



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE MEDICINA

**“TERAPIA GÉNICA COMO TRATAMIENTO PARA LA
DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MÉDICO**

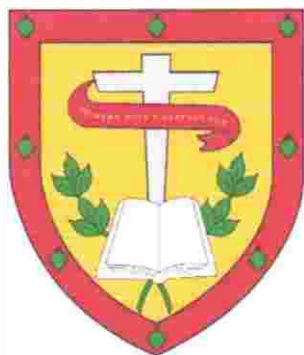
AUTOR: GABRIEL NICOLAS MORA SERRANO

DIRECTOR: DR. FREDDY DAMIAN CASTILLO SOLANO

CUENCA - ECUADOR

2023

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE MEDICINA

**“TERAPIA GÉNICA COMO TRATAMIENTO PARA LA
DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MÉDICO**

AUTOR: GABRIEL NICOLAS MORA SERRANO

DIRECTOR: DR. FREDDY DAMIAN CASTILLO SOLANO

CUENCA-ECUADOR

2023

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

DECLARATORIA DE AUTORÍA Y RESPONSABILIDAD

Gabriel Nicolas Mora Serrano portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **140074'0567**. Declaro ser el autor de la obra: **“TERAPIA GÉNICA COMO TRATAMIENTO PARA LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE”**, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, 21 de agosto de 2023

F: 

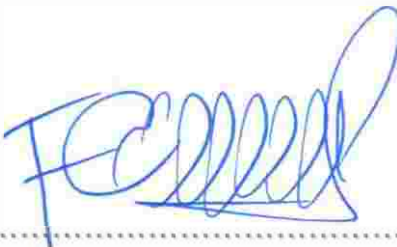
Gabriel Nicolas Mora Serrano

C.I. 1400740567

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR/ TUTOR

Certifico que el presente trabajo denominado "TERAPIA GÉNICA COMO TRATAMIENTO PARA LA DISTRÓFIA MUSCULAR DE DUCHENNE" realizado por **Gabriel Nicolas Mora Serrano** con documento de identidad No. **1400740567**, previo a la obtención del título profesional de Médico, ha sido asesorado, supervisado y desarrollado bajo mi tutoría en todo su proceso, cumpliendo con la reglamentación pertinente que exige la Universidad Católica de Cuenca y los requisitos que determina la investigación científica.

Cuenca, 21 de agosto de 2023

F: 

Dr. Freddy Damian Castillo Solano

DIRECTOR/ TUTOR

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi madre por haberme enseñado los valores esenciales para poder seguir estudiando esta carrera, por confiar en mí y haberme dado su apoyo incondicional en todo momento.

A mi hermano que ha sabido enseñarme sobre la responsabilidad con el estudio durante mi formación académica.

A mis abuelos que siempre me dieron su apoyo y creyeron en mí, por haberme enseñado a ser un hombre de bien y por haberme motivado día a día para poder cumplir mis sueños.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a toda mi familia por haberme dado su apoyo durante mis estudios, por su comprensión y cariño que fue incondicional e importante para poder seguir estudiando a pesar de la distancia en la que nos encontramos.

A todos los docentes que tuve el placer de conocer y compartir un aula durante mis estudios en esta Universidad un eterno agradecimiento por el aporte de sus conocimientos para mi formación como profesional de la salud.

A mis amigos que conocí dentro de las aulas de estudio, que siempre supieron ayudarme y apoyarme en los momentos más difíciles, por su aporte en mi formación y su amistad leal y desinteresada.

1. RESUMEN

Introducción: A nivel mundial la prevalencia de la Distrofia muscular de Duchenne es de 0.5 de cada 100 000 nacidos vivos varones. En Perú se vio una prevalencia del 0,49%; es decir, una prevalencia muy similar a la que se describe a nivel mundial. La DMD hoy en día se sigue considerando como una patología sin un tratamiento definitivo

Objetivo: Describir la utilidad de la terapia génica como tratamiento para la distrofia muscular de Duchenne.

Métodos: Se realizó una revisión bibliográfica en bases de datos como Pubmed, Springer Link y Scielo, los artículos revisados fueron en inglés y español, con un máximo de 5 años de antigüedad, se extrajo toda la información necesaria acerca de la terapia génica en la distrofia muscular de Duchenne.

Resultados: La terapia de salto del exón es la única terapia génica aprobada hoy en día; ya que ha demostrado la restauración del marco de lectura de distrofina con fármacos como: Eteplirsén, Golodirsén, Vitolarsén, Casimersén. La terapia mediada por CRISPR/Cas9 que aún se encuentra en estudios preclínicos es la más prometedora al permitir una expresión de distrofina mediante el reencuadre del exón, omisión del exón y eliminación por doble corte.

Consideraciones finales: Por el momento la terapia del salto del exón es la terapia que ha evolucionado más rápido, ya que ha mostrado ciertos beneficios a la hora de restaurar la expresión de distrofina y mejorar la marcha de los pacientes, pero esta solo puede ser utilizada en pacientes con mutaciones en exones específicos.

Palabras Clave: Duchenne, Terapia Génica, CRISPR/Cas9, Salto del exón, tratamiento, diagnóstico.

2. ABSTRACT

Introduction: Duchenne muscular dystrophy (DMD) has a worldwide prevalence of 0.5 per 100,000 live births. In Peru, the prevalence is 0.49%. DMD is still considered a condition without definitive treatment.

Objective: To describe the usefulness of gene therapy as a treatment for Duchenne muscular dystrophy.

Methods: A literature review was conducted using the PubMed, Springer Link, and SciELO databases. The reviewed articles were in English and Spanish, with a maximum age of 5 years. All the necessary information about gene therapy in Duchenne muscular dystrophy was extracted.

