

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TERAPIA GÉNICA Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
HEMATOLÓGICAS: AVANCES EN HEMOFILIA

Trabajo final de graduación sometido a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Especialidades en Microbiología para optar el grado y título de Especialista en Hematología

KAROL MARÍA VARGAS CAMPOS

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2024

Dedicatoria

Le dedico este trabajo:

A Lucas, porque tú fuiste mi soporte y mi ayuda, me empujaste a ser mi mejor versión y te encargaste de todo para que yo lograra mi sueño. Te amo

A mi familia: Mary, Dago, Vivi y Esteban; por siempre estar para mí en cada una de las etapas de mi vida, y por siempre motivarme a seguir adelante. Los Amo.

A Lucy por tener los ojos más bellos del mundo.

Y a aquellos que aman la ciencia y el conocimiento tanto como yo...

Agradecimiento

Primero a Dios por permitirme lograr uno de mis sueños.

A mis profesores, la Dra. Melissa Granados y el Dr. Walter Rodríguez por su guía y ayuda en todo este proceso.

A mis compañeros de trabajo, por asumir mis funciones en mi ausencia.

A mi tutor, el Dr. Alejandro Ulloa y a mis lectores el Dr. Danny Ugalde y el Dr. Walter Rodríguez, por su guía en el desarrollo de este trabajo, y por tomarse el tiempo para ser parte de mi formación.

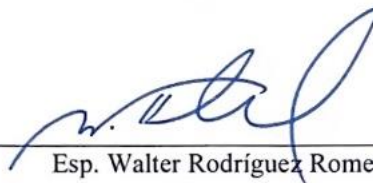
A mis compañeros de especialidad, por su ayuda.

A mis papás por su consejo y apoyo; y a Lu por ser mi soporte en cada paso.

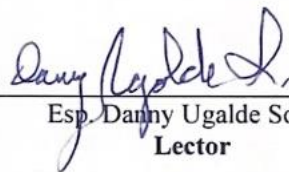
Este trabajo final de graduación fue aceptado por la Comisión del Programa de Posgrado en Especialidades en Microbiología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Especialidad en Hematología.



Ph.D Alejandro Ulloa Morales
Profesor tutor



Esp. Walter Rodríguez Romeró
Lector



Esp. Danny Ugalde Solera
Lector



Karol María Vargas Campos
Sustentante

Tabla de contenido

Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Hoja de aprobación	iv
Resumen	viii
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Lista de abreviaturas	xi
Justificación	1
Objetivo general:	2
Objetivos específicos:	3
Metodología	4
Introducción	5
Capítulo 1. Generalidades en hemofilia	7
1.1. Epidemiología	7
1.2. Tipos de hemofilia	8
1.2.1. Hemofilia A (HA)	8
1.2.2. Hemofilia B (HB)	10
1.3. Proceso de coagulación normal y fisiopatología de la hemofilia	12
1.3.1. Fase de iniciación	12
1.3.2. Fase de amplificación	13
1.3.3. Fase de propagación	13
1.4. Clínica asociada	14
1.4.1. Principales signos de hemofilia	14
1.4.2. Hemofilia en recién nacidos y niños menores de 2 años	15
1.4.3. Hemofilia en adultos	15
1.4.4. Clasificación clínica de la hemofilia:.....	15
1.4.5. Otros estudios importantes.....	17
1.5. Estudios moleculares en hemofilia	17
1.5.1. Alteraciones moleculares de la hemofilia A	19

1.5.2.	Alteraciones moleculares de la hemofilia B	21
1.5.3.	Variantes del factor IX	23
1.6.	Mujeres con hemofilia.....	25
1.6.1.	Mujeres heterocigotas o portadoras.....	25
1.6.2.	Mujeres con hemofilia.....	26
1.7.	Inhibidores de la coagulación.....	26
1.8.	Hemofilia adquirida	29
1.9.	Diagnóstico de laboratorio.....	31
1.9.1.	Toma y procesamiento de la muestra	31
1.9.2.	Pruebas iniciales.....	31
1.9.3.	Test de mezclas.....	32
1.9.4.	Determinación de deficiencia de factores	32
1.9.5.	Pruebas coagulométricas de un paso	33
1.9.6.	Métodos cromogénicos.....	33
1.9.7.	Alteraciones moleculares y su influencia en las pruebas diagnósticas.....	34
1.9.8.	Prueba de Bethesda	34
1.9.9.	Otros aspectos importantes.....	36
1.10.	Tratamiento.....	36
1.10.1.	Primeros tratamientos utilizados	36
1.10.2.	Tratamiento para hemofilia en la actualidad	37
1.10.3.	Diferentes líneas de tratamiento	38
1.10.4.	Tratamiento para pacientes con inhibidores	44
Capítulo 2.	Generalidades en terapia génica	46
2.1.	Definición de terapia génica	49
2.2.	Tipos de Terapia Génica:.....	51
2.2.1.	Terapia génica somática.....	51
2.2.2.	Terapia génica de línea germinal:	51
2.3.	Material genético a transferir	51
2.3.1.	Ácido desoxirribonucleico	52
2.3.2.	ARN mensajero.....	53
2.3.3.	ARN pequeños de interferencia	54
2.3.4.	Micro ARN.....	54
2.3.5.	Oligonucleótidos antisentido.....	55

