



FACULTAD DE FARMACIA

GRADO EN FARMACIA

Revisión bibliográfica del tratamiento con terapia génica de la distrofia muscular de Duchenne

Memoria de Trabajo de Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

2022

Autor: Tomás Serrano López

Modalidad: Revisión bibliográfica

Tutores: Antonio Martínez Laborda y Encarnación Rodríguez Cazorla

Índice

1. Abstract.....	3
2. Introducción.....	4
2.1. Distrofia Muscular de Duchenne.....	4
2.2. Distrofina	5
2.2.1. Distrofina y sus dominios.....	6
2.2.2. Complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC).....	7
2.3. Planteamiento de la estrategia para la terapia génica con micro-distrofina	10
2.4. Otras estrategias de terapia génica para el tratamiento de DMD.....	13
2.4.1. Salto de exón.....	13
2.4.2. CRISPR.....	15
2.4.3. Terapia de aumento de expresión de utrofina.....	16
2.4.4. Salto de lectura de codón stop.....	17
2.5.5. Métodos de evaluación de la función muscular en DMD.....	18
3. Objetivos.....	19
4. Metodología y materiales.....	19
5. Resultados y discusión.....	20
5.1. Modelos animales.....	21
5.2. Ensayos clínicos en humanos.....	
5.2.1. Diseño de los transgenes empleados en los ensayos clínicos con humanos.....	23
5.2.2. Solid Biosciences.....	25
5.2.3. Pfizer.....	27
5.2.4. Sarepta Therapeutics.....	29
6. Conclusiones.....	33
7. Bibliografía.....	34

Abstract:

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad genética que cursa con herencia recesiva ligada al sexo, causada por mutaciones nulas del gen de la proteína de músculo distrofina. Esta enfermedad causa la muerte alrededor de los 30 años de vida por insuficiencia cardíaca o respiratoria debido al deterioro muscular muy grave. Para hacerle frente, una de las líneas de investigación es el diseño de una terapia génica para introducir en los pacientes un transgén micro-distrofina que provea la función esencial de la proteína, ya que actualmente no es posible introducir eficazmente el ADN complementario (cDNA) completo de la distrofina de manera efectiva en un tratamiento de terapia génica *in vivo* con un vector basado en virus adenoasociados (AAV).

Durante las dos últimas décadas, se ha hecho un avance considerable en la investigación de esta estrategia de tratamiento, habiendo llevado ya a cabo ensayos clínicos en pacientes de DMD, con la consiguiente mejora de su función muscular.



2. Introducción:

2. 1. Distrofia muscular de Duchenne

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad genética recesiva ligada al sexo, por lo que afecta fundamental a varones, con una prevalencia de 1 de cada 3500-5000 varones. Se produce por mutaciones nulas en el gen que codifica la proteína de músculo distrofina, caracterizándose por la falta de función de la proteína. Las mutaciones que causan DMD suelen ser deleciones del gen o el cambio de una base por otra, produciéndose un codón sin sentido (de stop de la traducción), y en algunos casos, duplicaciones de exones. Independientemente de su causa, las mutaciones que provocan DMD dan como resultado una proteína truncada por la presencia de un codón stop prematuro o la alteración de la pauta de lectura de codones del gen, lo que durante el proceso de traducción dará lugar a una secuencia de proteína sin relación con la distrofina. En ambos casos, las proteínas producidas son rápidamente degradadas por el organismo.

El diagnóstico de DMD suele ocurrir a los 4 años de media, cuando los síntomas empiezan a manifestarse más claramente. Los síntomas más habituales son caídas frecuentes, dificultad para levantarse, correr, saltar, dolor muscular, retraso del crecimiento y pantorrillas hipertrofiadas.^(1,2)

El tratamiento de la DMD actualmente se centra en la terapia con glucocorticoides, ya sea con prednisona o deflazacort,⁽³⁾ para ralentizar el deterioro muscular, disminuyendo la apoptosis de células musculares, tratamiento con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y betabloqueantes para prevenir las cardiomiopatías, además de monitorización constante, fisioterapia y artículos médicos de ortopedia para prevenir contracciones y enfermedades derivadas de la DMD.⁽⁴⁾

Los pacientes de DMD necesitan ayudarse de andadores para poder andar desde muy jóvenes. A los 13 años, el 95% de los pacientes dependen de una silla de ruedas.⁽⁵⁾ Los individuos que padecen DMD tienen una esperanza de vida de alrededor de 30 años, contando que estén siendo tratados de la manera anteriormente descrita. La causa de muerte siendo habitualmente insuficiencia

cardíaca o respiratoria. ^(6,7) Los individuos que sufren DMD comúnmente presentan defectos de conducción, arritmias tanto ventriculares como supraventriculares, hipertrofia ventricular, fibrosis del ventrículo izquierdo y necrosis cardíaca. ⁽⁶⁾ Por otro lado, aunque las muertes por insuficiencia respiratoria ahora son menos frecuentes gracias a la respiración asistida, siguen ocurriendo debido a infecciones que empeoran la precaria capacidad respiratoria de los pacientes de DMD. ⁽⁷⁾ Sin el tratamiento que reciben actualmente, los pacientes de DMD fallecen a una edad promedio de 19 años. ⁽⁸⁾

2.2. Distrofina

La distrofina es una proteína estructural que se halla unida al sarcolema, la membrana citoplasmática de las células musculares, proporcionándole soporte estructural, al organizar y estabilizar el complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC), al cual pertenece, siendo esencial para mantener la integridad del sarcolema y la protección que éste aporta cuando el músculo realiza una contracción. ⁽⁹⁾

La presencia de distrofina está enriquecida en los costámeros, complejos proteicos que unen el sarcolema con el sarcómero, el cual es la unidad funcional básica de la fibra y se compone de filamentos que realizan la contracción y relajación del músculo.

El DAPC, a grandes rasgos, proporciona un vínculo estructural entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de las células musculares, además de otras funciones reguladoras del tejido muscular, y su ausencia deriva en que el tejido muscular se vaya dañando, con la consiguiente sustitución del músculo dañado por tejido conectivo y adiposo, por lo que se va perdiendo la función muscular progresivamente.

2.2.1 Distrofina y sus dominios:

La distrofina tiene cuatro dominios (Figura 1):

-Un dominio amino-terminal conocido como ABD1, compuesto por dos dominios homólogos de calponina, unido a microfilamentos de actina. La calponina es una proteína de unión a Ca^{2+} , y su unión a microfilamentos de actina aumenta la flexibilidad de éstos. ⁽¹⁰⁾ La actina es una proteína que actúa como un componente mecánico en casi todas las células eucariotas, y es esencial en la adhesión de las células, su motilidad, y la determinación de su forma y rigidez. ABD1 también se une a la citoqueratina 19, una proteína filamentosa intermedia. Este dominio es de gran importancia para la función de la distrofina, y como veremos más adelante, va a estar presente en todas las formas de micro-distrofina desarrolladas. ⁽¹¹⁾

-El dominio central en barra, compuesto por 24 repeticiones de espectrininas, que son secuencias de aminoácidos enrolladas en triples hélices alfa, formando barras de 5 nm. La sección formada por las repeticiones 11-17 también se une a la actina, y la sección que abarca las repeticiones 20-23 interacciona con los microtúbulos. Esta asociación es necesaria para la correcta organización de éstos en las células musculares. La falta de organización de los microtúbulos en ratones se ha asociado a un empeoramiento de la distrofia.

Aparte de las 24 repeticiones de espectrina, hay 4 regiones bisagra que le aportan elasticidad a la distrofina. La primera región bisagra une el dominio amino-terminal con el dominio central en barra, y la última región bisagra une el dominio central en barra con el dominio rico en cisteína, que es el sitio de unión con la proteína β -dístroglicano. ⁽¹¹⁾

-El dominio rico en cisteína contiene un sub-dominio que consiste en un dedo de zinc, un dominio que cambia de conformación en presencia de calcio para enlazarse con la calmodulina, lo cual puede tener que ver en su regulación. ^(11, 12). El dominio rico en cisteína también se une a ankirina B, una proteína

señalizadora necesaria para que la distrofina se sitúe y mantenga en el sarcolema. Este dominio también está presente en todas las micro-distrofinas diseñadas, por su vital importancia al ser el sitio de unión de β -dístroglicano.

-El dominio carboxil-terminal, compuesto por dos polipéptidos enrollados similares a las repeticiones de espectrin del dominio en barra. Este dominio provee el sitio de unión de las distrobrevinas y sintrofinas. A pesar de esto, las micro-distrofinas, por lo general, van a carecer de este dominio.