Results: Exon-skipping therapy is currently the only approved gene therapy as it has shown the restoration of the dystrophin reading frame with drugs like Eteplirsen, Golodirsen, Vitolarsen, and Casimersen. CRISPR/Cas9-mediated therapy —still in preclinical studies— is promising as it enables dystrophin expression through exon reframing, skipping, and double-cut deletion.

Final considerations: Currently, exon-skipping therapy is the fastest evolving therapy, demonstrating benefits in restoring dystrophin expression and improving the patient's gait. However, it can only be used in patients with mutations in specific exons.

Keywords: Duchenne, Gene therapy, CRISPR/Cas9, Exon skipping, diagnosis.

ÍNDICE

1. RESUMEN	7
2. ABSTRACT	8
3. INTRODUCCIÓN	10
4. METODOLOGÍA	11
5. DESARROLLO DEL TRABAJO	12
5.1. Bases genéticas	12
5.2. Manifestaciones clínicas.....	13
5.3. Diagnóstico	13
5.4. Tratamiento farmacológico	13
5.4.1 Glucocorticoides	13
5.4.2 Inhibidores de la fosfodiesterasa 5A	14
5.4.3 Inhibidores de NF-KB	14
5.5. Terapia de lectura	14
5.5.1 Ataluren	14
5.6. Terapia génica	15
5.6.1 Elevidys.....	15
5.6.2 Givinostat	15
5.6.3 Terapia de salto del exón	15
5.6.4 Edición del gen mediada por CRISPR/Cas9	17
6. CONCLUSIONES	20
7. BIBLIOGRAFÍA	21
8. GLOSARIO	25

3. INTRODUCCIÓN

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es un trastorno genético neuromuscular de carácter recesivo ligado al cromosoma X; en donde existen mutaciones en el gen *dmd* el cual es el encargado de codificar la distrofina, produciendo una cantidad inadecuada de esta proteína en las fibras musculares, neuronas y corazón; Cumple con funciones como: mantener fuerza, funcionalidad y estabilidad de las fibras musculo esqueléticas.(1)

A nivel mundial la prevalencia de la DMD es de 0.5 de cada 100 000 nacidos vivos varones. El Centro de control y prevención de enfermedades (CDC), indica que la incidencia de la DMD es de 1 de cada 3500-6000 nacidos vivos.(2). En España se ha visto una prevalencia de 4.78/100.000, mientras que en el Reino Unido se vio una prevalencia de 8,3/100.000 varones(3). En Estados unidos se vio una prevalencia de 3.5/100.000 habitantes, mientras que en Canadá la prevalencia fue de 2.74/100.000 habitantes(4). Se estima que la prevalencia en Brasil es del 0,44/1000.000 nacidos vivos(5). En Perú se vio una prevalencia del 0,49%; es decir, una prevalencia muy similar a la que se describe a nivel mundial. En Ecuador no existe una incidencia; sin embargo, se han reportado varios casos.(6)

La DMD hoy en día se sigue considerando como una patología sin un tratamiento definitivo o de prevención. Sin embargo, en los últimos años se ha realizado ensayos clínicos implementando nuevas terapias como es el caso de la terapia génica.(7)

Se conoce a la DMD como una enfermedad letal debido a que muchos pacientes no viven más allá de la edad pediátrica; por las complicaciones a nivel cardíaco, provocando parada cardiorrespiratoria que acaba con la vida de los pacientes en la tercera década de vida.(8)

Aunque hasta hace algunas décadas las opciones de tratamiento eran: terapia física, electroestimulación, farmacoterapia como la corticoterapia, que es administrada en altas dosis, lo cual puede generar efectos adversos en el sistema inmunitario y esto a su vez produce una reducción de la eficacia del tratamiento.(9,10) A día de hoy con los ensayos clínicos que se han realizado incluyendo a la terapia génica como un nuevo y eficaz tratamiento que ha dado resultados alentadores en todos estos pacientes.(11)

Aunque las nuevas estrategias terapéuticas han dado resultados prometedores, todavía se describe a la DMD como una enfermedad sin una resolución total, lo cual sigue siendo una problemática.(12,13)

La finalidad de esta investigación es describir utilidad de la terapia génica; además, de todos los avances que se han ido evidenciando en los últimos años con la implementación de fármacos

que actúan en la modificación génica de la DMD y sus beneficios en pacientes diagnosticados con esta patología.

4. METODOLOGÍA

La siguiente revisión bibliográfica se realizó mediante la obtención de información acerca de la utilidad de la terapia génica en la distrofia muscular de Duchenne. Toda la información fue extraída de artículos científicos de bases de datos como Pubmed, Springer Link, Scielo, en donde se aplicaron términos MESH; “Duchenne”, “Gene therapy”, “CRISPR/Cas9” “Exón Skipping”, “Treatment”, “Diagnosis”.

Se incluyeron artículos en inglés y español de revistas indexadas; con una antigüedad máxima de 5 años, es decir, desde el año 2019 al año 2023; salvo el caso de ensayos clínicos y trabajos de revisión con una antigüedad mayor a la establecida que han sido incluidos en el estudio por la relevancia en el tema.

Se realizó la extracción de información del tema mediante la lectura de los artículos seleccionados previamente; toda la información útil obtenida en el análisis fue transmitida a los resultados la investigación con la finalidad de verificar si la terapia génica es la mejor opción terapéutica en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne; con la finalidad de responder los objetivos que se han planteado.

5. DESARROLLO DEL TRABAJO

La DMD se trata de una enfermedad de carácter hereditario ligada al cromosoma X de carácter recesivo, El gen afectado se trata del más grande que se conoce es el DMD, constituido por 79 exones, un tamaño aproximado de 2,2 megabases y que se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma X (Posición Xp21.2-p21.1).(14) El gen va a codificar la distrofina, la cual es una proteína de 3685 aminoácidos que cumple con la función de estabilidad de la membrana plasmática durante la contracción muscular y fuerza de las fibras musculares.(15) Al existir esta alteración en la codificación de la distrofina se va a producir una atrofia muscular, produciendo degeneración muscular(16).