2.4. Metodologías utilizadas en terapia génica.....	55
2.4.1. Adición génica.....	56
2.4.2. Supresión génica	63
2.4.3. Edición génica.....	66
2.5. Métodos para la transferencia génica.....	79
2.5.1. Vectores no virales	80
2.5.2. Vectores virales:	87
2.6. Células diana de la terapia génica:	88
2.6.1. Terapias in vivo.....	89
2.6.2. Terapias ex vivo.....	89
2.7. Terapias génicas aprobadas actualmente	90
2.8. Factores que afectan el desempeño de la terapia génica.....	92
Capítulo 3. Terapia génica: nuevos avances en hemofilia	95
3.1. Órgano diana	95
3.2. Vectores virales Utilizados.....	96
3.3. Complicaciones del desarrollo del casete génico de FVIII	98
3.4. FIX Padua y su uso en terapia génica.....	99
3.5. Ensayos clínicos en hemofilia A	99
3.5.1. Giroctocogene fitelparvovec.....	101
3.5.2. Dirloctocogene samoparvovec (SPK-8011).....	102
3.5.3. Valoctocogene roxaparvovec	103
3.6. Ensayos clínicos en Hemofilia B.....	106
3.6.1. BBM-H901.....	109
3.6.2. Fidanacogene elaparvovec (BEQVEZTM).....	109
3.6.3. Etranacogene dezaparvovec (Hemgenix®).....	110
3.7. Terapia génica en niños y nuevas terapias en edición génica.....	112
3.8. Limitantes y riesgos de la terapia génica en hemofilia	113
3.9. Registro mundial de la federación mundial de hemofilia (FMH)	115
Conclusiones	116
Referencias bibliográficas.....	119

Resumen

La hemofilia es una enfermedad hereditaria ligada a X, que afecta alrededor de 247 146 personas en el mundo. Es causada por un defecto en los genes que codifican por el FVIII de la coagulación en el caso de la hemofilia A, y del FIX en el caso de la hemofilia B. Se caracteriza por una deficiencia cuantificada o funcional del factor afectado que resulta en eventos de sangrado prolongados posterior a una lesión, extracción dental o cirugía. En pacientes con deficiencia severa (<1% de actividad del factor) el sangrado lleva a artropatía, defectos neurocognitivos e incluso la muerte. En la actualidad el principal fin del tratamiento es corregir la deficiencia del factor a través de la administración de factor recombinante o concentrado plasmático. Sin embargo a partir de la década de los 1970s y su desarrollo posterior, la terapia génica surge como un tratamiento prometedor y de alto potencial para el tratamiento de esta patología e incluso su cura. Actualmente se encuentran en desarrollo alrededor de 14 ensayos clínicos en fase III, 15 en fase II y 8 en fase I que tienen como fin el desarrollo de nuevas terapias génicas en hemofilia. Para el 2024 se han aprobado 3 nuevas drogas utilizando esta tecnología. Este trabajo busca exponer las nuevas investigaciones y ensayos clínicos que se han realizado en temas de terapia génica en hemofilia, así como los fundamentos teóricos en los que se basan.