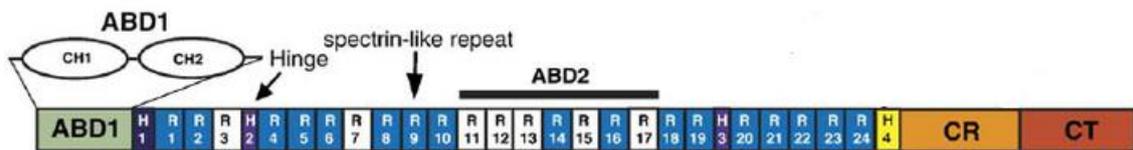


Figura 1

Las regiones de la distrofina. En la izquierda, se observa el extremo N-terminal (ABD1) y sus dos subdominios homólogos de calponina (CH1 y CH2). En la zona central, están las repeticiones de espectrin (R) y las regiones bisagra (H). A la derecha, están la región rica en cisteína y el extremo C-terminal.

2.2.2. Complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC)

El DAPC está a su vez compuesto por complejos menores entre sus proteínas.

Complejo dístroglicano: Está formado por las proteínas α -dístroglicano y β -dístroglicano, generadas de un mismo ARNm y están unidas entre sí. La función de α -dístroglicano es unirse a la laminina, una glucoproteína que está enlazada a la matriz extracelular. β -dístroglicano tiene como función servir de enlace de α -dístroglicano con la distrofina.

La ausencia de α -dístroglicano está asociada a distrofias similares a DMD, aunque rara vez se dan por su cuenta, ya que un individuo con un gen mutado que no da lugar a α -dístroglicano es letal para el embrión.

Sarcospan y sarcoglicanos: Sarcospan es una proteína con varias funciones, una de ellas es formar un sub-complejo con los sarcoglicanos, que son 4 proteínas transmembrana, α , β , γ y δ -sarcoglicano. El sub-complejo sarcospan-sarcoglicanos refuerza la unión entre α y β -dístroglicano. Se ha demostrado que la falta de un sarcoglicano produce la ausencia del resto del sub-complejo sarcospan-sarcoglicanos, produciéndose distrofia muscular del anillo óseo, también conocida como distrofia muscular de cinturas.

El sarcospan también está relacionado con la vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-quinasa. La activación de esta vía da lugar a un aumento de la producción de proteínas necesarias para la regeneración del músculo, así como al aumento de producción de la utrofina, una proteína parecida a la distrofina que cubre una función similar durante el periodo embrionario y en músculos dañados. El sarcospan participa en la activación de esta vía, así que está involucrado en la regeneración de los músculos dañados. ⁽¹³⁾

Dístrobrevina, sintrofinas y óxido nítrico neuronal:

La dístrobrevina y las sintrofinas son proteínas unidas al extremo C-terminal de la distrofina mediante su propio extremo C-terminal. Aquí la distrofina actúa como la conexión entre ambas proteínas y el sarcolema. Se ha visto que la dístrobrevina se asocia por su extremo N-terminal a los sarcoglicanos, con la función de apoyar la estabilidad del complejo DAPC. ^(11, 14)

Por otro lado, la dístrobrevina y las sintrofinas están asociadas para fijar el óxido nítrico al sarcolema. Las sintrofinas están involucradas en la señalización de la calmodulina, el óxido nítrico, la cinasa-3 activada por estrés y la proteína 2 asociada a receptor del factor de crecimiento. Sin embargo, la ausencia de las sintrofinas no produce ningún fenotipo distrófico. La ausencia de dístrobrevina produce un fenotipo distrófico en músculo esquelético y cardíaco. ⁽¹¹⁾

La función del óxido nítrico en el DAPC es la de señalizar a los vasos sanguíneos para que se dilaten y proporcionen suficiente oxígeno y nutrición a las células musculares.

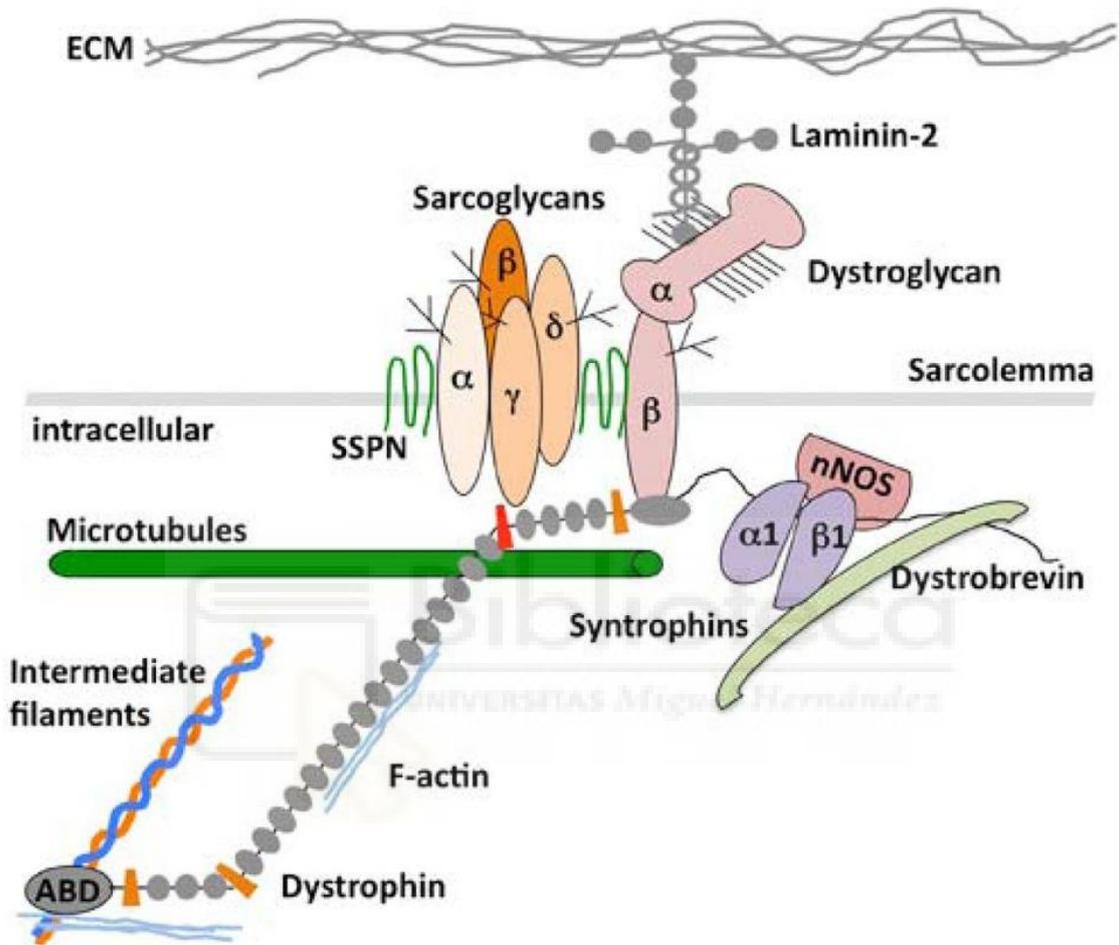


Figura 2

El complejo de proteínas asociadas a distrofina. Se puede observar que la distrofina sirve de enlace entre el citoesqueleto de actina de las células musculares a través de su extremo N-terminal, y la matriz extracelular mediante el subdominio de los distroglicanos.

2.3. Planteamiento de la estrategia para la terapia génica con micro-distrofina

Actualmente no existen tratamientos eficaces para los pacientes de DMD, que es por lo que se ha recurrido a buscar terapias innovadoras, como las terapias génicas, para solucionar el problema de raíz.

El gen de la distrofina es el gen humano conocido de mayor tamaño, aproximadamente 2200 kilobases, de las cuales los exones, es decir, las regiones que se mantienen en el ARNm maduro, ⁽¹⁵⁾ suponen 14 kilobases (kb). Actualmente, no es posible almacenar el ADN complementario (cDNA) de la distrofina, es decir, ADN solo compuesto por los exones del gen, en un vector eficaz como son los virus adeno-asociados (AAV) que se están usando. ⁽²²⁾

Idealmente, una terapia de aumento génico aspira a introducir mediante un vector la secuencia completa de cDNA del gen de la distrofina, y lograr la expresión en las células musculares del individuo. Esto en un futuro puede que cambie, pero actualmente no tenemos vectores para empaquetar e introducir un transgén de una secuencia tan larga *in vivo* en las células musculares.

La terapia génica en la que se centra esta revisión es lo que se conoce como una terapia de aumento génico, que consiste en la introducción de un transgén en el paciente para solventar un déficit en la función del gen. Al ser imposible el empaquetamiento en los vectores de la secuencia completa del cDNA de la distrofina, se pretende conseguir la expresión de una proteína similar, pero de menor tamaño (micro-distrofina), de manera que cubra las funciones esenciales que desempeña la distrofina normal.

