



universidad  
de león



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

**TERAPIA GÉNICA EN LA DISTROFIA  
MUSCULAR DE DUCHENNE**

**GENE THERAPY IN DUCHENNE MUSCULAR  
DYSTROPHY**

María Fernández Fuertes

**GRADO EN BIOLOGÍA**

**Julio, 2021**



## ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	4
3. Metodología.....	5
4. Sintomatología de la distrofia muscular de Duchenne.....	5
5. Terapia génica.....	7
5.1. Adición de genes.....	8
5.2. Salto de exón.....	10
5.3. Edición del genoma.....	18
5.4. Lectura forzada del codón de parada.....	21
5.5. Terapia con células madre.....	23
6. Terapia para patologías secundarias causadas por la DMD.....	24
7. Conclusiones.....	25
8. Bibliografía.....	27



## RESUMEN

La distrofia muscular de Duchenne es un trastorno genético grave y degenerativo que se diagnostica durante la infancia y provoca debilidad muscular progresiva, además de complicaciones respiratorias y cardíacas. Este desgaste del músculo es debido a la falta de distrofina e impide a los niños afectados llevar una vida normal conllevando a una muerte prematura. Esta enfermedad no tiene cura, por lo que para mejorar la calidad de vida de los pacientes y alargar su esperanza de vida se busca la producción de distrofina mediante distintas estrategias de terapia génica. El objetivo de este trabajo es la documentación y comparación de los distintos métodos de terapia génica comprobando su efectividad y que no conlleven efectos secundarios, para ello, se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica en bases de datos científicas. El campo de la terapia génica para la distrofia muscular de Duchenne ha avanzado mucho durante los últimos años, estando actualmente aprobados dos fármacos, eteplirsén y ataluren. Además, se están llevando a cabo ensayos clínicos con otros compuestos que en un futuro podrían ser eficaces para la producción de distrofina. Sin embargo, no todos los ensayos clínicos tienen efectos terapéuticos para el paciente, por lo que se concluye que aún hace falta mucha investigación para dar con fármacos eficaces que puedan combatir la distrofia muscular de Duchenne.

**Palabras clave:** CRISPR/Cas9, Distrofia muscular de Duchenne, distrofina, oligonucleótidos antisentido, salto de exón, terapia génica.

## ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy is a severe and degenerative genetic disorder diagnosed during childhood that causes progressive muscle weakness, in addition to respiratory and cardiac complications. This muscle damage is due to a lack of dystrophin and prevents affected children from leading normal lives resulting in a premature death. This disease has no cure, so to improve the quality of life of patients and extend their life expectancy we look for a dystrophin production through different gene therapy strategies. The aim of this study is the documentation and comparison of the different methods of gene therapy checking the effectiveness and that do not involve side effects, for this a bibliographic search was conducted in scientific databases. The field of gene therapy for Duchenne muscular dystrophy has advanced significantly in recent years with two drugs currently approved, eteplirsén y ataluren. In addition, clinical trials are being carried out with other compounds that could be effective for the expression of dystrophin in the future. However, not all clinical trials have therapeutic effects for the patient, so it is concluded that much research is still needed to find effective drugs that can fight Duchenne muscular dystrophy.

**Keywords:** antisense oligonucleotides, CRISPR/Cas9, Duchenne muscular dystrophy, dystrophin, exon skipping, gene therapy.



## 1. Introducción

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad genética progresiva causada por mutaciones en el gen de la distrofina, las cuales provocan una ausencia de distrofina funcional. La distrofina es una proteína estructural del sarcolema que conecta el citoesqueleto de las fibras musculares a la matriz extracelular; por tanto, actúa como un importante estabilizador de las fibras musculares y las protege del daño durante la contracción (Breitbart y Murry, 2016; Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). El peso molecular de la distrofina es de 427 kDa (Shieh, 2018) y se compone de 3685 aminoácidos (Hotta, 2015).

La distrofina se ensambla con otras proteínas y forma el complejo de proteínas asociadas a la distrofina (DAPC), compuesto por tres subcomplejos (Cirak et al., 2012): el primer subcomplejo está formado por los sarcoglicanos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ), el segundo lo conforman la sintrofina, nNOS y la distrobrevina, y el último subcomplejo comprende el  $\beta$ -dístroglicano y el  $\alpha$ -dístroglicano (Figura 1).

Además de su función estructural, la distrofina tiene un importante papel de señalización ya que está involucrada en la localización de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), enzima que interactúa con la distrofina y la sintrofina, y también regula el flujo sanguíneo en el músculo esquelético según sus necesidades metabólicas (Cirak *et al.*, 2012).

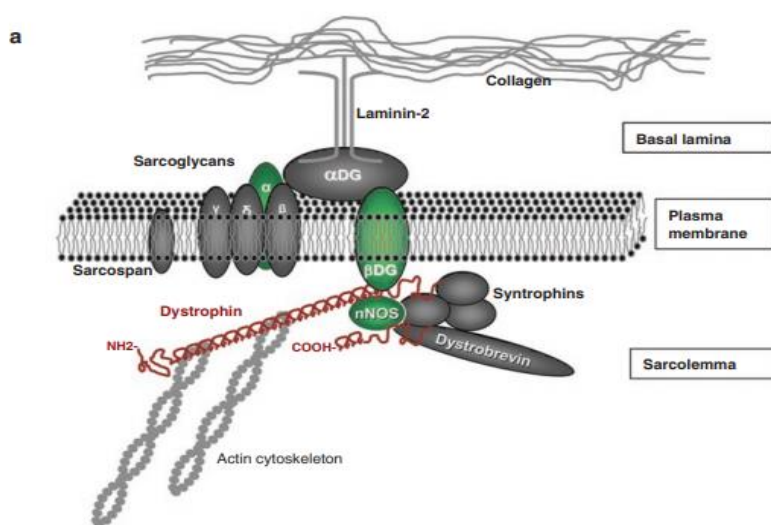


Figura 1. Organización del complejo de proteínas asociadas a la distrofina (DAPC) en la fibra muscular (Cirak *et al.*, 2012).



La proteína está formada por cuatro dominios funcionales (Nelson *et al.*, 2009; Cirak *et al.*, 2012; Camacho Salas, 2014), como se puede apreciar en la figura 2: el amino-terminal, el dominio en bastón, el dominio rico en cisteína y el carboxilo-terminal. El dominio amino-terminal se encarga de la unión a la actina, mientras que el carboxilo terminal se une a la sintrofina y distrobrevina (Le Rumeur, 2015), dos proteínas citoplasmáticas implicadas en la señalización celular. En posición central, el dominio en bastón, consistente en repeticiones de espectrina que forman triples hélices (Hotta, 2015). El dominio rico en cisteína contiene los sitios de anclaje al  $\beta$ -dístroglicano y consiste en dominios WW, mano EF y ZZ (Le Rumeur, 2015); todos ellos requeridos para la unión del  $\beta$ -dístroglicano (Cirak *et al.*, 2012).

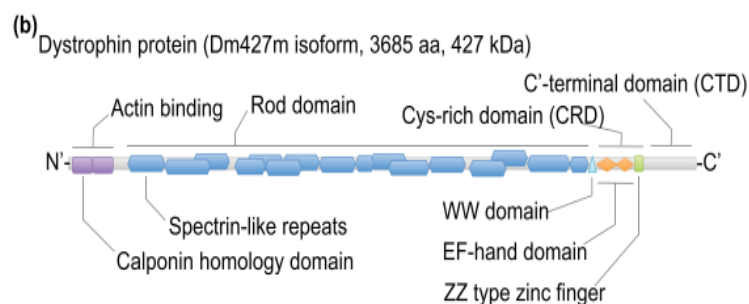


Figura 2. Estructura de la proteína distrofina (Hotta, 2015).

El gen de la distrofina, gen DMD (Figura 3), se encuentra en Xp21.2 (González-Huerta *et al.*, 2004), es el gen más grande encontrado en humanos (Falzarano *et al.*, 2015; Le Rumeur, 2015; Kole y Krieg, 2015) con un tamaño de 2,2 Mb (Ramos *et al.*, 2019), formado por 79 exones y 78 intrones (Hotta, 2015).

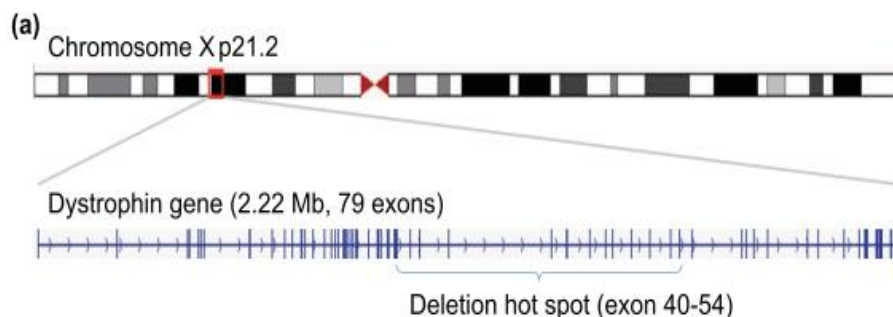


Figura 3. Estructura del gen de la distrofina (Hotta, 2015).



Debido a su gran tamaño y al complejo proceso para producir la distrofina es propenso a la aparición de mutaciones (Shieh, 2018). Las mutaciones pueden ser debidas a una duplicación (10%) o a mutaciones puntuales, pero la mayoría de las mutaciones en el gen de la distrofina son deleciones intragénicas (65-70%) en uno o más exones y principalmente agrupadas en 2 puntos calientes: entre los exones 45 y 55, y entre los exones 2 y 19 (Breitbart y Murry, 2016). Estas mutaciones pueden provocar o no una interrupción del marco de lectura del gen (Breitbart y Murry, 2016). Si no se interrumpe el marco de lectura, la proteína que se produce será más pequeña o parcialmente funcional, pero se producirá, esto da lugar a otro tipo de distrofia muscular más leve, la distrofia muscular de Becker (BMD) (Círak *et al.*, 2011).

Algunos de los exones del gen DMD tienen los codones divididos entre dos exones adyacentes (Figura 4), es decir, uno o dos nucleótidos del codón terminal se encuentran en un exón y el tercer nucleótido del triplete se encuentra en el exón contiguo (Kole y Krieg, 2015). Esto acarrea graves consecuencias a la hora de la traducción de la distrofina, ya que si se produce una deleción y el marco de lectura se interrumpe porque parte de un codón permanece en el exón adyacente al eliminado, el mRNA codifica para una proteína no funcional (Breitbart y Murry, 2016) la cual será degradada por el proteasoma celular.

