleva una deleción genómica que eliminó los exones 17-48. Abajo la estructura de una micro-distrofina (Chamberlain y Chamberlain, 2017).

Dentro de los tipos de micro-distrofinas podemos observar una gran variabilidad, siendo algunas poco eficientes, mientras que otras se muestran altamente funcionales y estables, ayudando a mantener la morfología muscular dentro de la normalidad. Apoyando esta hipótesis se encuentran varios estudios que indican que las distrofinas más pequeñas son funcionales incluso en presencia de otras distrofinas, lo que sugiere que funcionarían para la terapia génica de la BMD y la DMD (Ramos y Chamberlain, 2015).

Por otra parte, las micro-distrofinas han manifestado algunas limitaciones como la incapacidad de ensamblar el complejo distrofina-glicoproteína o de soportar las propiedades normales de señalización y mecánica muscular. (Ramos *et al.*, 2019).

Actualmente se está considerando otra alternativa a las micro-distrofinas; las mini-distrofinas; las cuales proporcionan una función fisiológica mejorada frente a las micro-distrofinas, posibilitando la introducción y expresión de proteínas truncadas de la distrofina de mayor longitud, lo que podría emular mejor las isoformas de longitud completa (Odom *et al.*, 2011). Este concepto es apoyado por aquellos pacientes cuyas mutaciones codifican proteínas similares a la mini-distrofina, en el trabajo realizado por England y colaboradores en 1990, se

observó que la delección de los exones 17- 48 en el gen de la distrofina de un varón de 61 años generaba una proteína truncada altamente eficaz, presentando un fenotipo de BMD leve.

Para el trabajo con mini-distrofina, grupos de estudio han planteado el uso de múltiples vectores que permitan la generación de transcripciones más grandes. Es por primera vez en el trabajo realizado por Odom y colaboradores en 2011, que por medio de dos vectores de AAV recombinante se indujo la expresión de una mini-distrofina de 7,4 Kb, ocasionando una mejoría notable en la musculatura de los individuos.

Además, de esto, también está presente el desafío de la administración eficaz a todas las células de los músculos estriados del cuerpo, los cuales constituyen casi el 40% de la masa corporal (Odom *et al.*, 2011; Chamberlain y Chamberlain, 2017). En 1999, Greelish y colaboradores lograron la reconstrucción genética de una extremidad en un modelo de hámster cardiomiopático a partir de vectores adenovirales inyectados de forma masiva sin generar una respuesta inmune o inflamación aparente. A partir de aquí se comenzó a considerar la entrega de vectores adenovirales a las células del cuerpo por medio del sistema vascular, sin embargo, estudios adicionales con vectores adenovirales han revelado dificultades para la transferencia eficaz a genes musculares, la inducción de una respuesta inmune residual y la pérdida lenta de la expresión génica (Chamberlain y Chamberlain, 2017).

Pese a esto, muchos laboratorios se enfocan en el diseño de nuevos vectores adenovirales, entre los cuales, los AAV han demostrado poder conducir a la expresión a largo plazo en la musculatura (Chamberlain y Chamberlain, 2017).

2.4 Terapia génica con nucleasas

Las nucleasas son enzimas hidrolasas que catalizan la ruptura de los enlaces fosfodiéster, por lo que tienen la capacidad de realizar cortes en el material genético, es por esto que en los últimos años se han diseñado terapias a partir de nucleasas artificiales para lograr la edición de la información genética.

A partir de estas se realiza un corte de doble cadena en el DNA, lo que provoca una ganancia de función o la pérdida de la misma. Actualmente para lograr esto existen dos vías principales: la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la recombinación homóloga (HR). La unión de extremos no homólogos da como resultado la generación de pequeñas inserciones o delecciones (indeles), mientras que la vía de recombinación homóloga utiliza una plantilla de reparación

que contiene el segmento del DNA que se quiere incorporar (figura 19) (Hotta, 2015; Chen *et al.*, 2016).

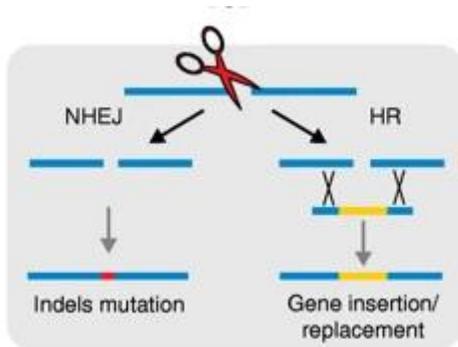


Figura 19: Se muestran los dos mecanismos de actuación de las nucleasas artificiales: la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la recombinación homóloga (HR) (Zhang *et al.*, 2018).

En ambos casos es necesario el uso de un sistema capaz de detectar la secuencia diana a escindir y una enzima nucleasa que realice el corte. Actualmente son tres los tratamientos diseñados a partir de nucleasas para la restauración genética: nucleasas dedos de zinc (ZFN), TALEN y CRISPR-Cas9.