El motivo por el cual se llegó a plantear la estrategia de lograr la expresión de una forma acortada de distrofina surge de las observaciones realizadas de otra distrofia muscular ligada a una mutación en el gen de la distrofina, llamada

distrofia muscular de Becker (BMD). Lo que ocurre en BMD es que los individuos tienen mutaciones en el gen que expresa la distrofina, pero las mutaciones no alteran la pauta de lectura de los codones ni dan lugar a codones stop prematuros, a diferencia de lo que sucede en DMD.

Existen sujetos con BMD con grandes deleciones, pero el marco de lectura se mantiene, y la deleción se produce en la sección central en barra, que es en su mayoría no esencial, eliminándose únicamente repeticiones de espectrinas (Figura 3). La sección central en barra codifica para lo que es esencialmente un polímero, así que los pacientes de BMD expresan una forma acortada de la distrofina, la cual retiene gran parte de la función de la proteína. ⁽²³⁾

En BMD, ocurre una pérdida parcial de la función de la distrofina y es una enfermedad que cursa de manera más benigna que DMD, conociéndose el caso de un paciente de BMD que tenía capacidad ambulatoria asistida por andador a los 61 años de edad con una deleción del 46% de los exones de la distrofina. (Figura 3). ⁽²³⁾

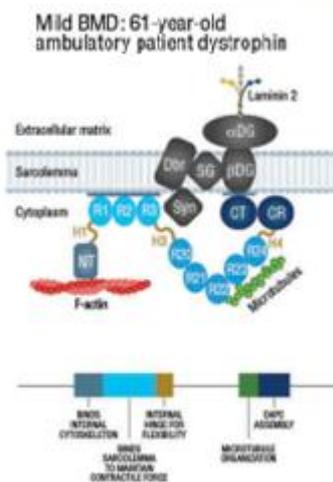


Figura 3. La proteína tipo distrofina de un paciente de BMD ambulatorio a los 61 años. Nótese que el dominio central en barra apenas tiene 8 repeticiones de espectrina y 3 de las 4 regiones bisagra.

Con esta información, se llegó a la conclusión de que se podría inducir la transducción de una versión acortada de la distrofina, una micro-distrofina, con una cantidad reducida de repeticiones de espectrinas de la sección central en barra, para restaurar parcialmente la función que realiza la proteína en pacientes de DMD, de forma similar a como ocurre en BMD.

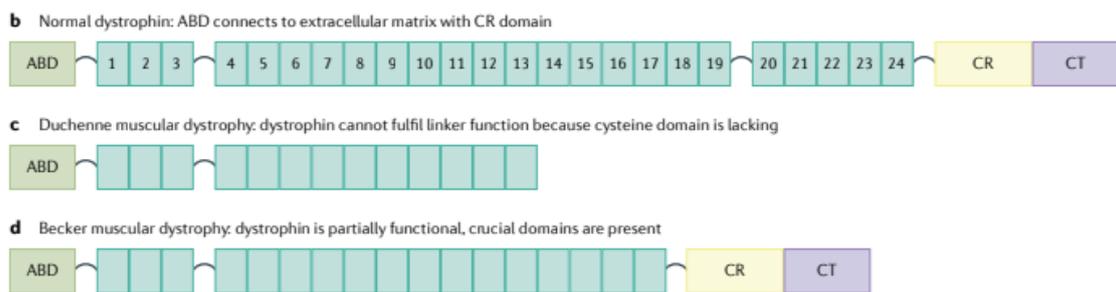


Figura 4

b. La proteína de la distrofina normal con sus cuatro dominios.

c. Una proteína generada por el gen mutado de distrofina, en un caso de DMD por codón stop prematuro. El codón stop prematuro impide que llegue a generarse el dominio rico en cisteína, lo que impide que se produzca una distrofina capaz de conectar el sarcómero y la matriz extracelular.

d. Una proteína tipo distrofina en un caso de BMD por delección. La molécula ha perdido repeticiones de espectrina respecto a la proteína normal, pero conserva los dominios necesarios para tener una función parcial.

Respecto a los tipos de terapia génica, existe la terapia *in vivo* y *ex vivo*. La terapia *in vivo* consiste en administrar el vehículo directamente en el organismo del paciente y que este llegue a las células diana. ¿Por qué se utiliza la terapia

in vivo en estos ensayos? La terapia *ex vivo* se basa en extraer células madre del tejido, introducir el gen deseado mediante un vector y reimplantarlas para que gradualmente el órgano se sustituya con células que tengan integrado el gen que se quiere expresar. Sin embargo, el músculo tiene una tasa de reemplazo anual de menos del 1%, así que apenas afectaría a una mínima proporción del total de las células musculares del individuo. Por eso, se prefiere realizar la terapia *in vivo* y lograr que un número significativo de células musculares expresen el transgén de la micro-distrofina.

Respecto al vehículo a utilizar para que el ADN llegue a las células diana, se utiliza un vector AAV recombinante, en el que se puede introducir una cadena de ADN de hasta 4.7-4.9 kilobases (kb). ⁽²⁴⁾ Normalmente, se utilizan los serotipos 5, 9 y rh.74 (14) con el gen de micro-distrofina en su interior preparado para que pueda haber transcripción dentro de las células diana.

2.4. Otras estrategias de terapia génica para el tratamiento de DMD

En el ámbito de la terapia génica, aparte de la estrategia que consiste en lograr expresión de micro-distrofina, existen otras estrategias para tratar DMD:

2.4.1. Salto de exón

La principal diferencia en cuanto a BMD causada por delección y DMD causada por delección, es que en BMD no se altera el marco de lectura de codones, pero en DMD sí. Esto se debe a que un codón puede hallarse localizado en dos exones consecutivos, una parte en el extremo 3' de un exón y la otra parte en el extremo 5' del siguiente exón. Por tanto, si una mutación elimina uno de esos dos exones, se altera el marco de lectura.

Un exón es una región de un gen que no se escinde durante el proceso de corte y empalme para formar el ARNm, ⁽¹⁵⁾ y un intrón es una sección no codificante de un gen, que se escinde y elimina durante la formación del ARNm maduro. ⁽¹⁶⁾

La estrategia de salto de exón consiste en emplear un oligonucleótido antisentido para provocar que un determinado exón se escinda como si fuese un intrón. La

comparten un codón. Esto significa que la delección de uno de los exones supondrá una alteración del marco de lectura.

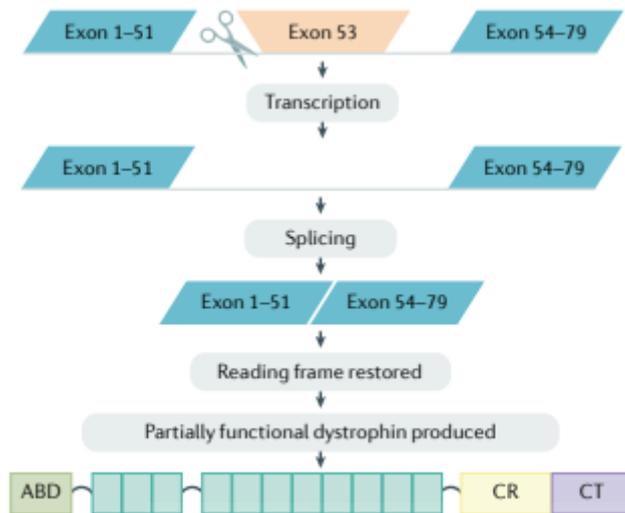


Figura 6

Esquema del salto del exón 53. La delección del exón 52 ha alterado el marco de lectura del gen de la distrofina. El corte del exón 53 permite la producción de un ARNm con una secuencia de lectura coherente.

2.4.2. CRISPR

Se está desarrollando terapia génica basada en edición de genes mediante CRISPR, pero por ahora solo se ha probado en ensayos clínicos con animales, con un éxito muy reducido, considerablemente menor al que se ha logrado hasta la fecha con los genes micro-distrofina. ⁽²⁰⁾ La terapia con CRISPR podría lograr una reparación permanente de la mutación que pueda sufrir un individuo a través de la edición de sus genes. La terapia es prometedora, pero todavía le falta mucho desarrollo, no solo en el ámbito del éxito que tenga editando los genes y logrando una expresión significativa de distrofina, sino también en el ámbito de la seguridad en el tratamiento. ⁽²¹⁾

2.4.3. Terapia de aumento de expresión de utrofina

La utrofina es una proteína en gran parte similar a la distrofina (Figura 7). Comparte el 80% de su secuencia genética, y se manifiesta con un complejo de proteínas asociado similar. Sin embargo, carece de las repeticiones de espectrinas 15 a 19, es incapaz de reclutar óxido nítrico y no tiene interacción directa con los microtúbulos. Basándose en pacientes de BMD que tampoco pueden reclutar óxido nítrico directamente con sus formas de distrofina, se sospecha que hay un mecanismo compensatorio para ello.