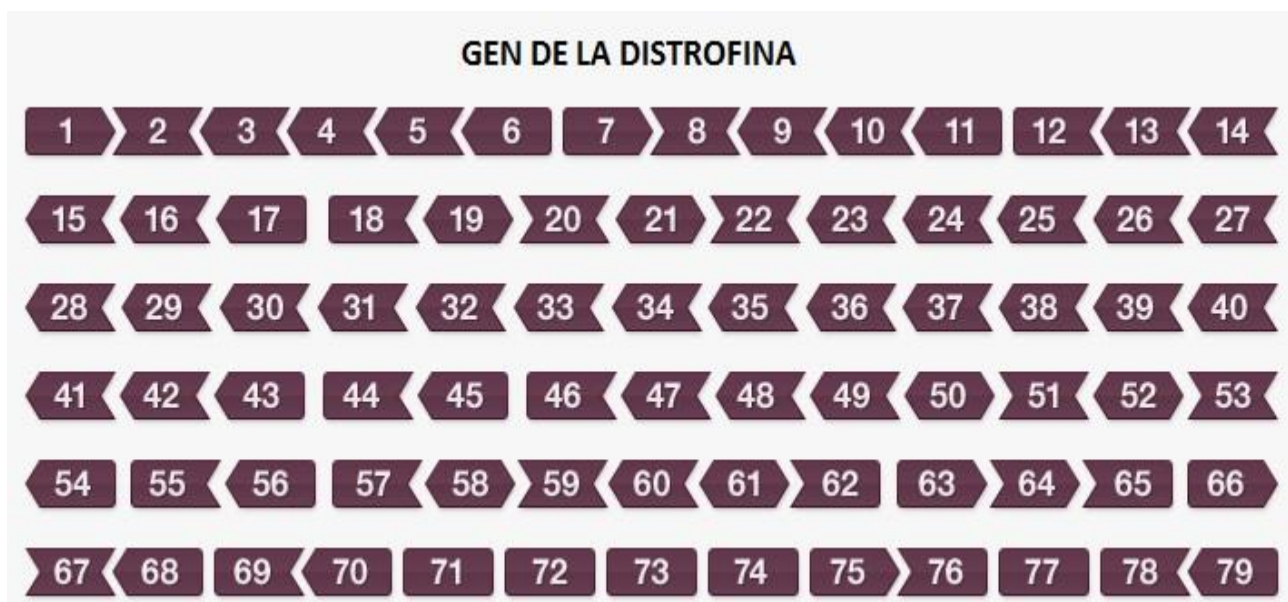


Figura 4. Disposición de los codones del mRNA de la distrofina: los rectángulos representan codones completos, mientras que los trapezoides tienen los codones divididos entre dos exones adyacentes (Duchenne Parent Project España, 2021).



El gen DMD cuenta con distintos promotores que dan lugar a diferentes isoformas de distrofina (Le Rumeur, 2015; Chamberlain y Chamberlain, 2017), expresadas tanto en tejidos musculares como no musculares. Estas isoformas, representadas en la figura 5, incluyen las variantes de la distrofina canónica Dp427, con promotor aguas arriba del exón 1, que se expresa en linfocitos, cerebro y músculo. Las isoformas son Dp260, con promotor aguas arriba del exón 30 y con expresión en la retina; Dp140 que se expresa en el cerebro y en el riñón y su promotor se localiza aguas arriba del exón 45; Dp116 expresada en las células de Schwann, con promotor aguas arriba del exón 56; y Dp71, cuyo promotor se encuentra aguas arriba del exón 63, con expresión ubicua (Shieh, 2018). El lugar donde se encuentre la mutación dentro del gen DMD determinará el perfil fenotípico del paciente (Shieh, 2018).

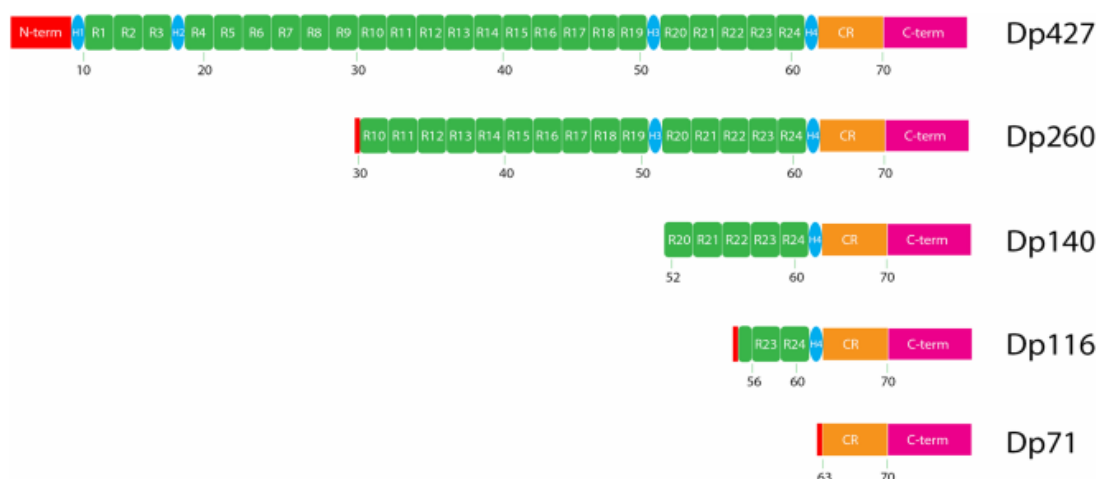


Figura 5. Las diferentes isoformas de la distrofina con sus distintos promotores (Shieh, 2018).

## 2. Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es recopilar información sobre las diferentes alternativas de terapia génica para combatir la distrofia muscular de Duchenne, analizando las diferentes ventajas e inconvenientes de cada uno de los métodos.

Objetivos más específicos son la identificación de los estudios más recientes realizados sobre cada una de las estrategias de terapia génica y la comparación de los distintos métodos entre sí eligiendo el más adecuado para cada tipo de paciente.



### 3. Metodología

Para la realización de este trabajo se ha procedido a una búsqueda bibliográfica consultando bases de datos científicas como PubMed, Google Académico, SciELO o Dialnet. Además, he accedido a la página web de la asociación Duchenne Parent Project España y a la web de National Institutes of Health (NIH).

Para la búsqueda de estos artículos se han empleado palabras clave tanto en español como en inglés. Algunas de estas palabras clave son “Duchenne muscular dystrophy/Distrofia muscular de Duchenne”, “dystrophin”, “gene therapy/terapia génica”, “microdystrophins”, “exon skipping/salto de exón”, “antisense oligonucleotides”, “eteplirsén”, “CRISPR/Cas9” o “ataluren”.

El principal criterio de selección para los artículos ha sido la fecha de publicación, escogiendo aquellos de los años más recientes; aunque algunos artículos con una antigüedad mayor se han seleccionado debido a que tenían contenido de interés o bien para completar la información recopilada. Además, solo se han seleccionado artículos escritos en inglés o en español dando preferencia a los artículos en inglés ya que este es el idioma empleado en la divulgación científica.

### 4. Sintomatología de la distrofia muscular de Duchenne

Este trastorno neuromuscular se caracteriza por un desgaste muscular progresivo (Falzarano *et al.*, 2015; Breitbart y Murry, 2016; Nascimento Osorio *et al.*, 2017) que provoca inflamación e inhibición de la regeneración de fibras. Al no haber distrofina se produce daño en el sarcolema acompañado de una alteración de la homeostasis del calcio (Cirak *et al.*, 2012; Camacho Salas, 2014). Esto provoca la sustitución de las fibras musculares por tejido fibrótico y adiposo (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019), ya que la fibra muscular se necrosa y no es posible su regeneración. Estos cambios pueden ser observados en una biopsia muscular del paciente (Shieh, 2018). Otro indicador de la DMD es la hiperCKemia (Camacho Salas, 2014), es decir, unos altos niveles en suero de la enzima creatinquinasa, encargada de la fosforilación de la creatina en la contracción muscular.





Las manifestaciones de la enfermedad se dan a nivel del músculo esquelético, a nivel del músculo cardíaco y a nivel cerebral (Camacho Salas, 2014). Por lo que, además de la debilidad muscular progresiva, el paciente afectado por DMD tendrá problemas respiratorios, cardíacos (Nascimento Osorio *et al.*, 2017) y algunos sufrirán deficiencias cognitivas (Wang *et al.*, 2017). Una de las manifestaciones más claras para reconocer la enfermedad es la maniobra de Gowers, en la que el niño necesita usar las manos para levantarse del suelo (Nascimento Osorio *et al.*, 2017; Shieh, 2018). Además, se puede apreciar un agrandamiento de los músculos de las pantorrillas (Ramos Yáñez *et al.*, 2017; Duchenne Parent Project España, 2021), y también es común la escoliosis.

La DMD es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X que afecta a ~1 de cada 5000 varones recién nacidos (Bengtsson *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017; Shieh, 2018; Verhaart y Aartsma-Rus, 2019; Duchenne Parent Project España, 2021). Los primeros síntomas aparecen a los 2-3 años (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019) y se caracterizan por caídas frecuentes o un retraso al caminar (Camacho Salas, 2014). La pérdida gradual de tejido muscular conlleva a la dependencia de silla de ruedas a los 12 años, a la necesidad de ventilación asistida a los 20 y a la muerte prematura, normalmente a los 30-40 (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). La causa de mortalidad principal es debida a complicaciones respiratorias.