2.4.1 Nucleasas dedos de zinc (ZFN)

El dominio del dedo de zinc es uno de los dominios de unión al DNA más abundante en mamíferos. Para apuntar a una secuencia de interés se conjugan tres o cuatro dominios de dedo zinc con un dominio nucleasa (normalmente la nucleasa *FokI*), llegando a formar la nucleasa de dedo de zinc (ZFN) (figura 20) (Hotta, 2015).

El dominio *FokI* solo es capaz de escindir el DNA cuando se dimeriza, por lo que se usan dos nucleasas de dedos de zinc (ZFN), aumentando más la especificidad del dominio y reparando el marco de lectura de la distrofina (Hotta, 2015).

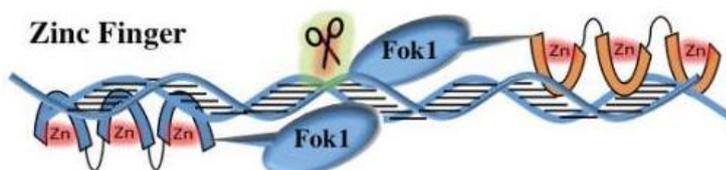


Figura 20: ZFN consiste en un dominio de unión a DNA de dedo de zinc y un dominio de escisión de DNA de la endonucleasa de restricción *FokI*, el reconocimiento es por medio de la proteína de dedo de zinc (interacción proteína-DNA) (Chen *et al.*, 2016).

La primera vez que se logró la reparación del marco de lectura por medio de la nucleasa dedo de zinc, fue en el año 2013, en un trabajo realizado por Popplewell y colaboradores, en el cual se introdujeron exones en el gen de la distrofina de mioblastos humanos con DMD por medio de una meganucleasa, lo que sugiere un potencial terapéutico prometedor en pacientes con deleciones de múltiples exones.

2.4.2 TALEN

El dominio TALE tiene una estructura única por su dominio de unión al DNA, se caracteriza por sus repeticiones en tándem de residuos de aminoácidos o diresiduos variables repetidos, cada uno de los cuales reconoce una secuencia de nucleótidos específica. La conjugación del dominio TALE con la nucleasa *FokI* se conoce como TALEN (figura 21), proporciona una plataforma de unión al DNA muy flexible a la hora de designar una secuencia específica diana (Hotta, 2015).

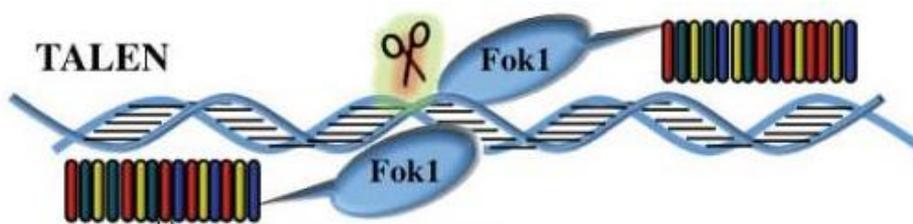


Figura 21: TALEN fusiona de manera similar a ZFN la endonucleasa *FokI* con el dominio de unión al DNA, el reconocimiento tiene lugar por medio de la proteína TALE (interacción proteína-DNA) (Chen *et al.*, 2016).

La reconstrucción mediada por el sistema TALEN tiene lugar solo a través de la vía de reparación NHEJ (figura 19), resulta adecuado para apuntar a la región del dominio central del gen de la distrofina, pues este tolera pequeños truncamientos provocando solo algunos efectos secundarios leves similares a los de pacientes con BMD (Hotta, 2015).

La primera vez que se logró la restauración de la expresión de la distrofina en un gen mutado haciendo uso del sistema TALEN fue en el año 2013, para lo cual se indujo un indel en el exón 51 por la vía NHEJ que fue capaz de reparar el marco de lectura aberrante (Ousterout *et al.*, 2013).

2.4.3 CRISPR-Cas9

El sistema CRISPR-Cas9 se compone de un RNA de guía corto (sgRNA), fusionado con dos unidades de RNA clave (tracrRNA), y una nucleasa Cas9 como componente enzimático. (figura 22) La nucleasa Cas9 se activa con el reconocimiento de la secuencia de DNA objetivo; sgRNA

reconoce el motivo adyacente al protoespaciador (PAM) al final de la secuencia del DNA objetivo, y tiene la capacidad de actuar por las vías NHEJ o HR (Chen *et al.*, 2016).