La utrofina se expresa durante el desarrollo temprano de los músculos y gradualmente es reemplazada por distrofina. También se expresa en la edad adulta, su forma A en la unión neuromuscular y su forma B en las células endoteliales. Esta forma A se expresa durante lesiones musculares en miofibras regeneradas, y en DMD la expresión de utrofina también se encuentra aumentada. Un aumento de la presencia de utrofina en pacientes de DMD retrasa la pérdida de la función muscular, y grandes aumentos en la expresión de utrofina han conseguido impedir el fenotipo distrófico en ratones.

Por ahora, en humanos solo ha habido un estudio del que se tengan datos, un estudio de fase I, con individuos sanos adultos, para determinar la seguridad de SMT C1100, un fármaco oral que aumenta la expresión de utrofina.

En el enfoque de conseguir un tratamiento eficaz, independientemente de la mutación que provoque DMD en un individuo, esta estrategia es prometedora, pero actualmente se encuentra en una fase muy temprana de su desarrollo.

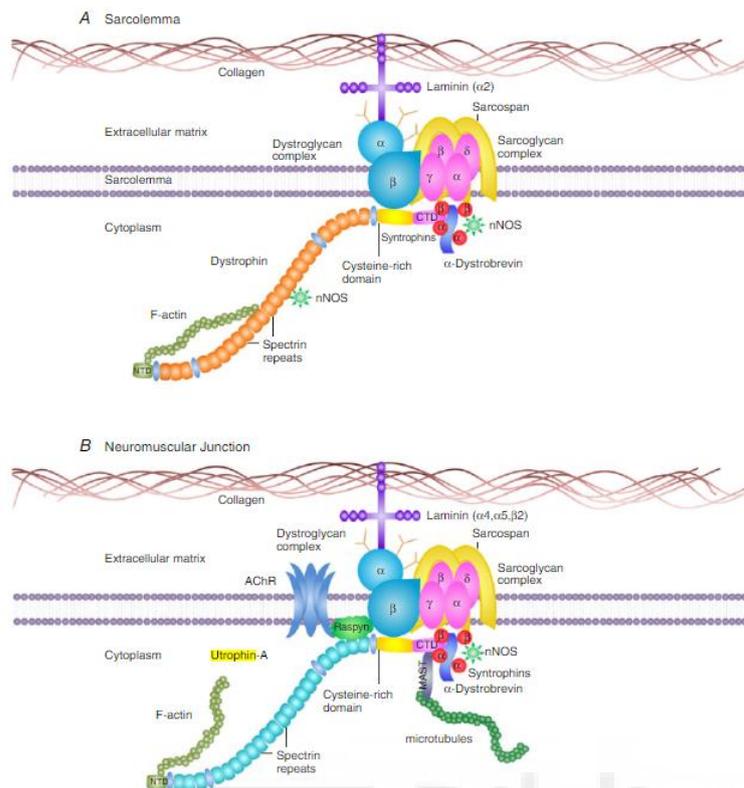


Figura 7

A. Complejo de proteínas asociadas a distrofina. **B.** Complejo de proteínas asociadas a utrofina en la unión neuromuscular. Una diferencia de la utrofina es que se une a raspyrin, una proteína citoplasmática que actúa como unión con receptores de acetilcolina.

2.4.4. Salto de lectura de codón stop

Una de las causas de DMD son mutaciones de cambio de base que generan un codón stop, por lo que el ribosoma termina la formación de la distrofina prematuramente y no se forma una proteína completa.

A grandes rasgos, esta estrategia consiste en impedir que el ribosoma lea el codón stop prematuro (Figura 8). Se ha intentado realizar usando gentamicina, aunque esta presentaba mucha toxicidad a las dosis necesarias. También, basado en esta estrategia, está en ensayos clínicos un fármaco llamado Ataluren. (4, 26)

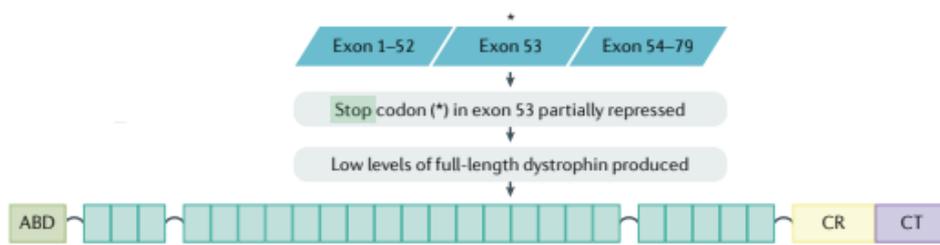


Figura 8

El desbloqueo de la lectura del codón stop prematuro da lugar a la producción de distrofina.

2.5. Métodos de evaluación de la función muscular en DMD

Para valorar la eficacia del tratamiento con micro-distrofina, se realiza la Evaluación Ambulatoria NorthStar (NSAA) antes y después de que se aplique el tratamiento para observar la mejoría de la función motora. ^(27,28) El NSAA consiste en una serie de 17 pruebas, con una puntuación total de 0 a 34. Cuanto más alto el valor, más próximo se está a la función motora que se espera de un individuo sano.

Además de la NSAA, Solid Biosciences también ha incluido como manera de medir la mejoría en sus pacientes la prueba de la caminata de 6 minutos, una prueba en la que el paciente debe caminar todo lo posible durante 6 minutos. Esta prueba se utiliza en pacientes con insuficiencia cardíaca y/o respiratoria para medir su mejoría o empeoramiento.

3. Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es establecer la viabilidad y eficacia de la terapia de aumento génico, utilizando la expresión de micro-distrofina en el músculo como terapia para DMD, mediante la bibliografía disponible.

Como objetivos secundarios, juzgar bajo un punto de vista crítico las fuentes consultadas, familiarizarse con la terminología específica relacionada con la terapia génica, y observar metodologías que puedan contribuir a la eficacia del tratamiento en un futuro.

4. Metodología y materiales:

El trabajo consiste en una revisión bibliográfica, con el propósito de extraer datos novedosos sobre la terapia génica con micro-distrofina en pacientes de DMD, así como la eficacia y seguridad del tratamiento en humanos.

Para esto, se ha buscado en MedLine vía PubMed realizando la siguiente búsqueda: ((“micro-dystrophin”) OR (“microdystrophin”) OR (“ μ dystrophin”) OR (“ μ dys”)) AND (“muscular dystrophy, Duchenne”[Mesh]).

Además de esto, se ha tomado información de artículos científicos y otras fuentes de información como comunicados de prensa, aportados por el tutor Antonio Martinez Laborda.

También se han incluido artículos presentes en la bibliografía de algunos de los artículos incluidos en la búsqueda.

De los artículos obtenidos en la búsqueda, se excluyeron aquellos cuyo texto completo no pudo ser accedido por el autor, así como aquellos que no estaban relacionados con el uso de micro-distrofina en DMD.

5. Resultados y discusión:

5. 1. Modelos animales

Gran parte de la investigación que se ha hecho con micro-distrofina hasta la fecha se ha llevado a cabo principalmente en modelos animales de distrofia inducida por knockdown del gen de la distrofina en ratones, o perros con mutaciones espontáneas, habitualmente la distrofia muscular del golden retriever. Existen pocos ensayos con humanos hasta la fecha.

Los ensayos con animales han servido para descubrir los efectos que causa la micro-distrofina en animales con distrofia muscular, demostrar la eficacia de los tratamientos con micro-distrofina, así como estudios de tolerancia y de biomarcadores de la enfermedad.

Tanto en ratones como en perros se ha demostrado que los tratamientos con micro-distrofina logran alcanzar las fibras musculares de manera eficaz y mejorar la situación de los músculos tratados. ^(29, 30)

Un dato importante sobre el modelo de ratón es que la tolerancia y la eficacia de los tratamientos es mayor de lo esperado en humanos. En general, manifiestan menos efectos adversos debidos al tratamiento, y la distrofia muscular les afecta menos que a los humanos. La menor gravedad de su enfermedad provoca que el tratamiento sea más eficaz. Además, el aumento de la regulación de la utrofina que ocurre debido a la distrofia muscular compensa en mayor medida los efectos negativos de su carencia de distrofina.