La BMD, distrofia muscular de Becker, es otro tipo de distrofia muscular más leve que la DMD causada por mutaciones en el mismo gen de la distrofina. En la BMD el paciente sufre una pérdida parcial de la distrofina (Chamberlain y Chamberlain, 2017), manteniendo una proteína más corta o con unos niveles de expresión menores que en condiciones normales; en la DMD se da una pérdida completa de la distrofina funcional. Esto es debido a que la mutación en la DMD rompe el marco de lectura, mientras que en la BMD se mantiene (Cirak *et al.*, 2012) produciendo una distrofina con deleciones internas pero funcional (Aartsma-Rus *et al.*, 2007). Los pacientes con DMD son diagnosticados a una edad temprana con una rápida y progresiva pérdida de distrofina que conlleva a una muerte prematura. Por otra parte, los pacientes con BMD son diagnosticados a una edad más avanzada, manteniendo durante más tiempo la ambulación y con una esperanza de vida más o menos normal (Aartsma-Rus *et al.*, 2007). La BMD tiene una incidencia menor que la DMD, aproximadamente afecta a 1 de cada 100.000 pacientes (Duchenne Parent Project España, 2021).



Actualmente no hay cura para la DMD (Breitbart y Murry, 2016; Echevarría *et al.*, 2018), las mejoras en los cuidados de los pacientes ralentizan la progresión de la enfermedad y alargan la esperanza de vida. Los cuidados estándar incluyen una ventilación no invasiva y ayuda para la tos, manejo nutricional con alimentación por sondas gastrointestinales y tratamiento de cardiomiopatías (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). Además, es importante la administración de corticoesteroides (Falzarano *et al.*, 2015; Nascimento Osorio *et al.*, 2017; Shieh, 2018) que ayudan en el tratamiento de la enfermedad; sin embargo, tienen efectos adversos como aumento de peso, osteoporosis, cataratas o intolerancia a la glucosa (Mendell y Rodino-Klapac, 2016).

Es necesaria mucha más investigación para el desarrollo de terapias efectivas. Se puede restaurar la expresión parcial de la distrofina funcional mediante terapias como la adición de genes, salto de exón o las terapias de edición de genomas. También se puede enfocar desde el punto de vista de las rutas metabólicas involucradas en la patogénesis de la DMD (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).

## 5. Terapia génica

Se denomina terapia génica a todos aquellos métodos que se basan en la transferencia o modificación del material genético de un individuo con el objetivo de combatir una enfermedad, devolviendo a la célula su correcto funcionamiento. La transferencia de genes en terapia génica se puede realizar de 2 maneras, *ex vivo* o *in vivo*. La transferencia de genes *ex vivo* es aquella empleada en células o tejidos en cultivo *in vitro*, que crecen y proliferan en este medio para después ser inyectadas al paciente. Por otro lado, nos referimos a transferencia *in vivo* cuando insertamos el material genético directamente sobre la célula o tejido objetivo.

Hay varias estrategias de terapia génica (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019), abarcando estas la adición de genes, el salto de exón, la edición de genomas, la lectura forzada del codón de parada o la terapia con células madre, entre otras.



### 5.1. Adición de genes

Esta terapia persigue el objetivo de lograr microdistrofinas, que son distrofinas mucho más pequeñas que las que se han visto de manera natural en los pacientes con BMD (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). Esto se consigue introduciendo en la célula un gen codificante para microdistrofinas que, a pesar de tener deleciones internas, pueden ser parcialmente funcionales.

Estas microdistrofinas solo deben contar con dos dominios clave: uno de unión a actina en el extremo amino y otro de unión al  $\beta$ -dístroglicano (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). La proteína actina forma parte del citoesqueleto celular que mantiene la forma de la célula y tiene un importante papel en el movimiento, ya que unida a la miosina provoca la contracción muscular. El  $\beta$ -dístroglicano es una proteína encargada de la unión entre la laminina de la matriz extracelular y la distrofina del citoesqueleto. El resto de dominios parecen no ser importantes para preservar la funcionalidad de la proteína.

Uno de los primeros estudios realizados en la terapia de inserción de genes revela que un paciente con una deleción de los exones 17 a 48 manifestaba un fenotipo distrófico leve (Shieh, 2018), manteniendo la fase ambulatoria incluso a los 61 años. Esto demuestra que, a pesar de que más del 46% de la proteína se encuentre ausente, los fenotipos leves son posibles.

El gen codificante para microdistrofinas se introduce mediante un vector viral, concretamente un virus adenoasociado (AAV), ya que es de los pocos que puede infectar el músculo eficientemente (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). Sin embargo, AAV cuenta con algunos inconvenientes, es muy pequeño y tiene limitada capacidad transgénica a 4,5 kb (Mendell y Rodino-Klapac, 2016; Ramos *et al.*, 2019), mientras que el gen DMD es mucho mayor, de unas 2,2 Mb (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). Por ello, se emplean microdistrofinas o minidistrofinas para este AAV, porque el gen de la distrofina es demasiado grande para que pueda insertarlo (Hotta, 2015; Shieh, 2018).

Los vectores AAV inducen la traducción del gen de la microdistrofina o minidistrofina en el músculo. Los más empleados son AAV8 y AAV9, los cuales se diferencian por las proteínas de su cápside viral, ya que tienen una alta eficiencia en las células *in vivo* y pueden aliviar los



síntomas de la DMD (Wang *et al.*, 2017). Se comprobó que AAV8 es muy eficiente a la hora de traspasar la barrera que suponen los capilares sanguíneos (Wang *et al.*, 2017).

Se vio que la distribución de los diversos vectores era distinta entre unos y otros (Sierra Delgado *et al.*, 2019), por ejemplo, AAV4 alcanzaba su máxima distribución en pulmones, riñón y corazón, mientras que los niveles de AAV7 y AAV9 eran comparables en el hígado (Wang *et al.*, 2017).

Actualmente, hay tres programas de micro/minidistrofinas en desarrollo (Figura 6), y todos ellos utilizan un promotor específico del músculo que impulsa la expresión de estas micro/minidistrofinas. Estos tres programas están siendo llevados a cabo por Sarepta, que usa una cápsida AAVrh74 con un promotor MHCK7 (Salva *et al.*, 2007); por SGT-001, la cual emplea una cápsida AAV9 con un promotor CK8 que impulsa a la expresión de microdistrofinas; y, por último por Pfizer, PF-06939936 que también emplea una cápsida AAV9 con un promotor específico del músculo (Shieh, 2018).

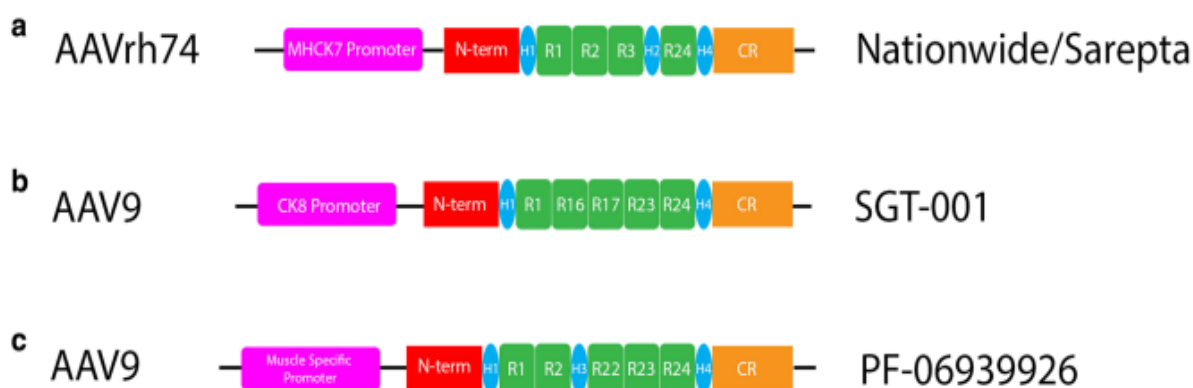


Figura 6. Las 3 micro/minidistrofinas en desarrollo (Shieh, 2018).

Uno de los mayores problemas de la adición de genes es la inmunidad frente al vector AAV manifestada por algunos pacientes (Falzarano *et al.*, 2015; Mendell y Rodino-Klapac, 2016). Para prevenir la respuesta inmune los pacientes reciben corticoesteroides, los cuales también mejoran la fuerza muscular (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). Otra alternativa sugerida para evitar esta respuesta es la plasmaféresis, donde se extrae todo el plasma de la sangre del paciente devolviéndole las células sanguíneas al sistema circulatorio, para suprimir así el sistema inmunitario de este (Shieh, 2018).



Aunque este tipo de terapia con micro/minidistrofinas funcione y ralentice la progresión de la enfermedad, la fabricación de los vectores virales a la escala necesitada para el tratamiento de los pacientes con DMD es muy costosa, además de que requiere tiempo por ser muy alta la dosis de vector requerida (Wang *et al.*, 2017); aproximadamente 1-2 meses para producir el suficiente vector viral con el que tratar a un único paciente (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).

En resumen, esta técnica puede ser efectiva para aumentar las microdistrofinas expresadas en el músculo y mejorar la calidad de vida de los pacientes, pero aún queda mucho camino para alcanzar una alta efectividad y resolver los retos que este tratamiento plantea.

## 5.2. Salto de exón

Este método es el más empleado (Echigoya *et al.*, 2015; Echevarría *et al.*, 2018), ya que la mayor parte de los pacientes tienen una interrupción en el marco de lectura del gen DMD, que es lo que produce la proteína disfuncional y lo que provoca la enfermedad. Con el salto de exón se busca corregir el marco de lectura y producir una distrofina como en la BMD (Aartsma-Rus y van Ommen, 2009; Heemskerk *et al.*, 2009). Esto se consigue escondiendo uno o varios exones a la maquinaria de *splicing* de RNA (Aartsma-Rus *et al.*, 2010; Kole y Krieg, 2015), por lo que si se saltan esos exones que provocan la interrupción del marco de lectura, se podrá continuar con la traducción del resto de exones de manera normal produciendo una proteína más corta pero parcialmente funcional (Shieh, 2018; Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).

En el salto de exón juegan un importante papel los oligonucleótidos antisentido (Shieh, 2018; Duchenne Parent Project España, 2021), que son análogos modificados del DNA o RNA (Aartsma-Rus y van Ommen, 2009) que hibridan con una secuencia específica del exón que nos interesa en el pre-mRNA (Falzarano *et al.*, 2015) y evitan su traducción, lo cual provoca el salto de exón y la restauración del marco de lectura (Kole y Krieg, 2015; Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).

Cada mutación necesita un método específico de salto de exón, pero la mayor parte de pacientes contienen las deleciones en los exones 45-55 (Echigoya *et al.*, 2015), por lo que estos exones en particular conforman un punto caliente y afectan a muchos pacientes (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). Las deleciones más frecuentes que causan DMD se dan en el



exón 50 o en los exones 49-50, 48-50, 47-50, 45-50. Todas ellas interrumpen el marco de lectura e impiden una producción de distrofina funcional, ya que el marco de lectura abierto se encuentra entre 2 exones.