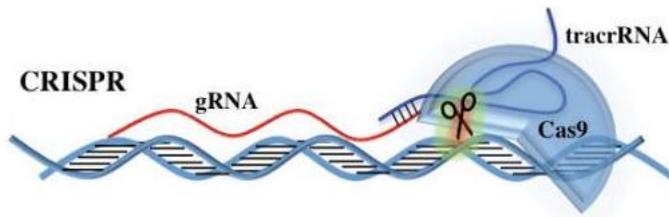


Figura 22: El sistema CRISPR-Cas9 reconoce secuencias de DNA específicas a través de sgRNA (interacción DNA-RNA) (Chen *et al.*, 2016).

Existen dos maneras de llevar a cabo la terapia con CRISPR (figura 23): una es por medio de la edición del genoma *in vivo* a través de la aplicación de la nucleasa Cas9 con dos sgRNAs usando vectores AAV, la otra es por medio de la edición del genoma *in vitro* en células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) derivadas del paciente seguido de una diferenciación en células musculares esqueléticas o cardiomiocitos, las cuales serán aplicables por medio terapia celular local o sistémica (Breitbart y Murry, 2016).

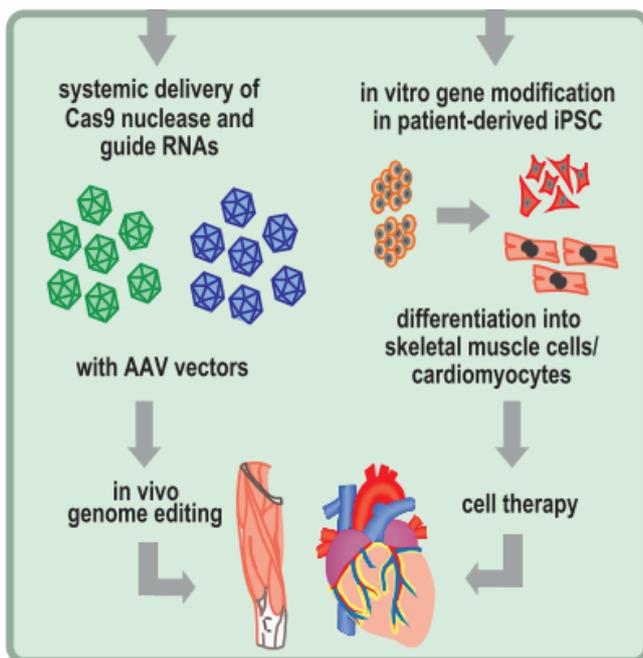


Figura 23: A la izquierda se muestra la edición del genoma *in vivo*, a la derecha *in vitro*, ambas por la técnica CRISPR-Cas9 (Breitbart y Murry, 2016).

Uno de los trabajos más destacados realizado en los últimos años con esta técnica es el de Young y colaboradores en 2016, que ofrece una terapia útil al 60% de los pacientes con DMD, elimina desde el exón 45 al 55 del gen de la distrofina en cardiomiocitos y células musculares esqueléticas transformadas en iPSC. La distrofina generada, probó ser funcional y estable, además, se pudo observar la habilidad para la formación de fibras musculares con distrofina a

partir de la aplicación de terapia celular, para lo cual se realizó un trasplante en modelos de ratón con DMD. Es importante mencionar que, aunque este no sea el caso, ya se han realizado trasplantes de células miogénicas normales a pacientes humanos con DMD; es un tipo de terapia regenerativa que no solo ofrece la posibilidad de restaurar la expresión de distrofina, sino además permite restaurar la fuerza en pacientes sin generar una reacción inmunológica fuerte (Skuk *et al.*, 2004; Skuk *et al.*, 2007).

En humanos sabemos que CRISPR Cas9 con AAV podría restaurar la expresión de la distrofina en células madre pluripotentes humanas inducidas, por otra parte, es necesario saber si esta técnica es factible y segura en pacientes con DMD, para lo cual consideramos aquellos experimentos *in vivo* en otras especies animales que permiten observar el alcance de esta técnica. Entre los más destacados tenemos el realizado por Amoasii y colaboradores en 2018, realizado en perros con el gen de la distrofina mutado, se administraron vectores AAV9 dirigidos al exón 51 en células de los tejidos del músculo esquelético y cardíaco, el resultado osciló entre un 3 a un 92% de restauración de la distrofina dependiendo del tipo muscular, encontrándose los mayores niveles en el músculo cardíaco

Encontramos también otras investigaciones *in vivo* en animales, las cuales se realizaron a partir de Cas9 y sgRNA con AAV en modelos de ratón mdx con DMD, estas se enfocaron en la eliminación del exón 23 mutado del gen de la distrofina, el cual está asociado a DMD en ratones, en ellas se observó un establecimiento correcto de los vectores AAV al músculo esquelético y cardíaco, un aumento notable de las miofibras musculares en el tiempo, el mantenimiento de la restauración de la distrofina y un aumento sostenido de la fuerza muscular por largos períodos de tiempo tras la edición del genoma. Se habla de que un 4%-15% del nivel normal de la distrofina en ratones mdx con DMD es más que suficiente para mejorar la función muscular, en las tres investigaciones se puede observar un aumento de la distrofina dentro de ese rango. Por otra parte, en humanos, el rango es a partir del 30%, porcentaje con el cual se podría lograr un fenotipo normal asintomático (Long *et al.*, 2016; Nelson *et al.*, 2016; Tabebordbar *et al.*, 2016).