Por lo tanto, aunque los modelos en ratones han mostrado una gran utilidad en la investigación en DMD, no es un modelo muy similar a humanos en términos de valorar tolerancia y efectividad de los tratamientos con micro-distrofina. ⁽³¹⁾

En contraste, el modelo canino de la enfermedad comparte mayor similitud con DMD que el modelo en ratones, ya que la severidad de la distrofia muscular de los golden retriever es más parecida a la DMD humana, por lo que es un mejor modelo para utilizar en ensayos pre-clínicos centrados en evaluar la eficacia de una terapia con micro-distrofina. ⁽³²⁾

En individuos con DMD, a pesar de que sus genes para el complejo de proteínas asociado a distrofina (DAPC) son funcionales, las proteínas del DAPC no se expresan en ausencia de distrofina, de manera que la distrofina es necesaria para que puedan expresarse. En presencia de micro-distrofina, se recupera al menos parte del DAPC, a excepción de las proteínas asociadas al dominio C-terminal (Disbrevina, sintrofinas), que no se incluye en las terapias con micro-distrofina. ⁽³³⁾ Por otro lado, las DAPC tienen una expresión menor en cardiomiocitos. ⁽¹⁰⁾ Aunque todas las proteínas del DAPC son importantes, como se ha expuesto con anterioridad, lo más importante de la distrofina, y lo que se pretende principalmente a la hora de diseñar una micro-distrofina, es que actúe como una unión entre las fibras de actina y el sarcómero a través de su dominio N-terminal, y la matriz extracelular a través de su dominio rico en cisteína.

Respecto a los modelos animales de distrofia en ratones, utilizando como terapia una micro-distrofina que incluye el dominio C-terminal, se reestableció la expresión de las DAPC asociadas al dominio C-terminal, aunque esto no supuso una mejoría respecto de los otros modelos de micro-distrofina. ⁽³⁴⁾ Esto es razonable, ya que no parece que este grupo de proteínas tenga una función esencial, puesto que el óxido nítrico tiene un mecanismo compensatorio de obtención y fijación.

Aunque la micro-distrofina logra la expresión de las DAPC, a diferencia de la distrofina, no consigue la expresión en cardiomiocitos de las proteínas cavininas 1-4. Las proteínas cavininas, en especial la 1 y la 4, han sido asociadas a señalización cardioprotectora mediante receptores α_1 para fosforilar proteínas cinasa. Esta fosforilación ocurre, como protección, cuando el corazón es sometido a estrés. Con lo cual, la micro-distrofina no logra este tipo de efecto cardioprotector, cuya carencia está asociada a cardiomiopatías en DMD. ⁽³⁵⁾

Este hallazgo debería tenerse en cuenta en futuras investigaciones, con el objetivo de hallar una estructura de micro-distrofina que logre la expresión de cavininas en músculo cardíaco, ya que ésta es la principal causa de muerte en

pacientes de DMD, además de afectar también con frecuencia a los pacientes de BMD.

Respecto a los modelos caninos de DMD, se ha observado que la administración de un tratamiento con micro-distrofina junto a células madre mesenquimales (MSC) mejora la eficacia del tratamiento, debido a que las MSC producen un efecto inmunosupresor, que disminuye la respuesta inmune del organismo provocada por la micro-distrofina. ^(36, 37)

El tratamiento complementario con MSC para inducir inmunosupresión todavía está en una fase temprana, pero podría suponer una mejora considerable del tratamiento con micro-distrofina. No obstante, queda por determinar la seguridad de este tratamiento.

También se ha descubierto que la miostatina, un factor de crecimiento que limita el crecimiento del tejido muscular, tiene reducida su regulación en DMD y en la distrofia muscular del Golden Retriever.

5.2. Ensayos clínicos en humanos

Hay que mencionar que, en los ensayos clínicos de fase I en terapia génica, los voluntarios no son individuos sanos como en el desarrollo de muchos fármacos, sino que deben ser pacientes de la enfermedad que pretende tratar la terapia génica. Esto se debe a que no es ético administrar un vector apto para terapia génica a un individuo sano, ya que desarrollará anticuerpos frente a éste, lo que reducirá sus posibilidades de recibir un tratamiento de terapia génica utilizando ese vector en el futuro, en el caso de que lo fuese a necesitar.

Estos ensayos, han tenido por ahora como principal objetivo establecer un perfil de seguridad, con el objetivo secundario de determinar la mejoría de los pacientes. Los pacientes aptos para estos ensayos son pacientes de DMD que todavía conservan capacidad ambulatoria, que carecen de alguna lesión ajena que pueda afectar a las pruebas, y que no tienen anticuerpos contra el vector. ^(28, 38) La siguiente información es de ensayos que están terminados o en curso, de los cuales las respectivas compañías han aportado datos.

La información aportada hasta ahora por Pfizer y Solid Biosciences sobre sus ensayos proviene de comunicados de prensa, por lo que puede estar sesgada. Se ha incluido de todos modos en esta revisión, porque apenas hay estudios con micro-distrofina en humanos.

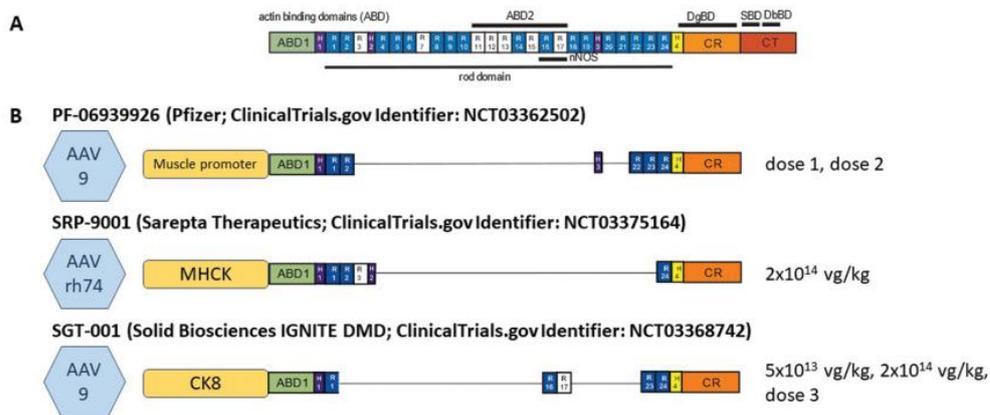


Figura 9

- A. Gen de la distrofina
- B. Vectores, promotores musculares y versión de micro-distrofina que están siendo empleadas en los ensayos clínicos de Pfizer, Sarepta Therapeutics y Solid Biosciences

5.2.1 Diseño de los transgenes empleados en los ensayos clínicos con humanos

Vectores: AAV9 y AAVrh.74 son variantes de AAV que tienen como órgano diana los músculos. En concreto, AAVrh.74 tiene una mayor afinidad por el músculo cardíaco, aunque su afinidad por el músculo esquelético es similar a la de AAV9.

Un motivo por el que Sarepta usa AAVrh.74 puede ser que el porcentaje de la población con distrofias musculares que presenta anticuerpos ante esta variante es menor que el de otros AAV, al menos según su escrutinio. ⁽³⁹⁾

Promotores musculares: La base de los promotores añadidos al transgén es el promotor del gen de la creatinquinasa muscular (MCK). Las regiones clave son un potenciador específico del músculo (206 pares de bases) y un promotor

proximal (358 pares de bases). Con estas dos regiones, se crea el promotor CK6, que dirige una expresión relativamente baja comparado con el promotor del citomegalovirus, que en efectividad consigue buenos resultados, pero tiene un tamaño demasiado grande.

MHCK7 es un promotor quimérico, es decir, con ADN de más de una especie, del cual se han eliminado ciertas secciones poco conservadas del potenciador original. A MHCK7 se le han añadido 50 pares de bases altamente conservadas en varias especies del exón no codificante del gen de MCK, así como el potenciador de la cadena pesada de α -miosina de ratón, que es su cambio más importante. Con esto se consigue una expresión del transgén similar a la del promotor del citomegalovirus.

Por otro lado, CK8 es una versión de MHCK7 con 2 copias del potenciador del gen de MCK, en vez de tener una copia del potenciador del gen de MCK y el potenciador de la cadena pesada de α -miosina. Con posterioridad, se vio que añadir otro potenciador del gen de MCK cuadruplica y triplica la expresión en músculo esquelético y cardíaco, respectivamente, con lo que se creó CK8e, que contiene 3 copias del potenciador, y tiene delecciones de secciones poco conservadas del potenciador y el promotor proximal para reducir su tamaño. Este promotor tiene mayor eficacia que el promotor del citomegalovirus en células cardíacas *in vitro*.⁽⁴⁰⁾

Regiones del gen de la micro-distrofina: El dominio N-terminal (ABD1), las regiones bisagra que conectan la sección en barra central con la región N-terminal y con la región rica en cisteína, unas pocas repeticiones de espectrina y el dominio rico en cisteína son las regiones que tienen en común los 3 diseños de micro-distrofina. Esta es la estructura necesaria mínima para que la distrofina esté conectada con la matriz extracelular y el sarcómero (Figura 3).