5.1. Bases genéticas

Hasta la fecha se han reconocido un aproximado de 1.100 mutaciones, de las cuales el 65% se deben a deleciones de exones, 15% a duplicaciones y el 20% corresponde a pequeñas mutaciones puntuales(17).

La DMD se produce por la ausencia de la distrofina. Esto provoca daño del sarcolema por estrés mecánico, pérdida de la homeostasis del calcio intracitoplasmático y degeneración de la fibra muscular. La fibra se necrosa y los intentos de regeneración muscular son insuficientes hasta que el tejido muscular normal es sustituido por tejido fibroadiposo. Estos cambios de necrosis, regeneración e infiltración grasa son visibles en la biopsia muscular y constituyen el patrón muscular distrófico(18).

Se ha establecido que en la DMD las mutaciones provocan una temprana interrupción de proteínas; por lo cual, hay ausencia de distrofina; no como en el caso de la Distrofia Muscular de Becker en la cual la distrofina es anormal pero funciona de manera parcial, la distrofina tiene la función de amortiguador en la contracción muscular, existen mecanismos involucrados como: (19)

- Aumento de calcio intracelular: cuando existe daños en la membrana muscular hay un incremento de calcio a nivel intracelular; lo cual activa la proteasa, en específico, las calpaínas provocando necrosis de las fibras musculares(20).
- Daño mecánico: cuando existe deficiencia de distrofina se produce un estrés en la membrana celular; lo cual se ve reflejado con el incremento en la permeabilidad de las membranas musculares(20).
- Deteriorización de moléculas de señalización: Al no existir distrofina se produce regulación de la óxido nítrico sintasa neuronal, la cual produce óxido nítrico, el cual es

el encargado de mantener el tono vascular, este último se ve reducido, conduciendo a la vasoconstricción y por consecuente se produce isquemia muscular(11).

- Incremento de células inmunitarias: Se ha encontrado niveles altos de células T como son las CD4 y CD8 que se localizan en músculos distróficos, provocando más fibrosis y daño muscular(11).

5.2. Manifestaciones clínicas

La DMD por lo general se presenta en los primeros años de vida; evidenciando aspectos motores retrasados como, la independencia al caminar, pararse estando acostado de manera supina, dificultad para correr, subir escalones, saltar, debilidad proximal produce la conocida marcha de pato.(21) Esta patología es progresiva y por esto los pacientes pierden la capacidad de deambulación aproximadamente a los 13 años. La aparición de miocardiopatías es luego de los 18 años de edad, muy pocos pacientes llegan a sobrevivir a más de la tercera década debido a complicaciones sistémicas.(22)

5.3. Diagnóstico

En aquellos pacientes que se observe clínica de DMD se debe realizar la determinación de creatina quinasa (CK) en sus niveles séricos, en los pacientes con Duchenne se ven niveles 10 o 100 veces superiores al normal.(19)

Si el paciente posee una CK elevada se debe realizar estudios genéticos como es la Amplificación de la sonda dependiente de la ligadura múltiple (MLPA), la cual analiza los 79 exones del gen DMD para la detección de deleciones o duplicaciones que se encuentran presente en aproximadamente el 70% de los casos, si este examen determina algún tipo de mutación y el paciente presente fenotipo compatible; el diagnóstico de DMD es confirmado.(17)

En el caso de que el estudio genético no resalte alguna mutación y la CK se encuentre incrementada sumado a esto el paciente presenta sintomatología compatible se realizara una biopsia muscular para descartar DMD.(19)

5.4. Tratamiento farmacológico

5.4.1 Glucocorticoides

La utilización de glucocorticoides como Prednisona en dosis de 0,75mg/kg/día o el deflazacort en dosis de 0,9mg/kg/día han demostrado un retraso en la pérdida de deambulación; el deflazacort tiene una menor liposolubilidad causando menos retención de sodio y menor efecto en el metabolismo de la glucosa, este fármaco ha demostrado mejores resultados que la

prednisona ya que mantiene funciones motoras clave, retrasando la progresión de la enfermedad.(23) Sin embargo, el uso de esta terapia puede tener efectos secundarios como: incremento de riesgo de fracturas, intolerancia a la glucosa, inmunosupresión y problemas gastrointestinales.(24)

5.4.2 Inhibidores de la fosfodiesterasa 5A

En la DMD existe disminución de óxido nítrico, el cual es un potente vasodilatador; esta reducción produce la disminución de la irrigación a nivel muscular produciendo una necrosis de los músculos. El tadalafil y el sildenafil son fármacos que inhiben la fosfodiesterasa 5A y producen vasodilatación; lo que ayudaría con la disminución de la isquemia muscular que se debe a la ausencia de distrofina. Se ha iniciado ensayos clínicos de estos fármacos, en donde el sildenafil no mostro mejoría en pacientes con miocardiopatías.(7)

5.4.3 Inhibidores de NF-KB

Una de las causas de la degradación de proteínas musculares en la DMD es debido a la activación del NF-KB (Factor nuclear), la activación hace que se produzcan quimiocinas o citocinas. Edasalonexent es un fármaco capaz de inhibir el factor nuclear, se ha visto seguridad y buena tolerancia del fármaco en pacientes con DMD en la fase 1, en el ensayo de fase 2 acerca de la eficacia de este fármaco se vio resultados alentadores y ha iniciado su ensayo clínico de fase 3.(7)