Por ello, el salto del exón 51 lo podemos aplicar al 13% de los pacientes afectados con DMD (Aartsma-Rus *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2017; Shieh, 2018; Verhaart y Aartsma-Rus, 2019) restaurando así el marco de lectura.

La figura 7 representa el salto de exón 51: los rectángulos hacen referencia a los exones que contienen todos los codones en un solo exón, mientras que los trapecoides representan los exones en el que los codones se encuentran entre 2 exones adyacentes. El exón 51 está señalado en rojo; la primera línea representa los exones en un paciente con BMD con una deleción de los exones 48-49, que como vemos no interrumpe el marco de lectura, produciendo una distrofina funcional. En la segunda línea se representa un mRNA de un paciente DMD con una deleción de los exones 48-50, la cual sí interrumpe el marco de lectura ya que el exón 50 comparte codón con el exón 51; esto impide la expresión de la distrofina. En la tercera línea hemos saltado el exón 51 gracias a los oligonucleótidos antisentido que se unen a él (línea negra) y generan un mRNA con una deleción 48-51, lo que restaura el marco de lectura y da como resultado una distrofina funcional a pesar de contener deleciones internas (Kole y Krieg, 2015).

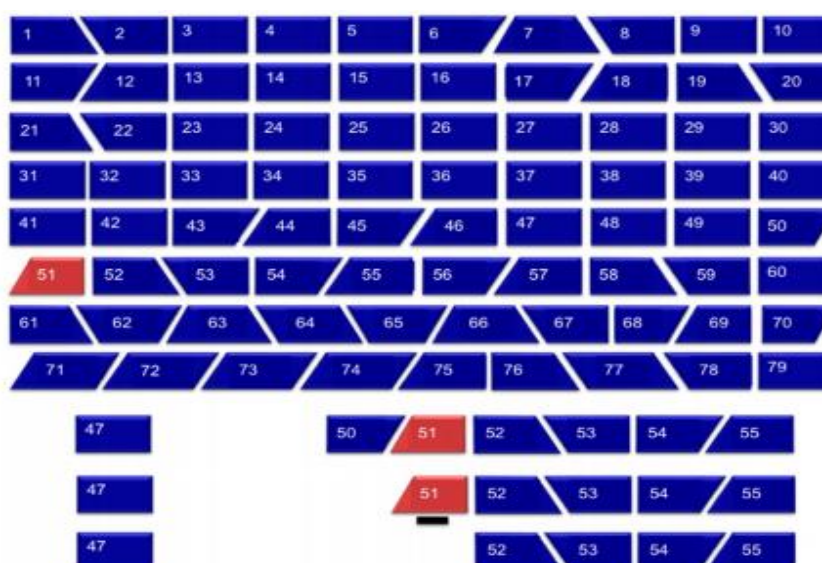


Figura 7. Disposición de los exones en el mRNA de la distrofina con el salto de exón 51 gracias a los oligonucleótidos antisentido (Kole y Krieg, 2015).



Se han desarrollado dos oligonucleótidos antisentido diferentes para el salto de exón 51: eteplirsén y drisapersén (Figura 8) (Kole y Krieg, 2015; Shieh, 2018; Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).

Drisapersén es un 2'-O-metilfosforotioato (2'OMePS) con el que se han realizado estudios en niños de aproximadamente 7 años (Kole y Krieg, 2015). El tratamiento con drisapersén en individuos en estadios tempranos de la enfermedad (6-8 años) demostró que estos mejoraron en el 6-minute walk test (6MWT) frente al grupo placebo. Sin embargo, al hacer otro ensayo con pacientes entre 5-16 años, es decir, en fases tempranas y tardías de la enfermedad (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019), los resultados en el 6MWT fueron similares entre el grupo de tratamiento con drisapersén y el grupo placebo.

En todos los pacientes tratados con drisapersén se observaron reacciones en el sitio de inyección, proteinuria, inflamación de riñón y síntomas parecidos a la gripe (Kole y Krieg, 2015; Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). Además de eso, en algunos pacientes se asoció con trombocitopenia (Echevarría et al., 2018). Todas estas respuestas se asocian al fosforotioato que suele causar efectos inflamatorios (Kole y Krieg, 2015); por ello, este compuesto no fue aprobado ni por la FDA (Food and Drug Administration) ni por la EMA (European Medicines Agency) (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). El desarrollo de drisapersén no ha seguido adelante (Shieh, 2018; Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).

Eteplirsén o Exondys 51 es un fosforodiamidato morfolino oligómero (PMO) empleado para tratar pacientes de manera continua durante 3 años (Kole y Krieg, 2015; Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). Este estudio se realizó en chicos de 7-13 años, con una media de 9 años (Kole y Krieg, 2015). A las 24 semanas del tratamiento, se produjo un aumento significativo en los niveles de distrofina en los pacientes tratados, mientras que los resultados del 6MWT no eran significativos al compararlos con el grupo placebo. En la semana 168, la diferencia de la distancia caminada entre los 2 grupos fue de 65,4 m (Kole y Krieg, 2015); por lo que los pacientes tratados continuamente con eteplirsén continuaban caminando un 18% de la distancia que caminaban en la semana 12. Además, en esta semana 168 de tratamiento, las funciones pulmonares en todos los pacientes permanecieron estables.

Teniendo en cuenta que los pacientes con DMD al ser tratados con corticoesteroides disminuyen su capacidad para caminar en unos 50-100 m por año (Kole y Krieg, 2015), estos



son unos buenos resultados que nos indican que este fármaco aumenta los niveles de distrofina y ralentiza la progresión de la enfermedad (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). Ningún tipo de respuesta inmune o síntomas parecidos a la gripe fueron observados (Kole y Krieg, 2015); por todo ello fue aprobado por la FDA en 2016 (Lim *et al.*, 2017; Shieh, 2018).

Lo importante es que se ha iniciado el camino en la búsqueda de tratamientos efectivos y sanos basados en oligonucleótidos antisentido para combatir la DMD. Actualmente se están desarrollando estudios con oligonucleótidos antisentido 2'-O-metilfosforotioato (2'OMePS) estereopuros para el salto de exón (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).

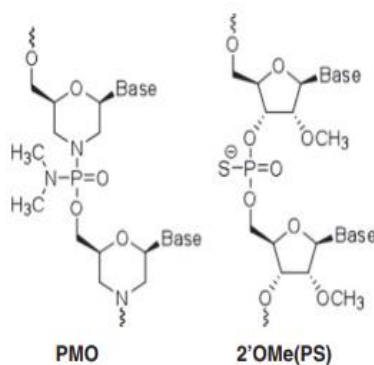


Figura 8. Estructura química del eteplirsen (PMO) y del drisapersen (2'OMePS) (Kole y Krieg, 2015).

No se ha logrado un beneficio suficiente probablemente debido a una recepción pobre por parte del tejido objetivo (Falzarano *et al.*, 2015; Echevarría *et al.*, 2018). Este es el principal obstáculo de los oligonucleótidos antisentido ya que <1% alcanzan el compartimento celular correcto (Echevarría *et al.*, 2018). A esto hay que añadir la restricción por parte de las barreras corporales, como la barrera hematoencefálica (Echevarría *et al.*, 2018).

La mayoría de moléculas antisentido se excretan rápidamente por el riñón debido a su pequeño tamaño, para solucionarlo se modifican los oligonucleótidos para que se unan a las proteínas plasmáticas, lo cual disminuye su excreción renal y potencia su acumulación en los tejidos (Echevarría *et al.*, 2018).

Por todo lo anterior, para mejorar la eficiencia del tratamiento se debe mejorar la recepción de los oligonucleótidos antisentido por parte de las células musculares, para ello se conjugan estos oligonucleótidos antisentido con péptidos dirigidos a los músculos (Echevarría *et al.*, 2018; Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).





Los PMO son incapaces de restaurar la expresión de distrofina en el músculo cardíaco, para conseguirlo se conjugan estos PMO con pequeños péptidos, principalmente péptidos ricos en arginina que mejoran la recepción celular (Echevarría *et al.*, 2018). Esto solo ha sido probado en animales, en los que se observan altos niveles de salto de exón en músculo esquelético y cardíaco. En humanos y primates, estos péptidos causan toxicidad renal (Echevarría *et al.*, 2018; Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).

También se han desarrollado péptidos de transducción llamados Pip (PMO internalization peptide) para aumentar el salto de exón en el tejido cardíaco. Se vio que uno de estos péptidos, Pip5e-PMO mejoraba los niveles de restauración de distrofina tanto en músculos periféricos como en el corazón tras una inyección intravenosa. A partir de Pip5e-PMO se desarrolló Pip6-PMO que mejoraba los niveles de distrofina en el corazón de ratones *mdx* sin provocar una respuesta inmune, además de prevenir cardiomiopatías en estos (Echevarría *et al.*, 2018).

Los triciclo-DNAs (tcDNA) (Figura 9) son nucleótidos diseñados para limitar la flexibilidad de torsión del esqueleto de azúcar para estabilizar los heteroduplex tcDNA/RNA (Echevarría *et al.*, 2018). Tienen una eficacia mayor que los 2'OMePS y los PMO ya que provocan niveles mayores de salto de exón y revelan por primera vez la expresión de distrofina en todos los tejidos que tenían falta de ella (músculo esquelético, corazón y SNC).

Se evaluó el perfil toxicológico del tcDNA en ratones con DMD (Echevarría *et al.*, 2018) y se vio que las altas dosis de este fármaco eran bien toleradas, produciendo mínimos daños como necrosis de algunas células de los túbulos proximales del riñón o una pequeña inflamación del hígado. Estudios posteriores demostraron la desaparición de estos efectos secundarios tóxicos con el paso del tiempo.

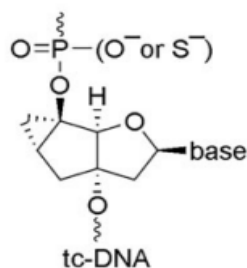


Figura 9. Estructura química del tcDNA (Echevarría *et al.*, 2018).