5. 2. 2. Solid Biosciences

Los siguientes datos pertenecen al ensayo clínico NCT03368742, que comenzó en diciembre de 2017 y sigue en curso. Tiene 7 pacientes reclutados hasta la fecha, de un total de 16 pacientes planeados.

Por parte de los ensayos que ha y está llevando a cabo Solid Biosciences, se está usando un vector AAV9 y se emplea el promotor CK8e. Esta terapia ha recibido el nombre de SGT-001

Solid Biosciences	Cohorte 1	Cohorte 2	Cohorte sin tratar
Edad	Entre 5 y 14 años		
Dosis (genomas vectoriales/kg)	5×10^{13}	2×10^{14}	0
Nº Individuos	3	4	Desconocido
Nº Reacciones adversas severas	0	2	Desconocido
Variación promedia en el NSAA (tras 1 año)	1	0,3	-4
Variación promedia de la prueba de caminata de 6 minutos (metros)	37	49	-8,5

Tabla 1. Resumen de los datos cuantificables del ensayo clínico de Solid Biosciences

El principal objetivo del ensayo es determinar la eficacia y seguridad en un margen de 12 meses. (50)

El estudio es aleatorizado, sin enmascaramiento (open-label), y dividido en dos cohortes, una cohorte con 3 pacientes que han recibido una dosis de SGT-001 de 5×10^{13} genomas vectoriales/kg, y una cohorte con 4 pacientes que han recibido una dosis de SGT-001 de 2×10^{14} genomas vectoriales/kg. (41)

Los individuos de la cohorte de la dosis de 2×10^{14} genomas vectoriales/kg mostraron, en muestras biopsiadas, una distribución amplia de fibras musculares con micro-distrofina, beta-sarcoglicano y óxido nítrico en ellas. Los individuos de esta cohorte también han mostrado una disminución de sus niveles de creatinquinasa, lo que indicaría que han disminuido las lesiones musculares de estos individuos.

Uno de los pacientes perteneciente a la cohorte que recibió la dosis de 2×10^{14} genomas vectoriales/kg sufrió una reacción adversa severa, consistente en una infección gastrointestinal, la cual se cree que no tenía que ver con el tratamiento, además de una disminución transitoria en el recuento de plaquetas, que no se consideró como seria y que sí se atribuyó al tratamiento. ⁽⁴²⁾

Otro de estos pacientes, también perteneciente a la cohorte que recibió la dosis de 2×10^{14} genomas vectoriales/kg, sufrió una reacción adversa severa, que cursó con un recuento bajo de plaquetas y glóbulos rojos, daño renal agudo y empeoramiento de la función cardiopulmonar. ⁽⁴³⁾

Respecto a la NSAA, los pacientes de la cohorte de la dosis de 5×10^{13} genomas vectoriales/kg tuvieron una mejora promedio de 1 punto tras 1 año, y los pacientes de la cohorte de la dosis de 2×10^{14} genomas vectoriales/kg tuvieron una mejora promedio de 0,3 puntos tras 1 año, frente al empeoramiento promedio de 4 puntos tras 1 año de la cohorte sin tratar.

Respecto a la prueba de la caminata de 6 minutos, los pacientes de la cohorte de la dosis de 5×10^{13} genomas vectoriales/kg tuvieron una mejora promedio de 37m recorridos más, y los pacientes de la cohorte de la dosis de 5×10^{13} genomas vectoriales/kg tuvieron una mejora promedio de 49m recorridos más, frente al empeoramiento de 8,5 metros menos de la cohorte sin tratar.

5.2.3. Pfizer

Los siguientes datos pertenecen al ensayo clínico NCT03362502, que comenzó en diciembre de 2017.

Por parte de los ensayos que ha y está llevando a cabo Pfizer, se está usando un vector AAV9 y un promotor de expresión en el músculo del que no han dado información. Esta terapia ha recibido el nombre de PF-06939926

Pfizer	Cohorte 1	Cohorte 2	Cohorte sin tratar
Edad	Entre 6 y 12 años		Desconocido
Dosis (genomas vectoriales/kg)	10 ¹⁴	3x10 ¹⁴	0
Nº Individuos	3	6	Desconocido
Nº Reacciones adversas severas	0	3	Desconocido
Variación promedia en el NSAA (tras 1 año)	3.5	3.5	-4
Concentración de distrofina relativa respecto a la media en individuos sanos pediátricos	24%	51%	Desconocido
Distribución de la expresión de micro-distrofina respecto del total de las fibras musculares (tras 2 meses)	28,50%	48,40%	
Distribución de la expresión de micro-distrofina respecto del total de las fibras musculares (tras 12 meses)	21,20%	50,60%	

Tabla 2. Resumen de los datos cuantificables del ensayo clínico de Pfizer

El principal objetivo del ensayo es determinar a qué dosis deja de ser seguro o tolerable el tratamiento en un margen de un año. Como objetivos secundarios, están la distribución y expresión de micro-distrofina tras 2 y 12 meses; la incidencia, gravedad y causalidad de los efectos adversos ocurridos en un margen de 5 años, y la incidencia y gravedad de los cambios clínicos relevantes en el peso, las constantes vitales, el electrocardiograma, las tendencias suicidas e irregularidades halladas en laboratorio, en un margen de 5 años.

En su ensayo de fase 1b para determinar la seguridad de dos dosis diferentes, participaron 9 varones con capacidad ambulatoria de edades entre 6 y 12 años, 3 de ellos recibieron una dosis de 10^{14} genomas vectoriales por kilogramo, y otros 6 recibieron una dosis de 3×10^{14} genomas vectoriales/kg.

Hubo 3 individuos, todos ellos pertenecientes a la cohorte que recibió la dosis de 3×10^{14} genomas vectoriales/kg, que sufrieron reacciones adversas severas (SAR). Una de las SAR fue deshidratación por vómitos persistentes, y dos de las SAR fueron debidas a activación de la cascada del complemento que requirieron tratamiento con eculizumab, un anticuerpo monoclonal que detiene la cascada del complemento. De los dos pacientes que sufrieron la activación de la cascada del complemento, uno de los pacientes tuvo lesiones renales con síndrome urémico hemolítico atípico, que requirió diálisis, y el otro paciente tuvo trombocitopenia y síndrome urémico hemolítico atípico, que requirió transfusión de plaquetas.

El síndrome urémico hemolítico atípico es una anemia hemolítica que afecta al riñón. Se trata de una enfermedad con una incidencia de 2 casos por millón de habitantes, y se asocia a diversas mutaciones que causan la desregulación de la vía alternativa del complemento. ⁽⁴⁴⁾

Este estudio analizó la concentración de distrofina mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, comparada con un valor promedio de 60 muestras pediátricas de individuos sanos, además de medir en qué porcentaje de los músculos se detectaba micro-distrofina mediante una técnica de inmunofluorescencia no especificada.

De los voluntarios tratados con la dosis de 10^{14} genomas vectoriales/kg, se obtuvo un 24% de concentración relativa de distrofina respecto al valor promedio de los individuos sanos, una distribución en el 28,5% de las fibras musculares a los 2 meses, y 21,2% a los 12 meses.

De los voluntarios tratados con la dosis de 3×10^{14} genomas vectoriales/kg, se obtuvo un 51% de concentración relativa de distrofina respecto al valor promedio de los individuos sanos, una distribución en el 48,4% de las fibras a los 2 meses,

y 50,6% a los 12 meses de los 3 pacientes de este grupo a los que se pudo analizar.

El NSAA de los 6 voluntarios que se pudieron estudiar tras 1 año de la administración del tratamiento, 3 de la cohorte de 3×10^{14} genomas vectoriales/kg y 3 de la cohorte de 10^{14} genomas vectoriales/kg, mejoraron un promedio de 3,5 puntos en NSAA

También se observó una reducción en la fracción grasa de los muslos en los individuos de la cohorte de la dosis de 3×10^{14} genomas vectoriales/kg, pero no en la cohorte de la dosis de 10^{14} genomas vectoriales/kg. ⁽⁴⁵⁾

Pfizer está llevando a cabo actualmente un ensayo de fase III llamado CFFREO que busca tener un total de 99 participantes. Uno de los participantes falleció en diciembre de 2021, lo que supuso una interrupción del ensayo, aunque aparentemente se debió a que el paciente ya tenía una función cardíaca muy deteriorada. El estudio planea continuar en junio de 2022. ⁽⁴⁶⁾

5.2.4. Sarepta Therapeutics

Por parte de los ensayos que ha llevado a cabo Sarepta, se está utilizando un vector rAAVrh74.MHCK7 (un vector AAVrh.74 recombinante con el promotor MHCK7), al que ha nombrado SRP-9001. Los siguientes datos pertenecen al ensayo clínico NCT03769116 iniciado en noviembre de 2017.