Lista de tablas

<i>Tabla 1. Principales terapias utilizadas para el tratamiento de pacientes con hemofilia.</i>	39
<i>Tabla 2. Diferentes concentrados de FVIII que se encuentran en el mercado.</i>	40
<i>Tabla 3. Diferentes concentrados de FIX que se encuentran en el mercado.</i>	41
<i>Tabla 4 Vectores no virales utilizados en terapia génica según el método utilizado y el tipo de material utilizado.</i>	82
<i>Tabla 5. Cuadro comparativo de los diferentes vectores virales utilizados en terapia génica.</i>	88
<i>Tabla 6. Tratamientos aprobados en terapia génica a nivel mundial.</i>	91
<i>Tabla 7. Ensayos clínicos de terapia génica en hemofilia A.</i>	101
<i>Tabla 8. Ensayos clínicos de terapia génica para hemofilia B.</i>	108

Lista de figuras

<i>Figura 1. Componentes de la proteína de factor VIII de la coagulación.</i>	<i>10</i>
<i>Figura 2. Componentes de la proteína de factor IX de la coagulación.</i>	<i>12</i>
<i>Figura 3. Representación del proceso de coagulación.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 4. Prevalencia de las variantes nulas y no nulas de hemofilia A</i>	<i>18</i>
<i>Figura 5. Prevalencia de las variantes nulas y no nulas de hemofilia B</i>	<i>18</i>
<i>Figura 6. Distribución de las mutaciones del gen f8, encontradas en pacientes con hemofilia A</i>	<i>20</i>
<i>Figura 7. Distribución de las mutaciones del gen f9, encontradas en pacientes con hemofilia B.</i>	<i>23</i>
<i>Figura 8. Esquemización de la determinación de inhibidores por el método Bethesda.</i>	<i>36</i>
<i>Figura 9. Esquema de un casete génico utilizado en vectores virales adeno asociados o lentivirales.</i>	<i>61</i>
<i>Figura 10. Arquitectura de TALEN y las afinidades de diferentes combinaciones de RVD.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 11. Casete génico de Valoctocogene roxaparvovec</i>	<i>105</i>
<i>Figura 12. Representación esquemática del casete génico de Etranacogene dezaparvovec.....</i>	<i>112</i>

Lista de abreviaturas

°C: Grados celsius

AAD: Dominio de activación ácido

AAs: Aminoácidos

AAV: Virus adeno asociados

Act: Péptido de activación

Ad: Adenovirus

ADA: Adenosin desaminasa

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AEAC: Ácido ϵ aminocaproico

AFP: Alfa feto proteína

Ago2: Argonauta 2

ALT: alanina aminotransferasa

apoA: Apolipoproteína A

ARN: Ácido ribonucleico

ARNbs: Ácido ribonucleico de banda sencilla

ARNdb: Ácido ribonucleico doble banda

ARNg: Ácido ribonucleico guía

ARNi: Ácido ribonucleico de interferencia

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNt: ARN de transferencia

ASOs: Oligonucleótidos antisentido

AST: Aspartato aminotransferasa

AT: Antitrombina

A1AT1: Promotor de α -1-antitripsina

ATP: Trifosfato de adenosina

DDB: Delección del dominio B

BDDhFVIII: Factor VIII humano con delección del dominio

Ca²⁺: Calcio iónico

CART: Terapia de células T con receptores quiméricos de antígenos

CCPA: Concentrado de complejo protrombínico activado

CARs: Receptores antigénicos quiméricos

CBA: β actina de pollo

CBER: Center for Biologics Evaluation and Research

CE: Potenciador o enhancer

CEA: Antígeno carcinoembrionario

CFC: Concentrados de factor de coagulación

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

CMV: Citomegalovirus

CMV-IE: Promotor y potenciador principal inmediatamente temprano de citomegalovirus

CRISPR Cas9: Sistema de repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas, acoplado a una nucleasa caspasa 9

C-Terminal: Extremo carboxilo terminal

Cys: Cisteína

DDAVP: Desmopresina

dL: Decilitro

EBA: editores de base de adenina

EBC: Editores de bases de citosina

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EF1 α : Factor de elongación 1 α

EMA: Agencia de Medicina Europea

EP: Editores de "primers"