Sin embargo, a pesar de este perfil esperanzador de los tcDNAs, los oligonucleótidos antisentido tipo fosforotioato inhiben la coagulación y activan rutas alternativas del complemento; por tanto, debe haber un equilibrio de enlaces fosforotioato y fosfodiéster (Echevarría *et al.*, 2018) para que estas moléculas sean eficaces minimizando la toxicidad. El empleo de tcDNA como oligonucleótido antisentido para tratar la DMD depende de cómo sea tolerado por humanos.

También se han realizado ensayos clínicos para el salto de otros exones, por ejemplo, el 44, 45 y 53 usando oligonucleótidos antisentido PMO (Shieh, 2018). Esto beneficiaría al 7,6%, 9% y 8,1% (Kole y Krieg, 2015) de los pacientes, respectivamente. Casimersen ha sido diseñado para el salto de exón 45, mientras que Golodirsén para el salto de exón 53 (Shieh, 2018).

El salto de exones individuales beneficia a un pequeño porcentaje de pacientes, mientras que el salto de 10 exones podría beneficiar al 70% de los pacientes con deleciones en el gen DMD (Aartsma-Rus y van Ommen, 2009). Se ha comprobado que es factible inducir el salto multiexón 45-51 (Aartsma-Rus *et al.*, 2007), lo cual da lugar a fenotipos más suaves de la enfermedad. Sin embargo, esta técnica tiene limitaciones que dependen de los exones objetivo y de la longitud de los intrones flanqueantes (Aartsma-Rus *et al.*, 2007).

No solo se pueden saltar exones en los casos de deleción, sino que también se aplica a las duplicaciones de exones, lo cual es muy beneficioso ya que al saltar exones duplicados se produce el transcrito original, con toda su longitud (Aartsma-Rus *et al.*, 2007), permitiendo así la producción de distrofina silvestre. Las duplicaciones de uno o más exones afectan a 7-10% de los pacientes (Aartsma-Rus *et al.*, 2007).

Por ejemplo, un paciente con una duplicación del exón 45 (Aartsma-Rus *et al.*, 2007) fue tratado con un oligonucleótido antisentido específico para este exón. El RNA se aisló 2 días después del tratamiento y mostró unos niveles significativos del salto de exón 45. Cabe la posibilidad del doble salto de ambos exones 45, el original y el duplicado, provocando un transcrito con una interrupción del marco de lectura. En las muestras tratadas se observó una expresión de distrofina, mientras que en las no tratadas no había señales de la proteína.



En el caso de la duplicación del exón 44 sucede lo mismo que en el caso anterior (Aartsma-Rus *et al.*, 2007); se puede producir un salto de exón 44 o un doble salto de exón 44-44 que provoca una interrupción del marco de lectura, y, en consecuencia, no se produce distrofina. Para solucionar el problema del doble salto se induce un salto del exón 43, además de ambos exones 44, es decir salto de exones 43-44-44. Esto restaura el marco de lectura y revela la presencia de distrofina en los pacientes tratados con este método. El salto del exón duplicado 44 se representa en la figura 10.

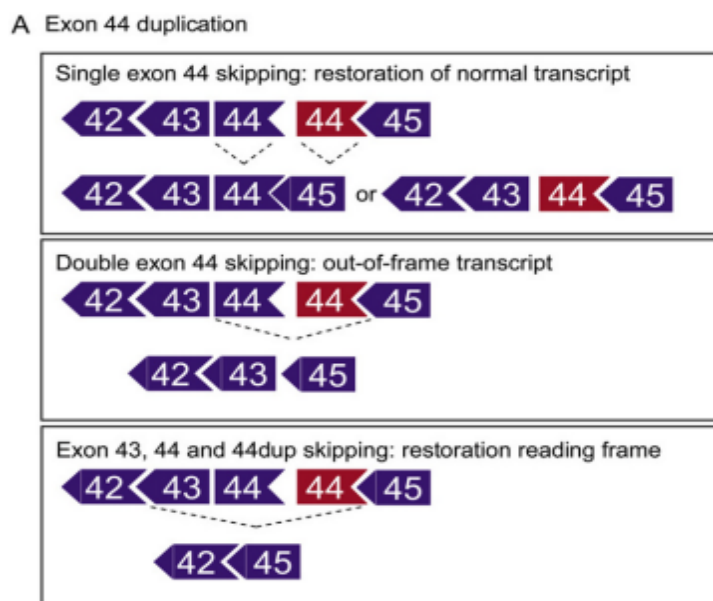


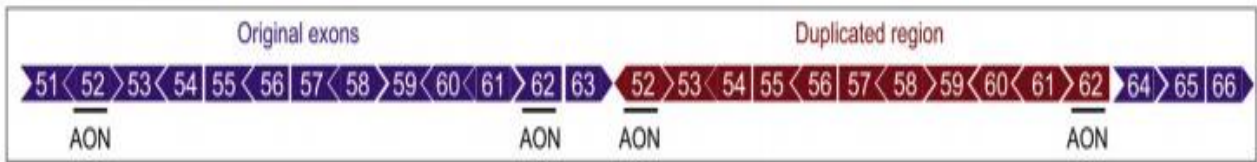
Figura 10. Salto del exón duplicado 44 con las posibilidades de: salto único de exón 44 que da un transcrito normal, salto doble de exones 44 que interrumpe el marco de lectura, y salto de exones 43-44-44 que restaura el marco de lectura (Aartsma-Rus *et al.*, 2007).

Otro caso estudiado es la duplicación de los exones 52-62 (Aartsma-Rus *et al.*, 2007), duplicación localizada entre los exones 63 y 64. El salto múltiple de los exones duplicados 52-62 restauraría el transcrito silvestre al paciente. Alternativamente, el marco de lectura puede ser restaurado generando una duplicación que mantenga el marco, como con el doble salto de los exones duplicados 52 y 62, o con el salto multiexón de los exones originales 62, 63 y los exones duplicados 52 y 62. También puede darse el caso de la interrupción del marco de lectura, por ejemplo, con el salto del exón original 52, el salto del exón original 62 o el salto de los exones originales 52-62.

Este salto múltiple de exones es posible gracias a los oligonucleótidos antisentido que hibridan con los exones externos.



Exon 52-62 duplication



Potential outcome after AON treatment

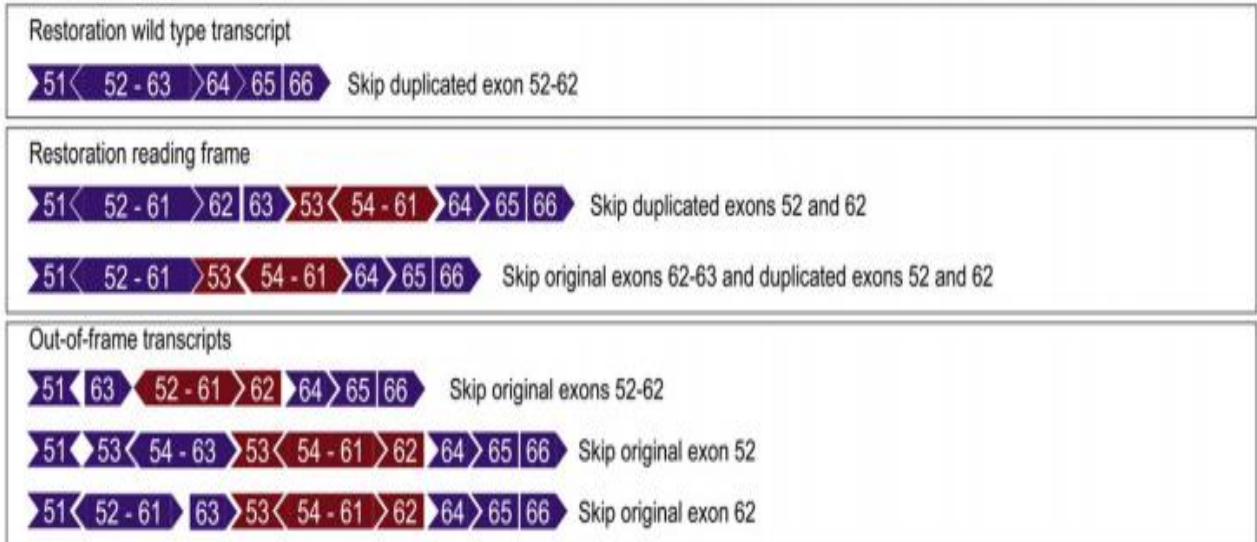


Figura 11. Salto múltiple de exones duplicados 52-62 (Aartsma-Rus *et al.*, 2007).

En la figura 11 se ve cómo el salto de los exones duplicados 52-62 restaura el transcrito silvestre. El salto de los exones duplicados 52 y 62 restaura el marco de lectura, al igual que el salto de los exones originales 62 y 63 combinado con el salto de los exones duplicados 52 y 62. Por otro lado, el salto individual del exón 52 original o el salto individual del exón 62 original rompen el marco de lectura. También interrumpe el marco de lectura el salto de los exones originales 52-62 (Aartsma-Rus *et al.*, 2007).

En resumen, los saltos de exones duplicados pueden ser muy eficaces ya que dan como resultado el transcrito original, y por tanto, una producción normal de la distrofina. Sin embargo, pueden saltarse los dos exones duplicados lo cual interrumpe el marco de lectura.

El salto múltiple de exones duplicados es más difícil que el salto único de exón y su logro depende de cuáles y cuántos sean los exones duplicados (Aartsma-Rus *et al.*, 2007). El salto múltiple constituye todo un reto ya que el transcrito original solo se restaurará si se produce el salto multiexón de los exones duplicados, lo cual es complicado ya que hay otros exones



similares (los originales) que podrían ser objetivo del oligonucleótido antisentido y provocarían una interrupción del marco de lectura.

Todos los métodos de salto de exón tienen como objetivo el pre-mRNA, y debido a la rotación de los oligonucleótidos antisentido (Aartsma-Rus *et al.*, 2010), de los transcritos de RNA y las proteínas de distrofina, el tratamiento con estos oligonucleótidos antisentido debe ser repetido hasta que este sea eficaz (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).

### 5.3. Edición del genoma

En la edición del genoma se emplea la tecnología CRISPR/Cas9 para inducir roturas de doble cadena en lugares específicos del genoma, roturas que activan sistemas de reparación de DNA que provocan o bien recombinación homóloga, que corrige mutaciones, o bien la unión de extremos no homólogos, que crea mutaciones adicionales (Hotta, 2015; Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). Este sistema puede ser empleado tanto *in vivo* como *in vitro* (Ousterout *et al.*, 2015).