5.5. Terapia de lectura

5.5.1 Ataluren

Es aplicable en tan solo el 10% de pacientes con mutaciones sin sentido.(24) Esta terapia es capaz de suprimir los codones de parada prematuros, sin la afección de la terminación de traducción en codones de parada normales.(25) Este es un fármaco aprobado por la Agencia Europea de medicamentos (EMA) pero no ha sido aprobado hasta la fecha por la Administración de alimentos y medicamentos (FDA). En la fase I del ensayo clínico se evidencio una seguridad y eficacia alentadora, en la fase IIa la expresión de distrofina aumento en 23/38 pacientes, en la fase IIb hubo una leve mejora en la caminata de 6 minutos (6MWT) con respecto a los pacientes que no fueron tratados con el fármaco, pero en su fase III no hubo diferencia alguna en la mejoría de la prueba 6MWT entre el grupo placebo y el grupo tratado con Ataluren.(24,26) Además, el Ataluren puede llegar a retrasar la perdida de deambulaci3n en 2 años luego de que se realizara el estudio con una dosis de 40mg/kg/día por 240 semanas en un grupo de 60 pacientes con DMD.(27)

5.6. Terapia génica

5.6.1 Elevidys

Fármaco aprobado en el año 2023, se trata de una terapia génica que se basa en virus adenoasociados para pacientes de entre 4-5 años con DMD con mutaciones confirmadas, se basa en la entrega de un gen que codifica micro distrofinas en el musculo esquelético, en el estudio realizado en 20 pacientes que se trataron con este fármaco demostraron una mejoría de 3,8 puntos en la escala NSAA luego de un año de tratamiento, también se observó que en pacientes con mejoría de 4 puntos en la escala mientras que los pacientes en control externo tuvieron una mejoría de 0,2 puntos. En las pruebas cronometradas los pacientes que fueron tratados con elevidys mejoraron alrededor de 1,0 segundo en la caminata de 10 metros. En cuanto a los efectos adversos más comunes que se observaron fue el vómito, además existió aumento de las enzimas hepáticas transitorias que respondieron a la administración de esteroides, este fármaco se encuentra en fase 3 de ensayo próximo a su confirmación como opción terapéutica en la DMD(28).

5.6.2 Givinostat

Fármaco aprobado en el 2020 por la FDA. Es un inhibidor de la HDAC, estimulando la miogenesis y disminuyendo la degeneración muscular, además este fármaco tiene efectos antiinflamatorios, en los estudios realizados se comparó al grupo tratado con givinostat y placebo en cuanto al tiempo en el que pueden subir 4 escalones siendo la diferencia entre estos dos grupos de 1,78 segundos. Otro objetivo fue medir el porcentaje de infiltración en el musculo vasto lateral, la infiltración a este nivel es una de las principales características de la progresión de DMD, esto se evaluó mediante Espectroscopia de Resonancia Magnética, los resultados demostraron que el tratamiento con givinostat logro un retraso en la infiltración de tejido adiposo de un 30% aproximadamente. En cuanto a los efectos adversos que presentaron los pacientes fueron trombocitopenia, hipertrigliceridemia, dolor abdominal y diarrea en 1/10 pacientes, este fármaco al igual que elevidys se encuentra en ensayo de fase 3 en espera para su aceptación como tratamiento para la distrofia muscular de Duchenne(29).

5.6.3 Terapia de salto del exón

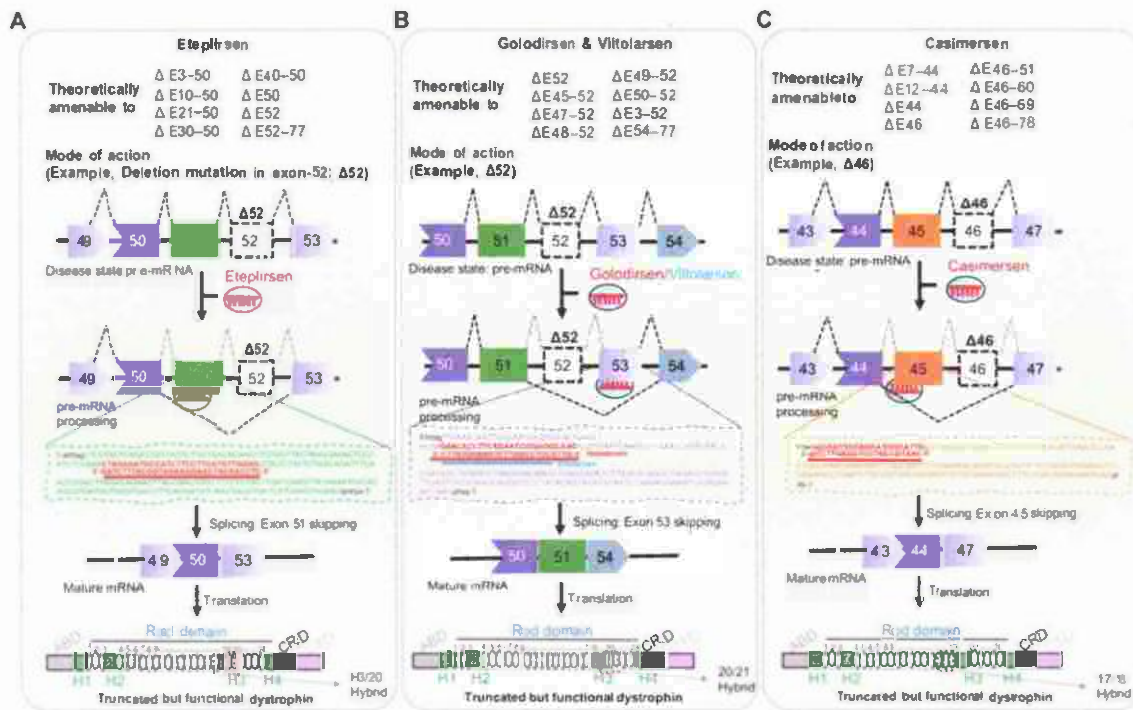
Los oligonucleótidos anti sentidos (ASO) son capaces de restaurar el marco de lectura interrumpido. El objetivo de este tratamiento es convertir una DMD grave a una DMD leve o en una distrofia muscular de Becker, induciendo la producción de distrofina truncada, pero de alguna manera funcional.(30) El mecanismo de acción del salto del exón consiste en la unión del exón anterior y el exón posterior a la deleción, continuando el marco de lectura y la

expresión de la distrofina (Figura 1).(31) El trabajo de este fármaco es añadirse al exón mutado y ocultarlo de la máquina de empalme, antes de esto los ASO pueden unirse al pre-ARNm de la distrofina saltándose el exón al leer el ARNm maduro mientras se produce la proteína.(32) Hoy en día existen varios fármacos aprobados por la FDA para su tratamiento (Tabla I):

Tabla I. Fármacos de la omisión del exón aprobados por la FDA según varios autores.