2.4.4 Diferencias entre los diferentes tratamientos con nucleasas

Los sistemas ZFN, TALEN y CRISPR-Cas9 tienen en común la presencia de una nucleasa, sin embargo, su diseño les aporta propiedades diferentes que repercuten en su eficacia.

ZFN fue el primero de los tres sistemas en ser diseñado, sin embargo, presenta una serie de limitaciones frente a los otros como es que, a pesar de la identificación de dominios de dedos

de zinc, existen ciertos sesgos o preferencias por ciertas secuencias, lo que limita las secuencias objetivo designables. Esto es determinante, pues cada uno de los sistemas presenta unas preferencias, grado de flexibilidad y direccionamiento distinto respecto a sus secuencias diana. En el siguiente ejemplo (figura 24) se nos muestra la orientación de diferentes nucleasas programables en el exón 45, en función de sus preferencias y requisitos para las secuencias diana usando los sistemas ZFN, TALEN y CRISPR-Cas9. Como se puede observar la nucleasa dedos de zinc ve limitadas sus secuencias dianas frente a CRISPR-Cas 9 y TALEN (Poplewell *et al.*, 2013; Hotta, 2015).

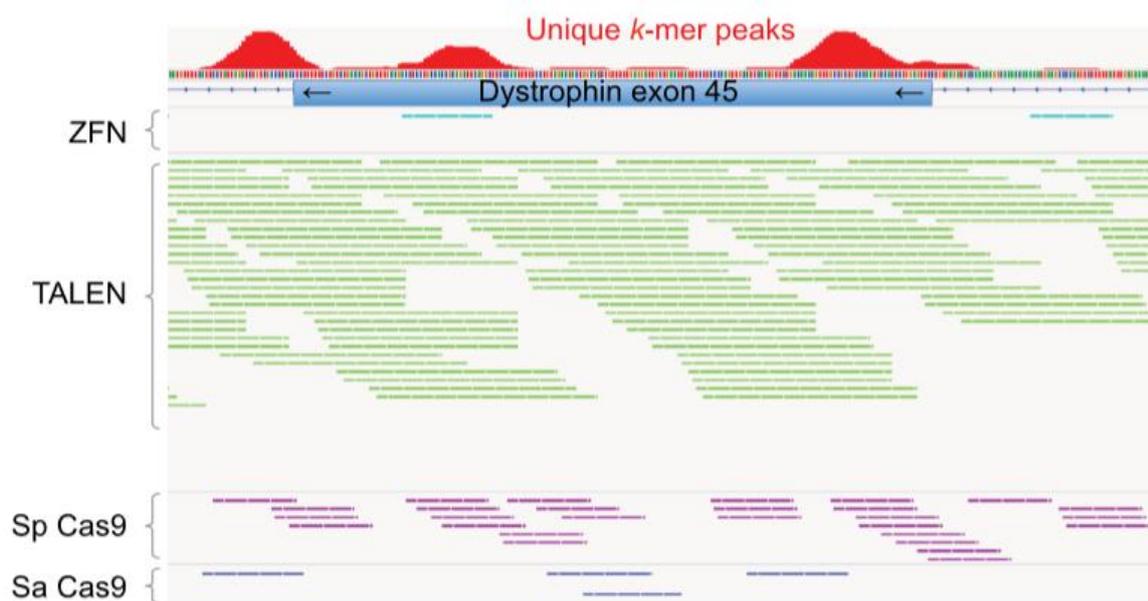


Figura 24: Orientación de nucleasas programables, para los sistemas ZFN, TALEN y CRISPR-Cas9, los cuales muestran preferencias o requisitos para sus secuencias de DNA objetivo (Hotta, 2015).

Uno de los factores más importantes a la hora de elegir una nucleasa es su especificidad y predilecciones de secuencia, pues esto determina el riesgo de mutagénesis fuera del objetivo y la posibilidad de causar toxicidad celular (Poplewell *et al.*, 2013; Hotta, 2015).

CRISPR y TALEN tienen en común que ambos muestran una mayor flexibilidad frente a los ZFN (figura 24), además de una alta tasa de especificidad y bajos niveles de mutagénesis, aun así, CRISPR-Cas9 destaca en especificidad y eficiencia frente a otras terapias (Chen *et al.*, 2016). Si es verdad que esto podría variar en función del trabajo, pues algunos autores defienden que TALEN y CRISPR-Cas9 son igualmente útiles (Li *et al.*, 2015).