La eliminación de uno o más exones mediante la técnica CRISPR/Cas9 podría beneficiar al 80% de los pacientes con DMD, siendo fundamental la intervención a una edad temprana para que la pérdida muscular sea la mínima posible (Mendell y Rodino-Klapac, 2016). La edición del genoma resulta en la producción de una distrofina BMD, que es parcialmente funcional (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).

Este método puede ser empleado para borrar múltiples exones de una sola vez, por ejemplo, la delección de los exones 45-55 (Ousterout *et al.*, 2015) podría restaurar el marco de lectura de la distrofina para aproximadamente el 40% de los pacientes que padecen DMD (Breitbart y Murry, 2016; Young *et al.*, 2016; Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).

La edición del genoma *in vivo* necesita la construcción de dos vectores AAV, uno para entregar la proteína Cas9, y otro para entregar un RNA guía (CRISPR) a las células musculares esqueléticas y cardíacas *in vivo* (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). Se ha visto que es más eficaz si estos dos son entregados por un único vector AAV (Mendell y Rodino-Klapac, 2016). La eficiencia de la recepción del sistema CRISPR/Cas9 *in vivo* era muy baja hasta que se combinó con los vectores AAV (Wang *et al.*, 2017).



Por ejemplo, el CRISPR/Cas9 se emplea para eliminar una mutación sin sentido en el exón 23 de ratones *mdx* (Tabebordbar *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2017). Los vectores más empleados para ello son AAV9 o AAV8 (Mendell y Rodino-Klapac, 2016; Wang *et al.*, 2017) ya que tienen una recepción muy buena por parte de los tejidos. En general, los resultados fueron favorables dando lugar a la expresión de la distrofina y mejorando la función y la fuerza muscular (Bengtsson *et al.*, 2016; Tabebordbar *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017), además de reducir la creatinquinasa del suero (Amoasii *et al.*, 2018), provocar una inversión de la necrosis muscular y disminuir la fibrosis (Mendell y Rodino-Klapac, 2016). Se vio también una restauración de la actividad de la nNOS y de los componentes del DAPC. Un aspecto importante es que la expresión de la distrofina se observó en el músculo liso y en los cardiomiocitos (Mendell y Rodino-Klapac, 2016; Zhu *et al.*, 2017).

Ningún estudio mostró evidencia de efectos secundarios de la edición del genoma, por tanto, esta técnica parece prometedora en cuanto a su aplicación en clínica para corregir el gen de la distrofina (Mendell y Rodino-Klapac, 2016).

Una de las ventajas de la edición del genoma es que no necesita repetición del tratamiento, ya que esta se da a nivel de DNA, y, por tanto, todos los transcritos de RNA producidos a partir del gen editado tendrán el marco de lectura correcto (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).

Una vez que se ha producido un daño muscular masivo, los núcleos cuyo genoma está editado se pierden de las fibras musculares multinucleadas, por lo que se produce el daño muscular. Además, AAV no es integrado por las células madre musculares (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019), por tanto, el músculo reparado portará la mutación original DMD. Con el tiempo, los pacientes cuyo genoma ha sido editado pueden experimentar un descenso gradual en los niveles de distrofina parcialmente funcional, aunque este descenso sería más lento que en la terapia de adición de genes (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). Necesitamos estudios a largo plazo para comprobar la efectividad y duración de los tratamientos de edición del genoma en pacientes con DMD.

Otros inconvenientes de esta técnica, al igual que para la adición de genes, son la inmunidad preexistente a AAV (Wang *et al.*, 2017) y el reto de lograr una cantidad suficiente de vectores para tratar a los pacientes (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). Además, los RNAs guías deben



ser diseñados específicamente (Wang *et al.*, 2017; Verhaart y Aartsma-Rus, 2019) para las diferentes mutaciones, es decir, la edición de genomas es específica para cada mutación.

Por último, cabe destacar que la proteína Cas9 puede inducir roturas en el DNA en lugares fuera del sitio objetivo (Wang *et al.*, 2017), por lo que se ha investigado la frecuencia con la que estos efectos no deseados se producen en la edición del genoma (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). Para reducir estas roturas no deseadas se debe aumentar la especificidad de los gRNA y de las enzimas Cas9 (Ousterout *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017; Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).

Para la edición del genoma, además se pueden usar nucleasas de dedos de zinc, enzimas de restricción artificiales que surgen de la combinación personalizada de dominios dedos de zinc con dominios de nucleasas para unirse a secuencias de interés (Hotta, 2015). *FokI* es una endonucleasa de restricción muy empleada para formar nucleasas de dedos de zinc (ZFN) conjugada con 3-4 dominios dedos de zinc. Las ZFN inducen pequeñas deleciones o inserciones (indel) en el gen de la distrofina dando como resultado una restauración del marco de lectura (Hotta, 2015).

La eliminación del exón 51 del mRNA del gen DMD usando nucleasas de dedos de zinc restauró la expresión de la distrofina en muchos pacientes con DMD, concretamente el 13% (Ousterout *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017).

TALEN (Transcriptional Activator-Like Effector Nuclease) es otra herramienta de edición genómica (Li *et al.*, 2014) que engloba a enzimas de restricción diseñadas artificialmente para unirse a la secuencia de interés del DNA y cortarla (Hotta, 2015; Chen *et al.*, 2016). TALEN resulta de la conjugación del dominio TALE con la nucleasa *FokI*; el dominio TALE consiste en repeticiones en tándem de 34 aminoácidos que varían en los aminoácidos 12 y 13 (Hotta, 2015). Se utilizó el sistema TALEN para unirse al exón 51 en un paciente con DMD que tenía una deleción de los exones 48-50. La restauración del marco de lectura y, por tanto, restauración de la expresión de la distrofina se debieron a la introducción de pequeñas deleciones en el exón 51 (Hotta, 2015).



Sin embargo, es el sistema CRISPR/Cas9 el que domina el terreno de la edición de genomas ya que es fácil de construir y tiene una especificidad y efectividad mucho más alta que ZFN y TALEN (Hotta, 2015; Chen *et al.*, 2016; Lammoglia-Cobo *et al.*, 2016).

La comparación entre estos tres sistemas de edición de genoma se puede ver en la figura 12.

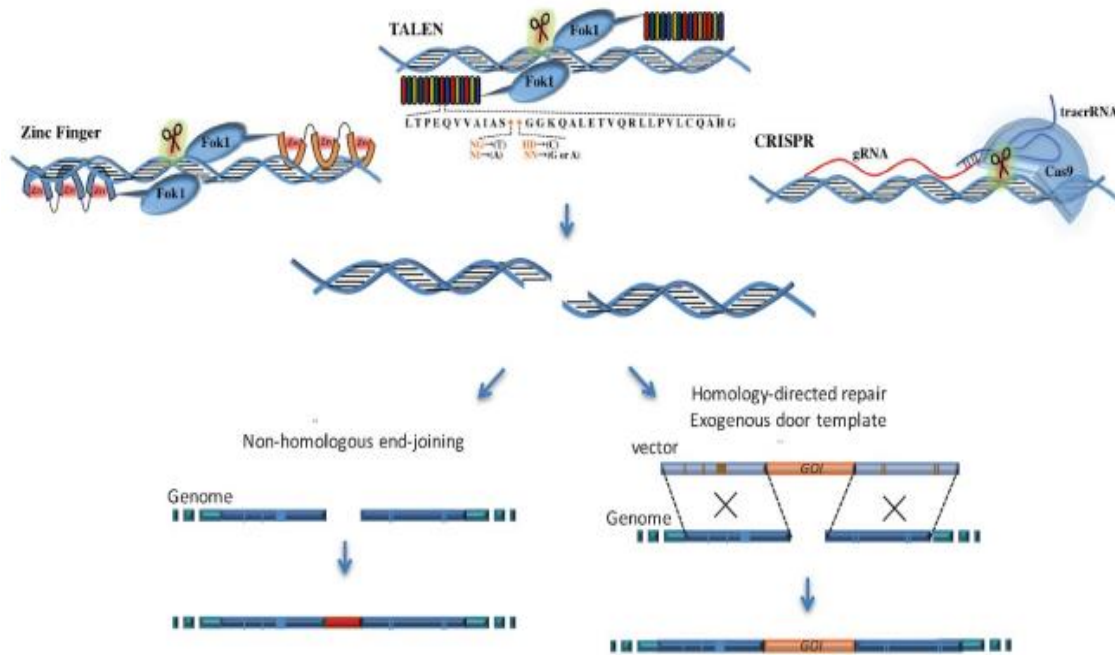


Figura 12. Comparación de los tres sistemas: ZFN; TALEN y CRISPR/Cas9, dando como resultado recombinación homóloga o unión de extremos no homólogos (Chen *et al.*, 2016).

#### 5.4. Lectura forzada del codón de parada

Cuando la DMD es causada por una mutación sin sentido, es decir, que un codón que codificaba para un aminoácido es cambiado por un codón de stop o codón de parada, el marco de lectura no se desorganiza, al contrario que ocurre en las mutaciones que provocan una interrupción del marco de lectura. Esta parada prematura de la traducción da lugar a una distrofina no funcional (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). Dichas mutaciones sin sentido afectan al 13% de los pacientes que padecen DMD (Nelson *et al.*, 2009) y pueden ser reparadas gracias al poder de unión de algunos compuestos al codón de stop prematuro. Como se aprecia en la figura 13, estos compuestos fuerzan a la maquinaria de traducción a incorporar un aminoácido en la proteína, en lugar de detenerse en ese lugar. Destacamos dos compuestos capaces de esto: la gentamicina y el ataluren (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).