Fármaco	Año de aprobación	% de restauración de distrofina	Mecanismo de acción	Dosis mg/kg/semana	Fase actual de estudio	Estudio
Eteplirsén	2016	0.93%	Omisión del exón 51	30-50	Fase II	Mendell JR, Rodino-Kaplan LR, Sahenk Z, et al. (33)
Golodirsén	2019	1%	Omisión del exón 53	30	Fase III	Servais L, Mercuri E, Straub V, et al. (34)
Vitolarsén	2020	4.8%	Omisión del exón 53	80	Fase III	Komaki H, Takeshima Y, Matsumura T, et al. (35)
Casimersén	2021	1.74%	Omisión del exón 45	30	Fase III	Pascual C, Cavero I, Álvarez I, et al. (36)

Fuente: Elaboración propia.



Fuente: Saifullah y otros.(37)

Fig. 2 (A) Eteplirsén, un ASO morfolino que permite la omisión del exón 51, (B) Golodirsén y Vitolarsén, también ASO morfolino que permite la omisión del exón 53, (C) Casimersén, permite el salto del exón 45, todos estos aplicados como terapias en DMD. Las mutaciones que han respondido a cada terapia se encuentran en las secciones superiores: Δ deleción; E, exón; el número indica el número de exón del gen. La ocupación final del salto del exón en la distrofina, dominio de unión a actina H1-H4, dominios bisagra (24 dominios), dominio rico en cisteína, dominio D-terminal. Como ejemplo se muestra la deleción del exón 52 en la sección A y B y la deleción del exón 46 en la sección C. La omisión del exón 51-52 en la sección A, 52-53 en la sección B y 45-46 en la sección C dieron como resultado una distrofina truncada pero funcional.

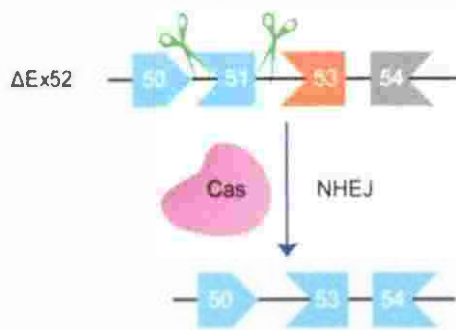
5.6.4 Edición del gen mediada por CRISPR/Cas9

La edición genética por CRISPR es un método de defensa bacteriano contra los procesos virales. Consta de dos sistemas: la endonucleasa que se asocia a CRISPR y un ARNg que dirige a Cas9 a un área específica de veinte nucleótidos en el genoma cuyas secuencias son complementarias.(38)

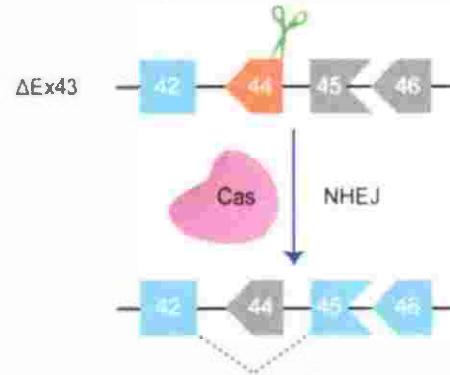
Se puede compensar mediante dos principales vías de reparación endógena: la unión de dos extremos no homólogos (NHEJ) y reparación por extremos homólogos (HDR), esta última va a requerir al menos una plantilla de ADN exógeno que luego será utilizada para la edición precisa en el sitio de la mutación.(39)

En la DMD la vía predominante es la NHEJ la cual genera pequeñas eliminaciones o inserciones que tienen la capacidad de restauración de expresión de distrofina mediante varios mecanismos: omisión del exón, reencuadre de exón por corte único y la eliminación de exón por corte doble (Figura 2). en la DMD los exones mutados podrían ser sustituidos por un enfoque de knock-in que es la introducción de un ADN complementario en un lugar en particular del cromosoma, pudiendo así restaurar la distrofina.(40)

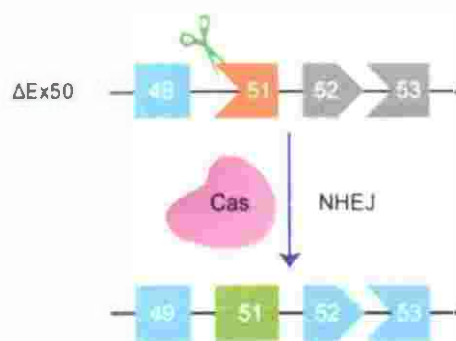
(A) Escisión del exón por doble corte



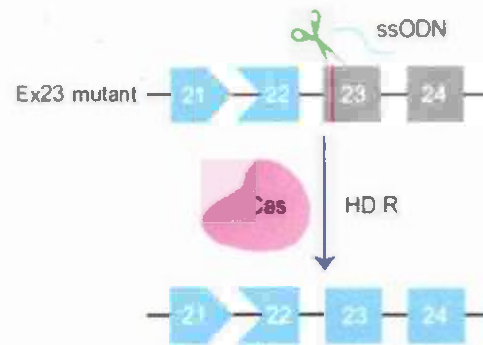
(B) Omisión del exón por un solo corte



(C) Reencuadre del exón por corte único



(D) Corrección de mutación precisa por vía HDR



Fuente: Cheng G y otros.(41)