Otra cuestión a tener en cuenta es que en el caso de TALEN, solo actúa por medio de la vía NHEJ, la cual presenta una limitación, y es que la predicción del patrón de eliminación es importante, pues se ha identificado un patrón predominante en los eventos de delección que

alberga secuencias de microhomologías en ambos lados del sitio de escisión. El sistema CRISPR-Cas9, por su parte, puede actuar desde ambas vías, NHEJ y HR, lo que le aporta mayor ventaja de actuación frente a TALEN (Hotta, 2015; Chen *et al.*, 2016).

Otra ventaja de CRISPR-Cas9 frente a los otros sistemas es que actúa por medio de la interacción RNA-DNA, a diferencia de la interacción proteína-DNA (propia de TALEN y ZFN), resulta mucho más sencilla y eficiente en el momento de reconocer la secuencia génica objetivo. Además, a la hora de obtener nuevas construcciones de direccionamiento, CRISPR-Cas9 presenta la facilidad de que solo requiere diseñar sgRNA de 20 pb (Chen *et al.*, 2016).

Pese a las numerosas ventajas mencionadas sobre CRISPR-Cas9 frente a otras terapias, es cierto que existen también una serie de limitaciones entre las que están la de apuntar a todos los músculos del cuerpo, incluido el corazón, y, aunque presenta una tasa de mutagénesis baja, algunos estudios defienden que es necesario mejorar la especificidad de esta técnica para la seguridad del tratamiento (Li *et al.*, 2015; Breitbart y Murry, 2016).

3. Conclusiones

La distrofia muscular de Duchenne es una enfermedad crítica, y pese a que actualmente se tiene un mayor conocimiento de esta, los tratamientos que existen siguen siendo meramente paliativos además de poco efectivos, por lo que es necesario un enfoque diferente. Es por esto que el campo de la genética pone a nuestra disposición un tipo de tratamientos alternativos a los actuales, que no solo podrían disminuir los síntomas de forma eficiente, sino además ser permanentes.

Por una parte, tenemos la omisión del exón, el cual ya ha logrado sacar adelante un medicamento; el eteplirsén, que ha demostrado mejorar los síntomas de forma leve tras un largo período de aplicación, pero mejor que cualquiera de los medicamentos a base de glucocorticoides que se encuentran a disposición de los pacientes actualmente. A corto plazo es el que posiblemente, más ventajas nos pueda ofrecer.

A este le siguen los estudios de lectura forzada del codón de stop prematuro, entre los que destacan los tratamientos a partir de Ataluren que es aplicable a aquellos pacientes que presenten una mutación puntual en el gen de la distrofina. El Ataluren ha demostrado tener una alta eficacia a la vez que una baja respuesta inmunológica, lo que ha permitido su legalización por la Unión Europea y ya está disponible en numerosos países. Sin embargo, en España aún

no se ve tan clara la eficiencia de este tratamiento, por lo que podría tardar unos años hasta que se ponga a disposición de los pacientes.

Los tratamientos genéticos con virus adeno-asociados se enfocan en reducir los síntomas que, al igual que los anteriores, generaría un fenotipo más leve de la enfermedad. Pese a la sencillez de este tratamiento aún es necesario trabajar en algunas limitaciones.

Y en último lugar se han desarrollado los tratamientos genéticos con nucleasas, son los más actuales y a diferencia de otros, estos destacan por ofrecer un tipo de tratamiento permanente en el tiempo. En este grupo encontramos tres sistemas: nucleasas dedos de zinc (ZFN), TALEN y CRISPR-Cas9, los cuales difieren en actuación, destacando entre ellos el tratamiento CRISPR-Cas9 por su manejabilidad, eficacia y su baja tasa de mutagénesis.

4. Referencias

Aartsma-Rus, A., den Dunnen, J. T. y van Ommen, G. J. B. (2010) "New insights in gene-derived therapy: the example of Duchenne muscular dystrophy", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1214, pp. 199-212.

Aartsma-Rus, A., Janson, A. A. M., Kaman, W. E., Bremmer-Bout, M., van Ommen, G. J., den Dunnen, J. T. y van Deutekom, J. C. (2004) "Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense", *American Journal of Human Genetics*, 74(1), pp. 83-92.

Aartsma-Rus, A., Janson, A. A. M., van Ommen, G. J. B. y van Deutekom, J. C. T. (2007) "Antisense-induced exon skipping for duplications in Duchenne muscular dystrophy", *BMC Medical Genetics*, 8, pp. 43.

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (2017) *Informe de Posicionamiento Terapéutico de atalureno (Translarna) en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne*. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT-ataluren-Translarna-distrofia-muscular-Duchenne.pdf> (Accedido el 14 de junio de 2020).