Sarepta Therapeutics					
					Cohorte 1
Edad					Entre 4 y 7 años, 4.8 años de media
Dosis (genomas vectoriales/kg)					2x10 ¹⁴
Nº Individuos					4
Nº reacciones adversas menores					33
Nº reacciones adversas moderadas					20
Nº Reacciones adversas severas					0
Nº reacciones adversas consideradas relacionadas con el tratamiento					18
Variación promedia en el NSAA (tras 1 año)					5,5
Reducción promedio de colágeno en el tejido muscular respecto del valor basal					26,70%
Concentración relativa media de creatinquinasa respecto a valor basal (tras 1 año)					67,27%
Distribución media de la expresión de micro-distrofina respecto del total de las fibras musculares (tras 12 semanas) (general)					81,50%
Distribución media de la expresión de micro-distrofina respecto del total de las fibras musculares (tras 12 semanas) (sarcolema)					96%

El principal objetivo del ensayo es evaluar los efectos adversos ocurridos a los pacientes en un margen de 5 años. Los objetivos secundarios son determinar la capacidad motora y los niveles de expresión de micro-distrofina tras 12 semanas.

El ensayo clínico es un ensayo sin enmascarar ni aleatorizar, fase 1/2a, con 4 pacientes ambulatorios de DMD sin presencia de anticuerpos para AAVrh.74, medicados con una dosis estable de corticoides por lo menos 12 semanas antes de iniciar el estudio.

Un día antes de iniciar el tratamiento de terapia génica, se administró a los 4 pacientes un tratamiento inmunosupresor con prednisona intravenosa a dosis de 1 mg/kg que se mantuvo durante un mes.

A los 4 pacientes se les administró una dosis de 2x10¹⁴ genomas vectoriales/kg por vía intravenosa.

Respecto a los efectos adversos, ocurrieron 33 efectos adversos menores y 20 moderados, ninguno severo. De estos 53 efectos adversos totales, se consideró que 18 de ellos tenían relación con el tratamiento.

De los 18, 9 fueron vómitos. 3 de los pacientes tuvieron valores elevados transitorios de γ -glutamyl transferasa que se resolvió con corticoides.

Los estudios histológicos demostraron que el tratamiento no supuso alteraciones dañinas en la morfología de los músculos, no hallándose alteraciones dañinas del músculo cardíaco en las resonancias magnéticas.

Se determinó la transferencia del transgén por PCR cuantitativa, inmunofluorescencia y Western blot. La expresión tras 12 semanas se determinó mediante inmunofluorescencia de biopsias del músculo gastrocnemio (coloquialmente, gemelo), observándose un promedio de 81,2% de fibras con micro-distrofina, con un promedio del 96% de los sarcolemas con micro-distrofina.

Los pacientes mejoraron un promedio de 5,5 puntos en el NSAA, se redujo en un promedio de 26,70% la presencia de colágeno en el músculo, y el valor de creatinquinasa se redujo un promedio de 67,27%. ⁽²⁸⁾

Respecto de los ensayos en humanos, dadas las reacciones adversas severas que han ocurrido en el estudio de Pfizer y en el estudio de Solid Biosciences, es probable que sus tratamientos tengan una probabilidad relativamente alta de inducir síndrome urémico hemolítico atípico (frente a los 2 casos cada millón de habitantes), debido a la activación de la cascada del complemento y al hecho de que los individuos afectados probablemente debían tener mutaciones que han conducido a ello. De esto, los investigadores deducen que, dentro de las medidas de seguridad que se toman en los ensayos con micro-distrofina, debería comprobarse si los voluntarios tienen alguna de estas mutaciones que derivan en síndrome urémico hemolítico agudo antes de administrarle el tratamiento.

Respecto a la eficacia del tratamiento, en todos los casos se ha producido una mejora respecto de individuos de DMD sin tratar con micro-distrofina.

Un problema que hay a la hora de juzgar los ensayos es el número reducido de individuos que participan en éstos. Los promedios en los resultados, así como el porcentaje de individuos afectados por efectos adversos y la distribución en el tipo de efectos adversos, dado el volumen de datos, es probable que no sean representativos de la realidad de cada tratamiento.

Otro problema presente en estos ensayos es la falta de enmascaramiento, que puede haber inducido sesgos en el tratamiento.

Es probable que exista un sesgo de publicación, así como erratas, en el caso de Pfizer y Solid Biosciences, dado que no han publicado un artículo que se haya sometido a revisión por pares ni el escrutinio necesario para publicar en una revista científica.

En este mismo sentido, el estudio de Sarepta Therapeutics, que sí se ha sometido a revisión por pares y el escrutinio de una revista, tiene mayor fiabilidad a la hora de tener en cuenta los datos publicados, aunque también tiene el estudio con el menor número de individuos tratados.

Respecto de la metodología para introducir el transgén en el individuo, un AAV recombinante introduce el ADN en el núcleo de las células en forma de concatémero, pero no se integra en el genoma y se irá diluyendo según las células realicen mitosis. Esto implica que la micro-distrofina mejorará temporalmente la función muscular de los individuos, pero gradualmente dejarán de expresarla, aunque los actuales estudios y modelos no nos permiten saber cuánto durará la expresión del transgén. ⁽⁴⁾

Otro problema que presenta la micro-distrofina es que los pacientes presentarán reacción inmune a ésta. Los individuos tratados con este tipo de terapia génica necesitan tomar inmunosupresores semanas antes y después de recibir el tratamiento, y hay que tomar especial precaución y profilaxis frente a enfermedades como el resfriado común, el COVID-19 y la gripe, ya que sus capacidades respiratorias son reducidas de base.

6. Conclusiones

La terapia génica es un enfoque prometedor para enfermedades hereditarias debidas a mutaciones en un gen concreto, como la DMD, las cuales no se pueden tratar adecuadamente por medios convencionales.

DMD, aun siendo una enfermedad monogénica, dado el gran tamaño del gen implicado, presenta una serie de desafíos y limitaciones para los diferentes enfoques de terapia génica aptos para ser usados como tratamiento.

Se están llevando a cabo terapias exitosas con micro-distrofina que han resultado en mejoras en la capacidad motora de los individuos tratados.

La terapia génica con micro-distrofina, aunque todavía está en fase de desarrollo, supone la estrategia más eficaz actualmente disponible para tratar a los individuos que padecen DMD, independientemente del tipo de mutación que tengan.



7. Bibliografía:

1. Falzarano MS, Scotton C, Passarelli C, Ferlini A. Duchenne Muscular Dystrophy: From Diagnosis to Therapy. *Molecules*. 2015 Oct 7;20(10):18168-84. doi: 10.3390/molecules201018168. PMID: 26457695; PMCID: PMC6332113.
2. <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/muscular-dystrophy/symptoms-causes/syc-20375388>
3. Duan D, Goemans N, Takeda S, Mercuri E, Aartsma-Rus A. Duchenne muscular dystrophy. *Nat Rev Dis Primers*. 2021 Feb 18;7(1):13. doi: 10.1038/s41572-021-00248-3
4. Venugopal V, Pavlakis S. Duchenne Muscular Dystrophy. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; July 14, 2021.
5. Zotova ED, Reshetov DA, Zhernovkov V, Vlodayets DV. Analysis of phenotype expressions of deletions in the dystrophin gene in terms of efficiency of exon skipping as a method for treatment of hereditary dystrophinopathies. *Researchgate*. 2016 Jan doi: 10.24075/brsmu.2016-03-03
6. Mavrogeni, Sophie et al. "Cardiac involvement in Duchenne and Becker muscular dystrophy." *World journal of cardiology* vol. 7,7 (2015): 410-4. doi:10.4330/wjc.v7.i7.410
7. LoMauro, A., D'Angelo, M. G., & Aliverti, A. (2015). Assessment and management of respiratory function in patients with Duchenne muscular dystrophy: current and emerging options. *Therapeutics and clinical risk management*, 11, 1475–1488. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S55889>
8. Boland BJ, Silbert PL, Groover RV, Wollan PC, Silverstein MD. Skeletal, cardiac, and smooth muscle failure in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Neurol*. 1996 Jan;14(1):7–12
9. Asher DR, Thapa K, Dharia SD, Khan N, Potter RA, Rodino-Klapac LR, et al. Clinical development on the frontier: gene therapy for duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Biol Ther*. 2020 Mar;20(3):263-274. doi: 10.1080/14712598.2020.1725469