Fig. 2 (A) Escisión de exón de doble corte con el uso de sgRNA, la maquinaria NHEJ elimina el exón 51. (B) Omisión del exón de un solo corte por interrupción del sitio donante de empalme, la omisión del exón 44 induce el empalme de exón 42 con el exón 45 en el AR¹Nm. (C) Reencuadre del exón por corte único. Pequeñas inserciones o deleciones que ocurren en el exón 51 pueden restaurar el marco de lectura de distrofina. (D) Corrección de mutación precisa en el exón 23 por vía HDR en la existencia de una plantilla donante.

a) Omisión de exón

La edición del gen con corte único es eficaz en el tratamiento de mutaciones puntuales, deleciones cortas e inserciones pequeñas en regiones intrónicas y exónica del gen distrofina, esta estrategia reconstruye el marco de lectura y además la expresión de distrofina en ratones con deleción del exón 50 la cual es una de las más comunes en humanos. Aunque la eficacia es prometedora, esta terapia aún carece de perfiles de seguridad como los problemas de acción fuera del objetivo (“off-targets”) por lo que se sigue estudiando en modelos animales.(41)

b) Reencuadre de exón

Las deleciones de exones interrumpen el marco de lectura en un 51% de los casos aproximadamente, el objetivo del reencuadre es restaurar este marco de lectura mediante la formación de pequeños indels como la deleción o la inserción mediados por la NHEJ antes del codón de parada, la probabilidad de la restauración del marco de lectura es de 1/3 y esta puede ser inestable.(42)

Un estudio utilizó *Campylobacter jejuni* Cas9 (CjCas9) junto a un sgRNA empaquetado en un vector viral adenoasociados de serotipo 9 (AAV9) para la edición del gen DMD en donde se evidenció una restauración del marco de lectura formando un indel en el sitio objetivo, la expresión de distrofina fue del 28% aproximadamente con una mejoría de la fuerza muscular. La ventaja de CjCas9 se debe a que es más pequeño (2,95kb) que *Streptococcus pyogenes* Cas9 o SpCas9 (4,16kb), lo que permite empaquetar a CjCas9 en un AAV con un sgRNA y un gen marcador para el seguimiento de la entrega in vivo. El estudio fue realizado en un modelo de ratón con mutación del exón 23, dando resultados prometedores y siendo así una de las terapias más prometedoras debido a su eficacia.(43)

c) Eliminación de exón

La eliminación de 1 o más exones mediante CRISPR se podría aplicar en el 85% de pacientes con deleciones, mutaciones puntuales o duplicaciones, en este caso la escisión de exón de doble corte se da a través de dos sgRNA que se sitúan a los extremos del exón mutado, estos fueron diseñados para realizar un corte simultaneo de los sitios genómicos que se pretenden eliminar, en consecuencia de esto se llega a la restauración del marco de lectura de distrofina y esta se expresa de manera funcionalmente truncada, esta técnica es aplicada en los casos que existe duplicación del exón, que en el caso de la DMD se presenta en un 10-15%.(41)

En un estudio en ratones a los que se les elimino el exón 44 con el fin de restaurar la expresión de distrofina con la omisión del exón 45 mediante la aplicación de Cas9 y un sgRNA empaquetados en un AAV9, es decir, en la técnica se empalmaron los exones 43 y 46 restaurando el marco de lectura de distrofina, esta estrategia se asemeja a la acción del fármaco casimersen. Con la omisión se observó el 90% de restauración de distrofina en el corazón y resto de músculos, esto después de 4 semanas con una dosis sistémica única. Se estima que alrededor del 15-30% de expresión de distrofina podría brindar un beneficio terapéutico en pacientes con DMD. Sin embargo, este estudio fue realizado en ratones por lo que todavía no se ha determinado si su uso tendrá el mismo resultado en humanos con músculos de mayor tamaño y que los efectos tengan una duración larga y la edición pueda desaparecer con el tiempo necesitando así el paciente una nueva terapia, los cortes fuera del objetivo también siguen siendo el limitante, aunque no se ha visto esta reacción en ratones todavía se espera mejorar la eficacia para ingresar en ensayos clínicos.(44)

6. CONCLUSIONES

En la actualidad la terapia farmacológica con glucocorticoides aún sigue siendo una de las primeras líneas junto con la terapia física, ya que estas pueden ser aplicadas en la mayor parte de pacientes.

Sin embargo, la terapia del salto del exón es la terapia que ha evolucionado más rápido en los últimos años, ya que ha mostrado ciertos beneficios a la hora de restaurar la expresión de distrofina como es el caso del Vitolarsen que ha tenido el mejor resultado pudiendo lograr una expresión de distrofina del 4,8% y mejorar la marcha de los pacientes. Sin embargo, esta solo puede ser utilizada en pacientes con mutaciones en los exones específicos (41-51-53) en los cuales actúan los fármacos aprobados en esta terapia.