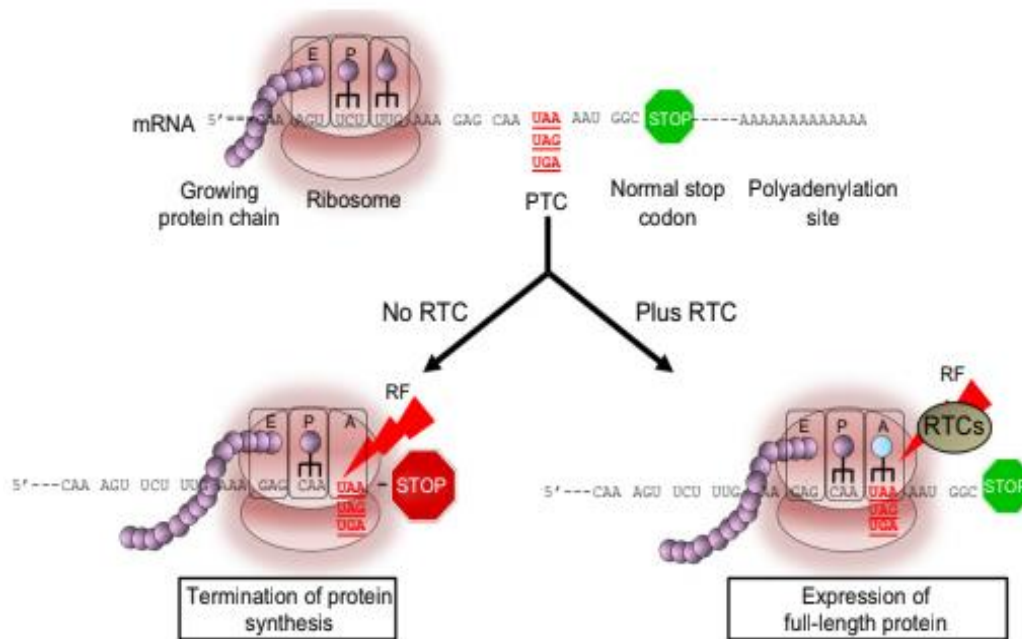


Figura 13. Lectura forzada del codón de parada mediada por algunos compuestos (RTCs) (Namgoong y Bertoni, 2016).

El antibiótico gentamicina (Malik *et al.*, 2010) es el mejor ejemplo para proseguir con la traducción ignorando el codón de parada; sin embargo, un uso crónico de este compuesto tiene un alto riesgo de toxicidad renal y ototoxicidad (Falzarano *et al.*, 2015; Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). Este aminoglucósido no ha tenido mucho éxito ya que no aporta unos beneficios claros a los pacientes con DMD (Namgoong y Bertoni, 2016) y conlleva efectos secundarios (Falzarano *et al.*, 2015).

El ataluren, PTC124, es un fármaco oral con un perfil más sano que los antibióticos aminoglucósidos (Falzarano *et al.*, 2015). El tratamiento con ataluren, bajo el nombre comercial de Translarna, restaura la producción de la proteína afectada en varias enfermedades causadas por mutaciones sin sentido (Nelson *et al.*, 2009; Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).

Se realizó un ensayo placebo-control en el que la diferencia en 6MWT entre ataluren y grupo placebo fue 29 m. A partir de ese ensayo se hicieron unos análisis (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019) que mostraron que el subgrupo de los pacientes más propenso a tener unos mejores resultados obtuvo una diferencia de 50 m respecto al grupo placebo. Estos datos conllevan a la aprobación condicional por parte de la EMA en enfermos de 5 años o mayores cuya causa



fuese una mutación sin sentido; por otra parte, la FDA no aprobó el ataluren (Shieh, 2018; Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).

Un aumento en los niveles de distrofina en comparación con la base de la que se partía (Falzarano *et al.*, 2015; Verhaart y Aartsma-Rus, 2019) fue alcanzado en la mayoría de los pacientes tratados con ataluren durante 1 mes. En 2018, la EMA extendió el tratamiento con ataluren a niños con DMD a partir de 2 años que padecieran una mutación sin sentido (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).

Ataluren es un fármaco que ha demostrado ser sano y eficaz (Nelson *et al.*, 2009; Falzarano *et al.*, 2015). El principal inconveniente del ataluren es que es aplicable solo en aquellos individuos con una mutación sin sentido, lo cual solo abarca al 13% de los pacientes, además es un compuesto caro que no todo el mundo se puede permitir (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). Actualmente, el ataluren está disponible solamente en algunos países europeos, no en todos. En España no está disponible, mientras que en países como Alemania, Italia, Reino Unido, Dinamarca, Francia, Portugal o Noruega sí lo está.

### **5.5. Terapia con células madre**

Las células madre musculares aisladas de donantes sanos pueden ser expandidas *in vitro* para luego ser trasplantadas en pacientes con DMD, con el objetivo de reparar el músculo dañado. Estas células trasplantadas tienen el gen de la distrofina intacto (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).

Sin embargo, la eficacia de esta terapia se limita debido a la abundancia del tejido muscular y a la capacidad de proliferación limitada de las células madre musculares en cultivo (Zhu *et al.*, 2017). Se realizó un ensayo (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019) en el que se inyectaban mioblastos en el tibial anterior de pacientes adolescentes, además de inyectarlos en el pulgar, brazo y músculo de la pantorrilla en un paciente de 26 años con DMD. Los mioblastos son células musculares tempranas con un único núcleo, las cuales pueden proliferar o experimentar diferenciación. Estas inyecciones han resultado en una restauración local de la distrofina (Zhu *et al.*, 2017; Verhaart y Aartsma-Rus, 2019), dando lugar a áreas positivas de distrofina frente a áreas negativas de distrofina. Esto es debido a que los mioblastos se mantienen muy cerca de los sitios donde se ha puesto la inyección, por tanto, la eficiencia de



este tratamiento es muy baja y es necesario mejorar las condiciones de cultivo (Zhu *et al.*, 2017) para evitar la diferenciación de las células *in vitro* durante el proceso, lo que conllevaría a efectos adversos como trombosis y accidente cerebrovascular (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).

La terapia con iPSCs (induced Pluripotent Stem Cells), células madre humanas pluripotentes inducidas, derivadas de pacientes persigue la diferenciación de estas células en células precursoras de músculo (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019) que pueden ser trasplantadas al paciente una vez corregidas las mutaciones (Li *et al.*, 2015; Lammoglia-Cobo *et al.*, 2016) mediante la edición del genoma con CRISPR/Cas9 (Young *et al.*, 2016). Por ejemplo, podemos obtener cardiomiocitos a partir de estas iPSCs que ayudan a un desarrollo fisiológico normal del corazón en pacientes con DMD (Lim *et al.*, 2018).

A pesar de lo prometedora que parece, esta técnica es poco eficiente en cuanto al recibimiento de las células madre por parte del músculo esquelético; a esto hay que añadirle los efectos no deseados debidos a la Cas9 (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019) y los riesgos de tumor y teratoma que pueden sufrir los pacientes tratados (Zhu *et al.*, 2017).

Además, en el músculo distrófico la regeneración se impide debido a la inflamación y la fibrosis que se dan en este, por tanto, las células madre trasplantadas podrían diferenciarse en células fibróticas o adiposas sin lograr ningún beneficio para el paciente con DMD (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).

## **6. Terapia para patologías secundarias causadas por la DMD**

La pérdida de distrofina, además de causar DMD que es el defecto primario, puede conllevar a la aparición de patologías secundarias debido a la activación de rutas patológicas incluyendo inflamación, pérdida de la homeostasis del calcio, isquemia funcional y daño de la regeneración muscular (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). Hay terapias que se centran en estas patologías secundarias para ralentizar la progresión de la enfermedad. Dentro de estas terapias destacamos los antiinflamatorios, grupo de medicamentos en el que se encuentran los corticoesteroides como prednisona, prednisolona y deflazacort, que son los tratamientos estándar para la DMD (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). Logran ralentizar la progresión de la



enfermedad pero su uso crónico tiene efectos adversos como ganar peso, retraso en el crecimiento, resistencia a la insulina, osteoporosis y cambios de humor (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019).

El estrés oxidativo es uno de los signos más comunes en la DMD, muchas rutas contribuyen al aumento de ROS, especies reactivas de oxígeno, dando lugar a un aumento de los niveles de calcio intracelular (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019). Para combatir este estrés oxidativo se hace uso de los antioxidantes como la idebenona, la cual se encuentra en ensayos experimentales.

Otro tipo de fármacos son los vasodilatadores (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019) ya que los pacientes con DMD sufren de isquemia debido al mal funcionamiento de la enzima NOS al darse una falta de distrofina. Sildenafil y tadalafil (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019) tienen propiedades vasodilatadoras y son usados frente a la disfunción eréctil y el fallo cardiaco.

Además, se puede inhibir la miostatina (Verhaart y Aartsma-Rus, 2019), que es una proteína que limita el crecimiento muscular, mediante la administración de fármacos para estimular la regeneración del tejido muscular en los pacientes con DMD.

## 7. Conclusiones

- La mayoría de las terapias génicas buscan transformar el fenotipo DMD en un fenotipo BMD, produciéndose así distrofina funcional y consiguiendo unas manifestaciones más leves de la enfermedad.
- La terapia con micro/minidistrofinas ha demostrado ser poco eficaz por ser a corto plazo y por la inmunidad mostrada por los pacientes frente al vector AAV, con el cual se introducen estas micro/minidistrofinas en el músculo. Además, la dosis de vector requerida por cada paciente es muy alta, por lo que la fabricación de estos lleva tiempo y es costosa.
- El salto de exón es el método más empleado en la actualidad para tratar a pacientes con DMD ya que beneficia a un amplio grupo de pacientes. En esta técnica los oligonucleótidos antisentido hibridan con una secuencia específica



del mRNA de la distrofina e impiden su traducción, lo que provoca el salto de exón y la restauración del marco de lectura. Se pueden realizar saltos de exones individuales y múltiples, además esta técnica se aplica tanto en casos de delección como en casos de duplicaciones de exones.