Amoasii, L., Hildyard, J. C. W., Li, H., Sanchez-Ortiz, E., Mireault, A., Caballero, D., Harron, R., Stathopoulou, T. R., Massey, C., Shelton, J. M., Bassel-Duby, R., Piercy, R. J. y Olson, E. N. (2018) "Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy", *Science*, 362(6410), pp. 86-91.

Annexstad, E. J., Lund-Petersen, I. y Rasmussen, M. (2014) "Duchenne muscular dystrophy", *Tidsskr Nor Laegeforen*, 134(14), pp. 1361-1364.

Antisense Therapeutics Limited (2019) *Antisense Therapeutics*. Disponible en: <https://www.asx.com.au/asxpdf/20190625/pdf/44630r6yht8gkg.pdf> (Accedido: 21 de junio de 2020).

Aoki, Y., Miyatake, S., Shimizu-Motohashi, Y. y Takeda, S. (2016) "Anti-inflammatory drugs for Duchenne muscular dystrophy: focus on skeletal muscle-releasing factors", *Drug Design, Development and Therapy*, 10, pp. 2745-2758.

Bérout, C., Tuffery-Giraud, S., Matsuo, M., Hamroun, D., Humbertclaude, V., Monnier, N., Moizard, M. P., Voelckel, M. A., Calemard, L. M., Boisseau, P., Blayau, M., Philippe, C., Cossée, M., Pagès, M., Rivier, F., Danos, O., Garcia, L. y Claustres, M. (2007) "Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 5 rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy", *Human Mutation*, 28(2), pp. 196-202.

Breitbart, A. y Murry, C. E. (2016) "Imprecision Medicine: a one-size-fits-many approach for muscle dystrophy", *Cell Stem Cell*, 18(4), pp. 423-424.

Chamberlain, J. R. y Chamberlain, J. S. (2017) "Progress toward gene therapy for Duchenne muscular dystrophy", *Molecular Therapy*, 25(5), pp. 1125-1131.

- Chen, S., Sun, H., Miao, K. y Deng, C. X. (2016) "CRISPR-Cas9: from Genome Editing to Cancer Research", *International Journal of Biological Sciences*, 12(12) pp. 1427–1436.
- Cirak, S., Feng, L., Anthony, K., Arechavala-Gomez, V., Torelli, S., Sewry, C., Morgan, J. E. y Muntoni F. (2012) "Restoration of the dystrophin-associated glycoprotein complex after exón skipping therapy in Duchenne muscular dystrophy", *Molecular Therapy*, 20(2), pp. 462-467.
- Echevarría, L., Aupy, P. y Goyenvalle A. (2018) "Exon-skipping advances for Duchenne muscular dystrophy", *Human Molecular Genetics*, 27, pp. 163-172.
- Echigoya, Y., Aoki, Y., Miskew, B., Panesar, D., Touznik, A., Nagata, T., Tanihata, J., Nakamura, A., Nagaraju, K., Yokota, T. (2015) "Long-Term Efficacy of Systemic Multiexon Skipping Targeting Dystrophin Exons 45–55 With a Cocktail of Vivo-Morpholinos in Mdx52 Mice", *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 4, e225.
- Echigoya, Y., Lim, K. R. Q., Nakamura, A. y Yokota, T. (2018) "Multiple Exon Skipping in the Duchenne Muscular Dystrophy Hot Spots: Prospects and Challenges", *Journal of Personalized Medicine*, 8(4), pp. 41.
- England, S. B., Nicholson, L. V., Johnson, M. A., Forrest, S. M., Love, D. R., Zubrzycka-Gaarn, E. E., Bulman, D. E., Harris, J. B. y Davies, K. E. (1990) "Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin", *Nature*, 343(6254), pp. 180-182.
- Falzarano, M. S., Scotton, C., Passarelli, C. y Ferlini, A. (2015) "Duchenne muscular dystrophy: From diagnosis to therapy", *Molecules*, 20(10), pp. 18168–18184.
- Gao, Q. Q. y McNally, E. M. (2015) "The dystrophin complex: structure, function, and implications for therapy", *Comprehensive Physiology*, 5(3), pp. 1223-1239.
- Greelish, J. P., Su, L. T., Lankford, E. B., Burkman, J. M., Chen, H., Konig, S. K., Mercier, I. M., Desjardins, P. R., Mitchell, M. A. y Zheng, X. G. (1999) "Stable restoration of the sarcoglycan complex in dystrophic muscle perfused with histamine and a recombinant adeno-associated viral vector", *Nature Medicine*, 5, pp. 439–443.
- Heemskerk, H. A., de Winter, C. L., de Kimpe, S. J., van Kuik-Romeijn, P., Heuvelmans, N., Platenburg, G. J., van Ommen, G. J., van Deutekom, J. C. y Aartsma-Rus, A. (2009) "In vivo comparison of 2'-O-methyl phosphorothioate and morpholino antisense oligonucleotides for Duchenne muscular dystrophy exon skipping", *Journal of Gene Medicine*, 11(3), pp. 257-266.
- Hotta, A. (2015) "Genome editing gene therapy for Duchenne muscular dystrophy", *Journal of Neuromuscular Diseases*, 2(4), pp. 343-355.
- Kole, R. y Krieg, A. M. (2015) "Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 29(87), pp. 104-107.
- Le Rumeur, E. (2015) "Dystrophin and the two related genetic diseases, Duchenne and Becker muscular dystrophies", *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 15(3), pp. 14-20.
- Le, S., Yu, M., Hovan, L., Zhao, Z., Ervasti, J. y Yan, J. (2018) "Dystrophin as a molecular shock absorber", *ACS Nano*, 12(12), pp. 12140-12148.
- Li, H. L., Fujimoto, L., Sasakawa, N., Shirai, S., Ohkame, T., Sakuma, T., Tanaka, M., Amano, M., Watanabe, A., Sakurai, H., Yamamoto, T., Yamanaka, S. y Hotta, A. (2015) "Precise correction of the dystrophin gene in Duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9", *Stem cell reports*, 4, pp. 143-154.
- Lim, K. R. Q., Maruyama, R. y Yokota, T. (2017) "Eteplirsén in the treatment of Duchenne muscular dystrophy", *Drug Design, Development and Therapy*, 11, pp. 533–545.
- Lim, K. R. Q., Yoon, C. y Yokota, T. (2018) "Applications of CRISPR/Cas9 for the treatment of Duchenne muscular dystrophy", *Journal of Personalized Medicine*, 8(4), pp. 38.
- Long, C., Amoasii, L., Mireault, A. A., McAnally, J. R., Li, H., Sanchez-Ortiz, E., Bhattacharyya, S., Shelton, J. M., Bassel-Duby, R. y Olson, E. N. (2016) "Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy", *Science*, 351(6271), pp. 400-403.
- Malik, V., Rodino-Klapac, L. R., Viollet, L., Wall, C., King, W., Al-Dahhak, R., Lewis, S., Shilling, C. J., Kota, J., Serrano-Munuera, C., Hayes, J., Mahan, J. D., Campbell, K. J., Banwell, B., Dasouki, M., Watts, V., Sivakumar, K., Bien-Willner, R., Flanigan, K. M., Sahenk, Z., Barohn, R. J., Walker, C. M. y Mendell, J. R.