10. 27. Jensen MH, Morris EJ, Gallant CM, Morgan KG, Weitz DA, Moore JR. Mechanism of calponin stabilization of cross-linked actin networks. *Biophys J*. 2014 Feb 18;106(4):793-800. doi: 10.1016/j.bpj.2013.12.042
11. Gao QQ, McNally EM. The Dystrophin Complex: Structure, Function, and Implications for Therapy. *Compr Physiol*. 2015 Jul 1;5(3):1223-39. doi: 10.1002/cphy.c140048
12. 31. Walsh MP. Calmodulin and its roles in skeletal muscle function. *Can Anaesth Soc J*. 1983 Jul;30(4):390-8. doi: 10.1007/BF03007862
13. Marshall JL, Crosbie-Watson RH. Sarcospan: a small protein with large potential for Duchenne muscular dystrophy. *Skelet Muscle*. 2013 Jan 3;3(1):1. doi: 10.1186/2044-5040-3-1
14. Yoshida M, Hama H, Ishikawa-Sakurai M, Imamura M, Mizuno Y, Araishi K, et al. Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. *Hum Mol Genet*. 2000 Apr 12;9(7):1033-40. doi: 10.1093/hmg/9.7.1033
15. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Exon>
16. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Intron>
17. Julie M. Crudele and Jeffrey S. Chamberlain. AAV-based gene therapies for the muscular dystrophies. *Human Molecular Genetics*, 2019, Vol. 28, No. R1 R102–R107. doi: 10.1093/hmg/ddz128
18. Scoles DR, Minikel EV, Pulst SM. Antisense oligonucleotides: A primer. *Neurol Genet*. 2019 Apr 1;5(2):e323. doi: 10.1212/NXG.0000000000000323
19. Lim KR, Maruyama R, Yokota T. Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug Des Devel Ther*. 2017 Feb 28;11:533-545. doi: 10.2147/DDDT.S97635
20. Bengtsson NE, Crudele JM, Klaiman JM, Halbert CL, Hauschka SD, Chamberlain JS. Comparison of dystrophin expression following gene editing and gene replacement in an aged preclinical DMD animal model. *Mol Ther*. 2022 Feb 8:S1525-0016(22)00086-7. doi: 10.1016/j.ymthe.2022.02.003
21. Erkut E, Yokota T. CRISPR Therapeutics for Duchenne Muscular Dystrophy. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 6;23(3):1832. doi: 10.3390/ijms23031832

22. K Yuasa, M Sakamoto, Y Miyagoe-Suzuki, A Tanouchi, H Yamamoto, J Li, et al. Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product. 2002 Nature 0969-7128/02
23. S B England , L V Nicholson, M A Johnson, S M Forrest, D R Love, E E Zubrzycka-Gaarn, et al. Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. Nature. 1990 Jan 11;343(6254):180-2. doi: 10.1038/343180a0.
24. Manini A, Abati E, Nuredini A, Corti S, Comi GP. Adeno-Associated Virus (AAV)-Mediated Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy: The Issue of Transgene Persistence. Front Neurol. 2022 Jan 5;12:814174. doi: 10.3389/fneur.2021.814174
25. Aartsma-Rus A, Krieg AM. FDA Approves Eteplirsen for Duchenne Muscular Dystrophy: The Next Chapter in the Eteplirsen Saga. Nucleic Acid Ther. 2017 Feb;27(1):1-3. doi: 10.1089/nat.2016.0657
26. Guiraud S, Chen H, Burns DT, Davies KE. Advances in genetic therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy. Experimental Physiology. 2015 Dec. doi: 10.1113/EP085308
27. Ricotti V, Ridout DA, Pane M, Main M, Mayhew A, Mercuri E, et al. The NorthStar Ambulatory Assessment in Duchenne muscular dystrophy: considerations for the design of clinical trials. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2016 Feb;87(2):149-55. doi: 10.1136/jnnp-2014-309405.
28. Mendell JR, Sahenk Z, Lehman K, Nease C, Lowes LP, Miller NF, et al. Assessment of Systemic Delivery of rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin in Children With Duchenne Muscular Dystrophy: A Nonrandomized Controlled Trial. JAMA Neurol. 2020 Sep 1;77(9):1122-1131. doi: 10.1001/jamaneurol.2020.1484
29. Gregorevic P, Allen JM, Minami E, Blankinship MJ, Haraguchi M, Meuse L, Finn E, Adams ME, Froehner SC, Murry CE, Chamberlain JS. rAAV6-microdystrophin preserves muscle function and extends lifespan in severely dystrophic mice. Nat Med. 2006 Jul;12(7):787-9. doi: 10.1038/nm1439

30. Caroline Le Guiner, Laurent Servais, Marie Montus, Thibaut Larcher, Bodvaël Fraysse, Sophie Moullec, et al. Long-term microdystrophin gene therapy is effective in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun* 8, 16105 (2017). doi: 10.1038/ncomms16105
31. Manning J, O'Malley D. What has the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy contributed to our understanding of this disease? *J Muscle Res Cell Motil.* 2015 Apr;36(2):155-67. doi: 10.1007/s10974-015-9406-4
32. Kornegay JN. The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy. *Skelet Muscle.* 2017 May 19;7(1):9. doi: 10.1186/s13395-017-0124-z
33. Fabb SA, Wells DJ, Serpente P, Dickson G. Adeno-associated virus vector gene transfer and sarcolemmal expression of a 144 kDa micro-dystrophin effectively restores the dystrophin-associated protein complex and inhibits myofibre degeneration in nude/mdx mice. *Hum Mol Genet.* 2002 Apr 1;11(7):733-41. doi: 10.1093/hmg/11.7.733.
34. Bourdon A, François V, Zhang L, Lafoux A, Fraysse B, Toumaniantz G, et al. Evaluation of the dystrophin carboxy-terminal domain for micro-dystrophin gene therapy in cardiac and skeletal muscles in the DMDmdx rat model. *Gene Ther.* 2022 Feb 1. doi: 10.1038/s41434-022-00317-6
35. Wang H, Marrosu E, Brayson D, Wasala NB, Johnson EK, Scott CS, et al. Proteomic analysis identifies key differences in the cardiac interactomes of dystrophin and micro-dystrophin. *Hum Mol Genet.* 2021 Jun 26;30(14):1321-1336. doi: 10.1093/hmg/ddab133.
36. Hayashita-Kinoh H, Guillermo PH, Nitahara-Kasahara Y, Kuraoka M, Okada H, Chiyo T, et al. Improved transduction of canine X-linked muscular dystrophy with rAAV9-microdystrophin via multipotent MSC pretreatment. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2020 Nov 17;20:133-141. doi: 10.1016/j.omtm.2020.11.003
37. Gonçalves MA, Janssen JM, Nguyen QG, Athanasopoulos T, Hauschka SD, Dickson G, et al. Transcription factor rational design improves directed differentiation of human mesenchymal stem cells into skeletal myocytes. *Mol Ther.* 2011 Jul;19(7):1331-41. doi: 10.1038/mt.2010.308.
38. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04281485>

39. <https://investorrelations.sarepta.com/static-files/0c4aca61-9419-45a5-afb1-ff2092644627>
40. Skopenkova VV, Egorova TV, Bardina MV. Muscle-Specific Promoters for Gene Therapy. Acta Naturae. 2021 Jan-Mar;13(1):47-58. doi: 10.32607/actanaturae.11063
41. <https://www.solidbio.com/about/media/press-releases/solid-biosciences-reports-efficacy-and-safety-data-from-the-ongoing-ignite-dmd-clinical-trial-and-resumption-of-patient-dosing-in-the-2e14-vg-kg-cohort>
42. <https://www.biospace.com/article/solid-biosciences-duchenne-muscular-dystrophy-drug-has-side-effects-issues/>
43. <https://strongly.mda.org/solid-biosciences-releases-letter-to-dmd-community-announcing-hold-on-ignite-dmd-trial-due-to-a-serious-adverse-event/>
44. Rodríguez de Córdoba S, Montes T. Síndrome hemolítico urémico atípico. Nefrología. 2011 May. doi: 10.3265/NefrologiaSuplementoExtraordinario.pre2011.Mar.10907
45. <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizers-new-phase-1b-results-gene-therapy-ambulatory-boys>
46. <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizer-open-first-us-sites-phase-3-trial-investigational>