eRF: Factores de liberación

FDA: U.S. Food and Drug Administration

Fc: Fragmentos cristalizables

FcRn: Receptor Fc neonatal

FMH: Federación Mundial de Hemofilia

FI: Factor I de la coagulación

FII: Factor II de la coagulación o protrombina

FIIa: Factor II activado o trombina

FIII: Factor III de la coagulación

FIV: Factor IV de la coagulación

FIX: Factor IX de la coagulación

FIXa: factor IX activado

FSC-GM: Factor estimulante de colonias granulocito-macrofágicas

FT: Factor tisular

FV: Factor V de la coagulación

FVa: Factor V activado

FVII: Factor VII de la coagulación

FVIIa: Factor VII activado

FVIII: Factor VIII de la coagulación

FVIIIa: Factor VIII activado

FVIII:C: Método cromogénico para FVIII

FVIII:Coag: método coagulométrico para FVIII

FvW: Factor de Von Willebrand

FX: Factor X de la coagulación

FXa: Factor X activado

FXI: Factor XI

g: Gravedades

HEK293: Células de riñón embrionario humano

HCR: Región de control hepático

Gla: Ácido gamma carboxiglutámico

GTP: Guanosina trifosfato

GTPasa: Guanosina trifosfatasa

hAAT: α_1 -antitripsina

HbF: Hemoglobina fetal

h: Horas

H: Segmento hidrofóbico

HA: Hemofilia A

HB: Hemofilia B

HDR: Vía de reparación dirigida por homología

hFVIII: Factor VIII humano

HIV-1: Virus de la Inmunodeficiencia humana 1

HSC: Células madres hematopoyéticas

HSV: virus herpes simplex

Hys: Histidina

I: Intrón

Ig: Inmunoglobulina

IgG: Inmunoglobulina G

IgE: Inmunoglobulina E

IL: Interleucina

Inv22: Inversión del intrón 22

ITR: Repeticiones terminales invertidas

IV: Intravenoso

Kb: Kilobase

KDa: Kilodalton

L: Péptido de unión

LLA: Leucemia linfocítica aguda

LCM: Linfoma de células del Manto

LDCGB: Linfoma difuso de células grandes B

LF: Linfoma folicular

LNH B: Linfoma no hodgkin de células B

LTR: Secuencias repetidas terminales largas

LV: Lentivirus

M: secuencias diana de miARNs endógenos

miARN: Micro ARN

mL: Mililitros

MM: Mieloma múltiple

NHEJ: Unión de extremos no homólogos de ADN

NBDF: National Bleeding Disorders Foundation

NLS: Señales de localización nuclear

nm: Nanómetros

Nts: Nucleótidos

N-Terminal: Extremo amino terminal

pA: Señal de poliadenilación

PABP: señal de poliadenilación de unión a proteína

PAI-1: Activador del plasminógeno 1

PAMs: Motivos protoespaceadores adyacentes

pbs: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PD-1: Proteína de muerte celular programada

PEG: Polietilenglicol

pegARN: ARN guía principal de edición

PEI: Polietilenimina

PFC: Plasma fresco congelado

PFSs: Sitios flanqueantes de protoespaciador

Poli(A): Señal o cola de poliadenilación

Pro: Propéptido

q: Brazo largo del cromosoma

R338L: variante Padua

rAAV: Virus adeno asociado recombinante

rFVIIa: FVII recombinante activado

RISC: Complejo de silenciamiento inducido por ARN

RNASEH1: ARNasa H endonucleasa 1

RNP: Ribonucleoproteína

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RVD: Residuos de repetición variable

SCID: Inmunodeficiencia severa combinada

siARN: Ácidos ribonucleicos pequeños de interferencia

SNPs: Polimorfismos de un solo nucleótido

sPA: Cola de poliadenilación sintética

SQ: Secuencia de unión de 14 aminoácidos

TALEN: Nucleasas tipo activadores de transcripción

TCR: Receptor de células T

TFB: sitio de unión a factor transcripcional

TFPI: Inhibidor de la vía del factor tisular

TNF: Factor de necrosis tumoral

TP: Tiempos de protombina

TTPa: tiempos de Tromboplastina Parcial Activado

TTR: Transtiretina

Justificación

Las enfermedades hematológicas afectan a miles de personas alrededor del mundo. La hemofilia es un desorden hematológico ligado al cromosoma X que está asociado a una mutación en el gen que produce los factores de la coagulación VIII y IX, provocando sus deficiencias. Su incidencia es de 17,1 por cada 100 000 hombres para hemofilia A y de 3,8 por cada 100 000 hombres para hemofilia B (World Federation of Hemophilia [WFH], 2023). Estos pacientes se tratan de por vida para evitar los sangrados espontáneos que ponen en peligro sus vidas (Kumar et al., 2016). El tratamiento con terapia génica reduce la necesidad de una terapia de rutina continua y es útil en pacientes que desarrollan anticuerpos contra el tratamiento convencional (Kumar et al., 2016; Liesner et al., 2021).

El uso de la terapia génica es ideal para el tratamiento de esta enfermedad hematológica, así como para muchas otras. Esta tecnología tiene el potencial de curar patologías que son tratables pero no curables y proveer tratamiento para otras sin tratamiento. La terapia génica se ha considerado uno de los mayores avances de la ciencia en la actualidad (Kumar et al., 2016).