- (2010) “Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy”, *Annals of Neurology*, 67(6), pp. 771-780.
- Mitropant, C., Fletcher, S., Iversen, P. L. y Wilton, S. D. (2009) “By-passing the non sense mutation in the 4CV mouse model of muscular dystrophy by induced exon skipping”, *Journal of Gene Medicine*, 11, pp. 46–56.
- Muntoni, F., Torelli, S. y Ferlini, A. (2003) “Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes”, *The Lancet Neurology*, 2(12), pp. 731-740.
- Namgoong, J. H. y Bertoni, C. (2016) “Clinical potential of ataluren in the treatment of Duchenne muscular dystrophy”, *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease*, 6, pp. 37-48.
- Nelson, C.E., Hakim, C. H., Ousterout, D. G., Thakore, P. I., Moreb, E. A., Castellanos, R. M., Madhavan, S., Pan, X., Ran, F. A., Yan, W. X., Asokan, A., Zhang, F., Duan, D. y Gersbach, C. A. (2016) “*In vivo* genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy”, *Science*, 351(6271), pp. 403-407.
- Odom, G. L., Gregorevic, P., Allen, J. M. y Chamberlain, J. S. (2011) “Gene therapy of mdx mice with large truncated dystrophins generated by recombination using rAAV6”, *Molecular Therapy*, 19(1), pp. 36–45.
- Ousterout, D. G., Perez-Pinera, P., Thakore, P. I., Kabadi, A. M., Brown, M. T., Qin, X., Fedrigo, O., Mouly, V., Tremblay, J. P. y Gersbach, C. A. (2013) “Reading frame correction by targeted genome editing restores dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy patients”, *Molecular Therapy*, 21(9), pp. 1718–1726.
- Peltz, S. W., Morsy, M., Welch, E. M. y Jacobson, A. (2013) “Ataluren as an agent for therapeutic nonsense suppression”, *Annual Review of Medicine*, 64, pp. 407-425.
- Pichavant, C., Aartsma-Rus, A., Clemens, P. R., Davies, K. E., Dickson, G., Takeda, S., Wilton, S. D., Wolff, J. A., Wooddell, C. I., Xiao, X. y Tremblay, J. P. (2011) “Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD”, *Molecular Therapy*, 19(5), pp. 830-840.
- Popplewell, L., Koo, T., Leclerc, X., Duclert, A., Mamchaoui, K., Gouble, A., Mouly, V., Voit, T., Pâques, F., Cédrone, F., Isman, O., Yáñez-Muñoz, R. J. y Dickson, G. (2013) “Gene correction of a Duchenne muscular dystrophy mutation by meganuclease-enhanced exon knock-in”, *Human Gene Therapy*, 24(7), pp. 692–701.
- Pramono, Z. A., Takeshima, Y., Alimsardjono, H., Ishii, A., Takeda, S. y Matsuo M. (1996) “Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 226, pp. 445–449.
- Ramos, J. y Chamberlain, J. S. (2015) “Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy”, *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 3(11), pp. 1255–1266.
- Ramos, J. N., Hollinger, K., Bengtsson, N. E., Allen, J. M., Hauschka, S. D. y Chamberlain, J. S. (2019) “Development of novel micro-dystrophins with enhanced functionality”, *Molecular Therapy*, 27(3), pp. 623–635.
- Shieh, P. B. (2018) “Emerging strategies in the treatment of Duchenne muscular dystrophy”, *Neurotherapeutics*, 15, pp. 840-848.
- Skuk, D., Goulet, M., Roy, B., Chapdelaine, P., Bouchard, J. P., Roy, R., Dugré, F. J., Sylvain, M., Lachance, J. G., Deschênes, L., Senay, H. y Tremblay, J. P. (2004) “Dystrophin expression in myofibers of Duchenne muscular dystrophy patients following intramuscular injections of normal myogenic cells”, *Molecular Therapy*, 9(3), pp. 475-482.
- Skuk, D., Goulet, M., Roy, B., Chapdelaine, P., Bouchard, J. P., Roy, R., Dugré, F. J., Sylvain, M., Lachance, J. G., Deschênes, L., Senay, H. y Tremblay, J. P. (2007) “First test of a "high density injection" protocol for myogenic cell transplantation throughout large volumes of muscle in a DMD patient, eight months follow-up”, *Neuromuscular Disorders*, 17, pp. 38-46.
- Tabebordbar, M., Zhu, K., Cheng, J. K. W., Chew, W. L., Widrick, J. J., Yan, W. X., Maesner, C., Wu, E. Y., Xiao, R., Ran, F. A., Cong, L., Zhang, F., Vandenberghe, L. H., Church, G. M. y Wagers, A. J. (2016) “*In vivo* gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells”, *Science*, 351(6271), pp. 407-411.
- Taglia, A., Petillo, R., D'Ambrosio, P., Picillo, E., Torella, A., Orsini, C., Ergoli, M., Scutifero, M., Passamano, L., Palladino, A., Nigro, G. y Politano, L. (2015) “Clinical features of patients with dystrophinopathy sharing the 45-55 exon deletion of DMD gene”, *Acta Myologica*, 34(1), pp. 9-13.