- Los oligonucleótidos antisentido que tienen mayor importancia para el salto de exón 51 son: eteplirsén (PMO), drisapersén (2'OMePS) y los triciclo-DNAs (tcDNA). El problema de este método es la baja recepción de estas moléculas por parte del músculo; por tanto, se debe mejorar esta recepción para mejorar la eficiencia. Esto se consigue conjugando los oligonucleótidos antisentido con péptidos dirigidos a los músculos.
- Otro sistema muy eficaz para la terapia de la DMD es la edición del genoma mediante CRISPR/Cas9 que puede eliminar uno o varios exones de una sola vez. Esta tecnología emplea un RNA guía diseñado específicamente y la proteína Cas9, que son entregados a las células musculares mediante un vector AAV. Al igual que con la terapia de micro/minidistrofinas los pacientes pueden mostrar inmunidad frente a este vector, y con el tiempo los niveles de distrofina descienden. Además, Cas9 puede inducir roturas en lugares fuera del sitio objetivo.
- Si la DMD es causada por una mutación sin sentido, el marco de lectura no se desorganiza, y podemos repararla gracias a compuestos que fuerzan a la maquinaria de traducción a incorporar un aminoácido en lugar de detenerse en ese codón de parada prematuro. Ejemplos de estos compuestos son la gentamicina y el ataluren. El ataluren fue aprobado condicionalmente por la EMA y actualmente no se encuentra disponible en todos los países.
- La mayoría de estas terapias tienen algunas consecuencias negativas o no son eficaces al 100%, por lo que, a pesar de los avances de los últimos años y de los ensayos clínicos que se están realizando, es necesaria la investigación para desarrollar terapias efectivas que minimicen los síntomas de los niños con DMD, que a tantas familias afecta.



## 8. Bibliografía

- 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(1), pp. 199–212. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05836.x.
- 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. 1–9. doi:10.1186/1471-2350-8-43.
- Aartsma-Rus, A. y van Ommen, G. J. B. (2009) "Less is more: therapeutic exon skipping for Duchenne muscular dystrophy", *The Lancet Neurology*. Elsevier Ltd, 8(10), pp. 873–875. doi:10.1016/S1474-4422(09)70229-7.
- 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*, 51(October), pp. 1–6. doi:10.1126/aau1549(2018).
- Bengtsson, N. E., Hall, J. K., Odom, G. L., Phelps, M. P., Andrus, C. R., Hawkins, R. D., Hauschka, S. D., Chamberlain, J. R. y Chamberlain, J. S. (2016) "Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy", *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 8, pp. 1–9. doi:10.1038/ncomms14454.
- Breitbart, A. y Murry, C. E. (2016) "Imprecision Medicine: A One-Size-Fits-Many Approach for Muscle Dystrophy", *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc., 18(4), pp. 423–424. doi:10.1016/j.stem.2016.03.004.
- Camacho Salas, A. (2014) "Distrofía muscular de Duchenne", *Anales de Pediatría Continuada*, 12(2), pp. 47–54. doi:10.1016/S1696-2818(14)70168-4.
- Chamberlain, J. R. y Chamberlain, J. S. (2017) "Progress toward Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy", *Molecular Therapy*. Elsevier Ltd., 25(5), pp. 1125–1131. doi:10.1016/j.yymthe.2017.02.019.
- 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. doi:10.7150/ijbs.17421.
- Cirak, S., Arechavala-Gomez, V., Guglieri, M., Feng, L., Torelli, S., Anthony, K., Abbs, S., Garralda, M. E., Bourke, J., Wells, D. J., Dickson, G., Wood, M. J., Wilton, S. D., Straub, V., Kole, R., Shrewsbury, S. B., Sewry, C., Morgan, J. E., Bushby, K. y Muntoni, F. (2011) "Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: An open-label, phase 2, dose-escalation study", *The Lancet*. Elsevier Ltd, 378(9791), pp. 595–605. doi:10.1016/S0140-6736(11)60756-3.
- 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 exon skipping therapy in duchenne muscular dystrophy", *Molecular Therapy*. Nature Publishing Group, 20(2), pp. 462–467. doi:10.1038/mt.2011.248.
- Duchenne Parent Project España (2021) *Duchenne Parent Project España*. Disponible en: <https://www.duchenne-spain.org> (Accedido: 22 de junio de 2021).
- Echevarría, L., Aupy, P. y Goyenvalle, A. (2018) "Exon-skipping advances for Duchenne muscular dystrophy", *Human Molecular Genetics*, 27(R2), pp. R163–R172. doi:10.1093/hmg/ddy171.
- Echigoya, Y., Aoki, Y., Miskew, B., Panesar, D., Touznik, A., Nagata, T., Tanihata, J., Nakamura, A., Nagaraju, K. y 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*. American Society of Gene & Cell Therapy, 4(2), pp. 1–10. doi:10.1038/mtna.2014.76.



Falzarano, M. S., Scotton, C., Passarelli, C. y Ferlini, A. (2015) "Duchenne muscular dystrophy: From diagnosis to therapy", *Molecules*, 20(10), pp. 18168–18184. doi:10.3390/molecules201018168.

González-Huerta, N. C., Hernández-Zamora, E., Arenas-Sordo, M. D. L., Escobar-Cedillo, R. E., Miranda-Duarte, A. y Leyva-García, N. (2004) "Identificación de deleciones en el gen DMD mediante PCR múltiple en pacientes mexicanos con distrofia muscular de Duchenne/Becker", *Revista Médica del Hospital General*, 67(4), pp. 196–202.

Heemskerck, H. A., de Winter, C. L., de Kimpe, S. J., van Kuik-Romeijn, P., Heuvelmans, N., Platenburg, G. J., van Ommen, G. J. B., van Deutekom J. C. T. y Aartsma-Rus, A. (2009) "In vivo comparison of 2'-O-methyl phosphorothioate and morpholino antisense oligonucleotides for Duchenne muscular dystrophy exon skipping", *The Journal of Gene Medicine*, 11, pp. 257-266. doi:10.1002/jgm.1288.

Hotta, A. (2015) "Genome Editing Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy", *Journal of Neuromuscular Diseases*, 2(4), pp. 343–355. doi:10.3233/JND-150116.

Kole, R. y Krieg, A. M. (2015) "Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy", *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 87, pp. 104–107. doi:10.1016/j.addr.2015.05.008.

Lammoglia-Cobo, M., Lozano-Reyes, R., García-Sandoval, C., Avilez-Bahena, C., Trejo-Reveles, V., Muñoz-Soto, R. y López-Camacho, C. (2016) "La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas", *Investigación en Discapacidad*, 5(2), pp. 116–128.

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. doi:10.17305/bjbms.2015.636.

Li, H. L., Fujimoto, N., Sasakawa, N., Shirai, S., Ohkame, T., Sakuma, T., Tanaka, M., Amano, N., 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*. Elsevier, 4(1), pp. 143–154. doi:10.1016/j.stemcr.2014.10.013.

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. doi:10.2147/DDDT.S97635.

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). doi:10.3390/jpm8040038.

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. doi:10.1002/ana.22024.

Mendell, J. R. y Rodino-Klapac, L. R. (2016) "Duchenne muscular dystrophy: CRISPR/Cas9 treatment", *Cell Research*. Nature Publishing Group, 26(5), pp. 513–514. doi:10.1038/cr.2016.28.

Namgoong, J. y Bertoni, C. (2016) "Clinical potential of ataluren in the treatment of Duchenne muscular dystrophy", *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease*, p. 37. doi:10.2147/dnnd.s71808.

Nascimento Osorio, A., Medina Cantillo, J., Camacho Salas, A., Madruga Garrido, M. y Vilchez Padilla, J. J. (2017) "Consensus on the diagnosis, treatment and follow-up of patients with Duchenne muscular dystrophy", *Neurología*. Sociedad Española de Neurología, 34(7), pp. 469–481. doi:10.1016/j.nrl.2018.01.001.

Nelson, S. F., Crosbie, R. H., Miceli, M. C. y Spencer M. J. (2009) "Emerging genetic therapies to treat Duchenne muscular dystrophy", *Current Opinion in Neurology*, 22(5), pp. 532-538. doi: 10.1097/WCO.0b013e32832fd487.



- Ousterout, D. G., Kabadi, A. M., Thakore, P. I., Majoros, W. H., Reddy, T. E. y Gersbach, C. A. (2015) "Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause duchenne muscular dystrophy", *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 6, pp. 1–13. doi:10.1038/ncomms7244.
- 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*. Elsevier Ltd., 27(3), pp. 623–635. doi:10.1016/j.ymthe.2019.01.002.
- Ramos Yáñez, D., Cruz, D. y Andrade Albán, N. (2017) "Distrofia muscular de Duchenne: presentación de un caso.", *Mediciencias UTA*, 1(4), p. 10. doi:10.31243/mdc.uta.v1i4.24.2018.
- Salva, M. Z., Hameda, C. L., Tai, P. W. L., Nishiuchi, E., Gregorevic, P., Allen, J. M., Finn, E. E., Nguyen, Q. G., Blankinship, M. J., Meuse, L., Chamberlain, J. S. y Hauschka, S. D. (2007) "Design of tissue-specific regulatory cassettes for high-level rAAV-mediated expression in skeletal and cardiac muscle", *Molecular Therapy*. The American Society of Gene Therapy, 15(2), pp. 320–329. doi:10.1038/sj.mt.6300027.
- Shieh, P. B. (2018) "Emerging Strategies in the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy", *Neurotherapeutics*. Neurotherapeutics, 15(4), pp. 840–848. doi:10.1007/s13311-018-00687-z.
- Sierra Delgado, J., Bautista Nino, P., Vargas Castellanos, C., Serrano Diaz, N. y Rincón, M. (2019) "Respuesta inmune contra los virus adenoasociados Características de los virus adenoasociados", *MEDICINA (Buenos Aires)*, 79, pp. 493–501.
- 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. doi:10.1126/science.aad5177.
- Verhaart, I. E. C. y Aartsma-Rus, A. (2019) "Therapeutic developments for Duchenne muscular dystrophy", *Nature Reviews Neurology*. Springer US, 15(7), pp. 373–386. doi:10.1038/s41582-019-0203-3.
- Wang, J. Z., Wu, P., Shi, Z. M., Xu, Y. L. y Liu, Z. J. (2017) "The AAV-mediated and RNA-guided CRISPR/Cas9 system for gene therapy of DMD and BMD", *Brain and Development*. The Japanese Society of Child Neurology, 39(7), pp. 547–556. doi:10.1016/j.braindev.2017.03.024.
- 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-Derived Muscle Cells", *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc., 18(4), pp. 533–540. doi:10.1016/j.stem.2016.01.021.
- Zhu, P., Wu, F., Mosenson, J., Zhang, H., He, T. C. y Wu, W. S. (2017) "CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing Corrects Dystrophin Mutation in Skeletal Muscle Stem Cells in a Mouse Model of Muscle Dystrophy", *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. Elsevier Ltd., 7(June), pp. 31–41. Doi:10.1016/j.omtn.2017.02.007.