La terapia génica como tratamiento para la distrofia muscular de Duchenne es hoy en día la terapia que más se podría acercar a una cura para esta patología debido a su eficacia elevada restaurando el marco de lectura de distrofina en ensayos tanto in vitro como in vivo, estudios mencionan que podría ser aplicada hasta en el 80% de pacientes aproximadamente, aunque aún hay aspectos en los cuales se tiene que trabajar, es posiblemente la mejor opción como tratamiento en un futuro. Se prevé que esta terapia empiece sus ensayos clínicos en los próximos años.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, Apkon SD, Blackwell A, Brumbaugh D, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *Lancet Neurol.* marzo de 2018;17(3):251-67.
2. Sun C, Shen L, Zhang Z, Xie X. Therapeutic Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy: An Update. *Genes.* 23 de julio de 2020;11(8):E837.
3. Leiva-Cepas F, Montaña Martínez A, López-López I. Puesta al día en distrofia muscular de Duchenne. *Med Fam SEMERGEN.* 1 de octubre de 2021;47(7):472-81.
4. Salari N, Fatahi B, Valipour E, Kazeminia M, Fatahian R, Kiaei A, et al. Global prevalence of Duchenne and Becker muscular dystrophy: a systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg.* 15 de febrero de 2022;17(1):96.
5. Schneider NB, Roos EC, Staub ALP, Bevilacqua IP, de Almeida AC, de Camargo Martins T, et al. Estimated costs for Duchenne muscular dystrophy care in Brazil. *Drphanet J Rare Dis.* 22 de junio de 2023;18(1):159.
6. Martínez-Esteban PC, Guillén-Pinto D, Duran Padrós AA, Koc-Gonzales D, Flores-Bravo J, Méndez-Dávalos C, et al. Guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne. Sociedad Peruana de Neurología. Versión Corta. *Acta Médica Peru.* abril de 2022;39(2):205-15.
7. Arora H. Duchenne muscular dystrophy: Still an incurable disease. *Neurol India.* junio de 2019;67(3):717-23.
8. Waldrop MA, Flanigan KM. Update in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol.* octubre de 2019;32(5):722-7.
9. Atilano-Miguel S, Barbosa-Cortés L, Ortiz-Muñiz R, Atilano-Miguel S, Barbosa-Cortés L, Ortiz-Muñiz R. Duchenne muscular dystrophy: RANK/RANKL/DPG (receptor activator of nuclear factor- κ B/RANK ligand/osteoprotegerin) system and glucocorticoids. *Bol Méd Hosp Infant México.* octubre de 2022;79(5):275-83.
10. Werneck LC, Lorenzoni PJ, Ducci RDP, Fustes DH, Kay CSK, Scola RH. Duchenne muscular dystrophy: an historical treatment review. *Arq Neuropsiquiatr.* 5 de septiembre de 2019;77:579-89.
11. Nascimento Osorio A, Medina Cantillo J, Camacho Salas A, Madruga Garrido M, Vilchez Padilla JJ. Consensus on the diagnosis, treatment and follow-up of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neurol Barc Spain.* septiembre de 2019;34(7):469-81.
12. Elangkovan N, Dickson G. Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *J Neuromuscul Dis.* 2021;8(s2):S303-16.
13. Loboda A, Dulak J. Muscle and cardiac therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy: past, present, and future. *Pharmacol Rep PR.* octubre de 2020;72(5):1227-63.

14. Jones L, Naidoo M, Machado LR, Anthony K. The Duchenne muscular dystrophy gene and cancer. *Cell Oncol Dordr.* febrero de 2021;44(1):19-32.
15. Fox H, Millington L, Mahabeer I, Ruiten H van. Duchenne muscular dystrophy. *BMJ.* 23 de enero de 2020;368:17012.
16. Ferizovic N, Summers J, de Zárate IBO, Werner C, Jiang J, Landfieldt E, et al. Prognostic indicators of disease progression in Duchenne muscular dystrophy: A literature review and evidence synthesis. *PloS One.* 2022;17(3):e0265879.
17. Vargas MQ, Rodríguez NE, Gutiérrez JMR. Distrofia muscular de Duchene: diagnóstico y tratamiento. *Rev Medica Sinerg.* 1 de diciembre de 2019;4(12):e315-e315.
18. Salas AC. Distrofia muscular de Duchenne. *An Pediatría Contin.* 1 de marzo de 2014;12(2):47-54.
19. Rivas MM, Leones SMC, Ospina ER, Ruiz DMC, Echeverri RC, Arango MEM, et al. Consenso colombiano para el seguimiento de pacientes con Distrofia muscular de Duchenne. *Pediatría.* 2019;52(3):75-84.
20. Guerra-Torres M, Suárez-Obando F, García-Roblesa R, Ayala-Ramírez P. Distrofia Muscular de Duchenne/Becker. *Pediatría.* 22 de febrero de 2019;52(1):8-14.
21. Gieron-Korthals M, Fernandez R. New Developments in Diagnosis, Treatment, and Management of Duchenne Muscular Dystrophy. *Adv Pediatr.* agosto de 2020;67:183-96.
22. Crisafulli S, Sultana J, Fontana A, Salvo F, Messina S, Trifiro G. Global epidemiology of Duchenne muscular dystrophy: an updated systematic review and meta-analysis. *Orphanet J Rare Dis.* 5 de junio de 2020;15(1):141.
23. Biggar WD, Skalsky A, McDonald CM. Comparing Deflazacort and Prednisone in Duchenne Muscular Dystrophy. *J Neuromuscul Dis.* 2022;9(4):463-76.
24. Salmaninejad A, Jafari Abarghan Y, Bozorg Qomi S, Bayat H, Yousefi M, Azhdari S, et al. Common therapeutic advances for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Int J Neurosci.* abril de 2021;131(4):370-89.
25. Babbs A, Chatzopoulou M, Edwards B, Squire SE, Wilkinson IVL, Wynne GM, et al. From diagnosis to therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Biochem Soc Trans.* 30 de junio de 2020;48(3):813-21.
26. Tominari T, Aoki Y. Clinical development of novel therapies for Duchenne muscular dystrophy—Current and future. *Neurol Clin Neurosci [Internet].* [citado 17 de abril de 2023];n/a(n/a). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ncn3.12691>
27. McDonald CM, Muntoni F, Penematsa V, Jiang J, Kristensen A, Bibbiani F, et al. Ataluren delays loss of ambulation and respiratory decline in nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy patients. *J Comp Eff Res.* febrero de 2022;11(3):139-55.
28. Sarepta Therapeutics anuncia la aprobación por parte de la FDA de ELEVIDYS, la primera terapia génica para tratar la distrofia muscular de Duchenne | Terapéutica Sarepta, Inc.