De ahí la importancia de continuar las investigaciones en esta y sentar las bases teóricas para su aplicación, con el fin de garantizar un tratamiento seguro y eficiente para los pacientes, y una cura que les brinde una mejor esperanza de vida.

Objetivo general:

Realizar una revisión de los avances e investigaciones en terapia génica y su uso en el tratamiento de la Hemofilia.

Objetivos específicos:

Describir las características, fisiopatología, diagnóstico y tratamiento de la hemofilia.

Explicar el fundamento de terapia génica y las metodologías utilizadas para su aplicación como tratamiento.

Investigar los avances en el uso de la terapia génica como tratamiento de la Hemofilia.

Metodología

La investigación tiene un enfoque cualitativo, bajo el cual se realizó una revisión de las diferentes investigaciones y avances que se han desarrollado en el campo de la hemofilia, terapia génica y su utilidad como tratamiento.

Para lo cual se analizó información obtenida de entidades importantes en el área de la salud como la “Food and Drug Administration” (FDA), la “European Medicine Agency”(EMA), la Federación Mundial de Hemofilia (FMH) y otros; publicaciones de Universidades importantes a nivel mundial; artículos de revistas científicas y libros con información actualizada que expusieran un enfoque sobre la realidad actual del uso de esta terapia y que mostraran los avances en el tratamiento de enfermedades hematológicas a través de su uso.

La búsqueda de información se realizó por medio de páginas web, en revistas de importancia médica y en páginas de instituciones importantes en salud. La organización de la información documental se realizó con el software Zotero. Las referencias bibliográficas fueron realizadas de acuerdo a formato APA.

Los datos epidemiológicos sobre hemofilia fueron tomados de la Encuesta Anual de la Federación Mundial de Hemofilia, y la información de producto de las publicaciones realizadas por los investigadores así como de la documentación de producto obtenida de las páginas de la FDA y EMA.

Todos los ensayos clínicos reportados en este trabajo fueron revisados en el registro online de “Clinical Trials” del gobierno de los Estados Unidos.

Introducción

Los pacientes que sufren de hemofilia severa son aquellos que poseen menos de 1% de actividad de factor VIII o factor IX. Estos pacientes presentan con frecuencia sangrados espontáneos en articulaciones, tejidos blandos y músculos; estos sangrados también pueden presentarse en espacios cerrados como intracraneales o retroperitoneales y pueden llegar a ser un riesgo para la vida (Doshi & Arruda, 2018). Los hemofílicos severos sufren de dolor crónico, deformidad de articulaciones, movilidad reducida y una mortalidad incrementada (Pipe et al., 2022).

El tratamiento de estos pacientes consiste en recibir profilaxis desde la niñez y de por vida, con reemplazo de factor exógeno. Esto para limitar los sangrados espontáneos y disminuir la morbilidad y la mortalidad que presentan. Una de las principales dificultades de este tratamiento es la complejidad de su uso ya que se administra intravenoso, por lo que la adherencia al tratamiento es un reto en pacientes jóvenes. Y el acceso a este medicamento es muy limitado en países en desarrollo, lo que crea una barrera de acceso a la profilaxis (Doshi & Arruda, 2018).

Aunado a esto se ha visto que el 30% de los pacientes con Hemofilia A que reciben profilaxis desarrollan inhibidores, los cuales son alo-anticuerpos neutralizantes contra el factor VIII exógeno con el que se tratan. Esta es una de las complicaciones más importantes para los pacientes y para los servicios de salud. La presencia de estos alo-anticuerpos los llevan a hacer un mayor uso de los recursos de los centros de salud, sufren de una mayor cantidad de hemorragias anuales, mayor cantidad de sangrados articulares, dolor y hospitalizaciones (Pipe et al., 2022).

Debido a estas dificultades en el uso de concentrados de factores, se ha iniciado el desarrollo de nuevas terapias como los concentrados de vida media extendida, y los anticuerpos bio-específicos monoclonales que mimetizan al FVIII (nombre comercial Emicizumab) y que han demostrado una reducción marcada en la frecuencia de sangrados. Otras investigaciones se han centrado en el desarrollo de agentes contra proteínas anticoagulantes. Sin embargo, todos estos enfoques lo que buscan es una mejora en el fenotipo de sangrado; a pesar de ello estos pacientes van a seguir necesitando concentrados de factores en el caso de hemorragias por traumas severos o cirugías (Batty & Lillicrap, 2019).