Welch, E. M., Barton, E. R., Zhuo, J., Tomizawa, Y., Friesen, W. J., Trifillis, P., Paushkin, S., Patel, M., Trotta, C. R., Hwang, S., Wilde, R. G., Karp, G., Takasugi, J., Chen, G., Jones, S., Ren, H., Moon, Y. C., Corson, D., Turpoff, A. A., Campbell, J. A., Conn, M. M., Khan, A., Almstead, N. G., Hedrick, J., Mollin, A., Risher, N., Weetall, M., Yeh, S., Branstrom, A. A., Colacino, J. M., Babiak, J., Ju, W. D., Hirawat, S., Northcutt, V. J., Miller, L. L., Spatrack, P., He, F., Kawana, M., Feng, H., Jacobson, A., Peltz, S. W. y Sweeney, H. L. (2007) "PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations", *Nature*, 447(7140), pp. 87-91.

Yiu, E. M. y Kornberg, A. J. (2015) "Duchenne muscular dystrophy", *Journal of Paediatrics and Child Health*, 51(8), pp. 759-764.

Young, C. S., Hicks, M. R., Ermolova, N. V., Nakano, H., Jan, M., Younesi, S., Karumbayaram, S., Kumagai-Cresse, C., Wang, D., Zack, J. A., Kohn, D. B., Nakano, A., Nelson, S. F., Miceli, M. C., Spencer, M. J. y Pyle, A. D. (2016) "A single CRISPR-Cas9 deletion strategy that targets the majority of DMD patients restores dystrophin function in hiPSC-delivered muscle cells", *Cell stem cell*, 18(4), pp. 533-540.

Young, C. S. y Pyle, A. D. (2016) "Exon Skipping Therapy", *Cell*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.050>

Zhang, Y., Massel, K., Ian D. Godwin, I. D. y Gao, C. (2018) "Applications and potential of genome editing in crop improvement", *Genome Biology*, 19, pp. 210.