- [Internet]. [citado 12 de julio de 2023]. Disponible en: <https://investorrelations.sarepta.com/news-releases/news-release-details/sarepta-therapeutics-announces-fda-approval-elevidys-first-gene>
29. Grupo Italfarmaco presenta los datos positivos del ensayo clínico en fase 3 que demuestra el efecto beneficioso de Givinostat en pacientes con distrofia muscular de Duchenne (DMD) [Internet]. 2022 [citado 12 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.italfarmaco.es/noticias/214-italfarmaco-ensayo-givinostat-distrofia-muscular>
 30. Takeda S, Clemens PR, Hoffman EP. Exon-Skipping in Duchenne Muscular Dystrophy. *J Neuromuscul Dis.* 2021;8(s2):S343-58.
 31. Ortez C, Benito DND, García LC, Expósito J, Nolasco G, Nascimento A. Avances en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne. 2019;5.
 32. Eser G, Topaloğlu H. Current Outline of Exon Skipping Trials in Duchenne Muscular Dystrophy. *Genes.* 14 de julio de 2022;13(7):1241.
 33. Mendell JR, Rodino-Klapac LR, Sahenk Z, Roush K, Bird L, Lowes LP, et al. Eteplirsén for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol.* noviembre de 2013;74(5):637-47.
 34. Servais L, Mercuri E, Straub V, Guglieri M, Seferian AM, Scoto M, et al. Long-Term Safety and Efficacy Data of Golodirsén in Ambulatory Patients with Duchenne Muscular Dystrophy Amenable to Exon 53 Skipping: A First-in-human, Multicenter, Two-Part, Open-Label, Phase 1/2 Trial. *Nucleic Acid Ther.* febrero de 2022;32(1):29-39.
 35. Komaki H, Takeshima Y, Matsumura T, Ozasa S, Funato M, Takeshita E, et al. Viltolarsén in Japanese Duchenne muscular dystrophy patients: A phase 1/2 study. *Ann Clin Transl Neurol.* diciembre de 2020;7(12):2393-408.
 36. Pascual-Morena C, Cavero-Redondo I, Álvarez-Bueno C, Mesas AE, Pozuelo-Carrascosa D, Martínez-Vizcaino V. Restorative treatments of dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy: A systematic review. *Ann Clin Transl Neurol.* septiembre de 2020;7(9):1738-52.
 37. Saifullah, Motohashi N, Tsukahara T, Aoki Y. Development of Therapeutic RNA Manipulation for Muscular Dystrophy. *Front Genome Ed* [Internet]. 2022 [citado 26 de abril de 2023];4. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgeed.2022.863651>
 38. Happi Mbakam C, Lamothe G, Tremblay G, Tremblay JP. CRISPR-Cas9 Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Neurother J Am Soc Exp Neurother.* abril de 2022;19(3):931-41.
 39. Chemello F, Bassel-Duby R, Olson EN. Correction of muscular dystrophies by CRISPR gene editing. *J Clin Invest.* 1 de junio de 2020;130(6):2766-76.
 40. Erkut E, Yokota T. CRISPR Therapeutics for Duchenne Muscular Dystrophy. *Int J Mol Sci.* 6 de febrero de 2022;23(3):1832.

41. Chen G, Wei T, Yang H, Li G, Li H. CRISPR-Based Therapeutic Gene Editing for Duchenne Muscular Dystrophy: Advances, Challenges and Perspectives. *Cells*. 22 de septiembre de 2022;11(19):2964.
42. Choi E, Koo T. CRISPR technologies for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 3 de noviembre de 2021;29(11):3179-91.
43. Koo T, Lu-Nguyen NB, Malerba A, Kim E, Kim D, Cappellari O, et al. Functional Rescue of Dystrophin Deficiency in Mice Caused by Frameshift Mutations Using *Campylobacter jejuni* Cas9. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 6 de junio de 2018;26(6):1529-38.
44. Min YL, Li H, Rodriguez-Caycedo C, Mireault AA, Huang J, Shelton JM, et al. CRISPR-Cas9 corrects Duchenne muscular dystrophy exon 44 deletion mutations in mice and human cells. *Sci Adv*. marzo de 2019;5(3):eaav4324.

8. GLOSARIO

Distrofina: proteína estructural del citoesqueleto de la membrana de la fibra muscular. El gen que la codifica se encuentra en el cromosoma X en la banda X p21.

Terapia Génica: técnica terapéutica mediante la cual se inserta un gen funcional en las células de un paciente para corregir un defecto genético causante de una patología.

Delección: tipo de cambio genético que implica la pérdida de un segmento de ADN.

Amplificación de la sonda dependiente de la ligadura múltiple: método de laboratorio para la detección de cambios anormales en el número de copias (inserciones o delecciones) de secuencias genómicas.

Fosfodiesterasa 5: enzima que cataliza la reacción de hidrólisis del fosfato cíclico del guanosín monofosfato cíclico.

Factor nuclear (NF-KB): proteína encargada de regular la transcripción de distintos genes.

Terapia de lectura: consiste en el tratamiento de enfermedades genéticas mediante la introducción de "ADN terapéutico" en el material genético de las células del paciente.

Oligonucleótidos anti sentido: son fragmentos cortos de ácido nucleico que se unen a un ARN mensajero e impiden que éste sea traducido en la proteína correspondiente.

Exón: secuencia de ADN presente en el ARN mensajero maduro.

CRISPR: el CRISPR es una región del ADN de algunas bacterias que actúa como un mecanismo inmunitario frente a los virus.

Virus adenoasociados: son virus de ADN monocatenarios sin envoltura que se reproducen solo en presencia de un virus auxiliar.

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL
REPOSITORIO INSTITUCIONAL**

Gabriel Nicolas Mora Serrano portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **1400740567**. En calidad de autor/a y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación “**TERAPIA GÉNICA COMO TRATAMIENTO PARA LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE**” de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de éste trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 21 de agosto de 2023



F:

Gabriel Nicolas Mora Serrano
C.I. 1400740567