Tanto los concentrados de factor de vida media corta como los factores de vida media extendida necesitan infusiones frecuentes. Convirtiendo la adherencia al tratamiento y la hemostasia adecuada en un desafío para la calidad de vida de los pacientes (Rangarajan et al., 2017).

A principios de los 1990s, la terapia génica surge como un tratamiento prometedor e incluso una cura potencial para la hemofilia, al ser una enfermedad monogénica que afecta a 247 146 personas alrededor del mundo (Baas et al., 2023; World Federation of Hemophilia [WFH], 2023). Desde sus inicios, más de 2500 ensayos clínicos se han iniciado para un amplio rango de enfermedades desde monogénicas hasta infecciosas, desórdenes neurodegenerativos y cáncer (Anguela & High, 2019).

En Junio del 2023 después de años de múltiples ensayos y estudios clínicos, se aprueba Roctavian, una terapia génica basada en vectores de virus adeno asociados para el tratamiento de adultos que padecen hemofilia A severa y a finales de este mismo año se aprueba Hemgenix, una terapia génica para Hemofilia B (European Medicines Agency [EMA], 2024; Silva, 2022; U.S. Food and Drug Administration [FDA], 2024).

Este trabajo busca mostrar los nuevos avances e investigaciones realizados en temas de hemofilia y terapia génica, exponer las bases teóricas que fundamentan los estudios que se están realizando en ambos campos y que han permitido el desarrollo de la terapia génica en el campo de la hemofilia, así como los nuevos avances en este tratamiento.

Capítulo 1. Generalidades en hemofilia

Se cree que los primeros casos de hemofilia se remontan al antiguo Egipto, posteriormente hay evidencia de que en el siglo 2 después de Cristo, escritos judíos en el Talmud describían que los niños que tuvieron hermanos varones que murieron durante la circuncisión, no era necesario que recibieran el procedimiento (López-Arroyo et al., 2023). En el nuevo testamento se menciona a una mujer que sangró por 12 años hasta que tocó el manto de Jesús y en el siglo X Abu Khasin, un médico árabe, describe familias cuyos familiares varones mueren de hemorragias incontroladas después de un trauma (National Bleeding Disorders Foundation [NHF], 2023).

En 1803 John Conrad Otto, un médico de Filadelfia, fue el primero en publicar un desorden asociado a sangrados que afectaba a hombres principalmente y se heredaba entre los familiares. En 1813 John Hay publica la transmisión de un rasgo de trastorno hemorrágico de un padre a sus hijas sin afectarlas. Y en 1828 se le da el nombre de “hemorrafilia” por parte del Dr. Johann Lukas Schönlein y su estudiante Friedrich Hopff, nombre que luego sería transformado en hemofilia. En 1947, el Dr. Alfredo Pavlovsky, un médico de Argentina, logra diferenciar dos tipos de hemofilia en su laboratorio: A y B (NBDF, 2023).

La hemofilia cobra importancia al ser considerada la enfermedad de la realeza, asociándose a las familias reales de Inglaterra, Alemania, Rusia y España en los siglos XIX y XX, teniéndose registros a partir de la Reina Victoria (1837-1901) y tres generaciones posteriores a ella (Doncel et al., 2023; NBDF, 2023).

1.1. Epidemiología

Según el reporte de la Encuesta Anual Global 2022 de la Federación Mundial de Hemofilia (FMH) donde se obtiene información de 125 países participantes; para el 2022 se reportaron 247 146 personas con hemofilia, de los cuales 208 957 padecen hemofilia A, 42 203 hemofilia B y 5 986 de hemofilia de tipo desconocido. El 95% de los casos son hombres y un 5% mujeres. La prevalencia de la enfermedad a nivel mundial es de 17,1 por cada 100 000 hombres para hemofilia A y de 3,8 por cada 100 000 hombres para hemofilia B. Siendo 6 de cada 100 000 habitantes los que presentan hemofilia A severa y 1,1 por cada 100 000 habitantes con hemofilia B severa (World Federation of Hemophilia [WFH], 2023).

Entre los países participantes de la Encuesta anual global 2022 de la FMH se incluye Costa Rica. Para el 2022 en nuestro país se reportaron 228 personas con Hemofilia de los cuales 184 son hemofílicos A y 44 hemofílicos B. El 54% de los casos se encuentra en edades entre los 19 y 44 años, mientras que para la Hemofilia B el 52% se encuentra en ese mismo rango de edad. Nuestro país reporta unos 170 pacientes con enfermedad severa en profilaxis y 23 casos nuevos para el 2022. Así mismo se registran 16 pacientes con hemofilia A que presentan inhibidores al tratamiento y toman emicizumab. Entre los tratamientos reportados por los participantes está el factor VIII derivado de plasma y el recombinante. En Costa Rica se reporta el uso de 17 931 000 UI de factor VIII derivado de plasma y de 3 618 000 de factor IX derivado de plasma (WFH,2023).

1.2. Tipos de hemofilia

El término de hemofilia viene del griego hemo “sangre” y filia “amor”. La hemofilia se caracteriza por la deficiencia de factores de la coagulación y un patrón de herencia ligado al sexo, esta deficiencia lleva a una disminución de la hemostasia por una incapacidad en la amplificación de la coagulación, lo que genera en el paciente sangrados espontáneos que varían en frecuencia y severidad. Esto va a depender de los niveles del factor en sangre (Doncel et al., 2023; López-Arroyo et al., 2023).

La secuenciación de los genes involucrados en la hemofilia ha permitido la descripción y registro de las principales mutaciones, así como la correlación con los diversos grados de severidad (López-Arroyo et al., 2023).

1.2.1. Hemofilia A (HA)

La hemofilia A es una enfermedad hereditaria causada por un defecto en el gen localizado en el brazo largo del cromosoma X, en la posición Xq28, que causa una deficiencia cuantificada o funcional del factor VIII de la coagulación, con herencia ligada a X. Un padre con el cromosoma X mutado lo podría pasar a sus hijas convirtiéndolas en portadoras, pero sus hijos varones no son afectados. Las mujeres portadoras transmitirán la enfermedad al 50% de sus hijos y el 50% de sus hijas serán portadoras; aunque podrían presentarse homocigosis o doble heterocigosis. Es el tipo de hemofilia más frecuente, representa entre el 80% y el 85% de los hemofílicos (Doncel et al., 2023).

Los hemofílicos A se clasifican de acuerdo con la deficiencia de la actividad del Factor VIII:

- **Deficiencia media:** La actividad del factor es de 5% a 40%. Usualmente presentan sangrados posteriores a procesos quirúrgicos (Doncel et al., 2023).

- **Deficiencia moderada:** Poseen una actividad de 1% a 5% de factor VIII (Doncel et al., 2023).
- **Deficiencia severa:** Es caracterizado por una actividad menor al 1%. Estos pacientes presentan sangrados espontáneos con mayor frecuencia (Doncel et al., 2023).

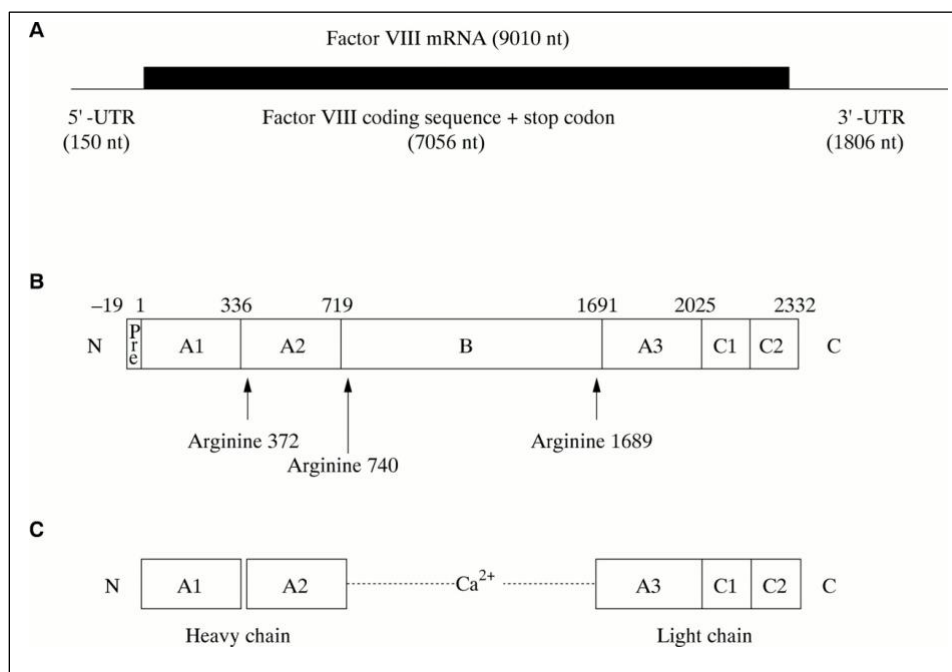
1.2.1.1. Estructura del factor VIII

El factor VIII es una glicoproteína con alto peso molecular que actúa como un cofactor en el proceso de coagulación. El gen que codifica por ella se ubica en el brazo largo (q) del cromosoma X en la posición Xq28, este tiene una longitud de 186 kilobases (kb) de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico, consiste en 26 exones y codifica por un ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de 9,0kb. La proteína resultante es un polipéptido precursor de 2351 aminoácidos (AAs), sintetizado principalmente por los hepatocitos (Doncel et al., 2023).

La proteína madura del FVIII como se muestra en la figura 1 se compone de un heterodímero con dos cadenas compuestas de 3 dominios homólogos A, un único dominio B y dos dominios homólogos C. Se presentan dos cadenas una pesada que posee los dominios A1-A2 y la cadena liviana con los dominios A3-C1-C2. Esta proteína posee un peso molecular de 280 kilodaltons (kDa) y una concentración plasmática de 0,1 a 0,25 microgramos/mililitro ($\mu\text{g/mL}$). Desde el extremo amino (N) terminal al carboxilo (C) terminal cada dominio posee sitios de unión de los componentes de la cascada de la coagulación, la cadena pesada se une en el extremo amino terminal al factor IX y la cadena ligera al factor Von Willebrand (FvW) en el extremo carboxilo terminal (Castaman & Matino, 2019; Doncel et al., 2023).

El factor VIII es un factor inestable (vida media de 12 horas) que circula en plasma unido a la proteína multimérica FvW. Este actúa como una chaperona, lo que lo protege de la proteólisis y lo transporta a los sitios de lesión vascular (Doncel et al., 2023; Lacroix-Desmazes et al., 2020). El FvW modula la endocitosis del FVIII y su inmunogenicidad potencial (Lacroix-Desmazes et al., 2020).

Figura 1. Componentes de la proteína de factor VIII de la coagulación.



(A) Estructura del ARNm del factor VIII que muestra la extensión y ubicación del marco de lectura. (B) Molécula de la proteína del factor VIII que comprende una pre-secuencia de 19 aminoácidos y un péptido maduro de 2332 aminoácidos (longitud total, 2351 aminoácidos), se observan los puntos de corte (marcados con flechas) en residuos de arginina causantes de su activación por proteólisis. (C) Forma activa de la proteína factor VIII activado (FVIIIa), comprende un heterotrímero en el que la cadena pesada N-terminal dimérica se mantiene unida con la cadena ligera C-terminal monomérica mediante un puente de ion metálico de calcio (Ca²⁺). N: extremo N terminal, C: extremo C terminal, Ca²⁺: calcio iónico, UTR: regiones no traducidas. A1, A2, A3, B, C1 y C2 representan dominios asignados según homologías dentro de la proteína. Tomado de Bowen (2002).

1.2.2. Hemofilia B (HB)

La hemofilia B es caracterizada por la deficiencia del factor IX (FIX) de la coagulación, resultando en eventos de sangrado prolongados posterior a una lesión, extracción dental o cirugía. La edad de diagnóstico y la frecuencia de episodios de sangrado se relaciona con los niveles de actividad del FIX que posea el paciente. Esta hemofilia se hereda ligada a X por lo que una mujer con la variante patogénica tiene un 50% de probabilidad de transmitirlo a su hijo, un padre con el gen mutado lo transmite a todas sus hijas y a ninguno de sus hijos (Konkle & Nakaya, 2023).

En pacientes con hemofilia B se observa mayor frecuencia de eventos en la niñez que en la etapa adulta. La hemofilia B representa aproximadamente el 15% de todos los casos de hemofilia (Doncel et al., 2023).

En pacientes con:

- **Hemofilia B severa:** el diagnóstico se da durante los primeros 2 años de vida, estos pacientes si no reciben tratamiento profiláctico podrían sufrir de 2 a 5 episodios de sangrado espontáneo al mes (Konkle y Nakaya, 2023).
- **Hemofilia B moderada:** rara vez tienen sangrados espontáneos, sufren de sangrado prolongado posterior a un evento traumático menor. El diagnóstico en estos pacientes se realiza entre los 5 y 6 años de vida. Los eventos hemorrágicos tienen una incidencia que va de 1 al mes o 1 al año (Konkle & Nakaya, 2023).
- **Hemofilia B media:** Estos pacientes no presentan episodios de sangrado espontáneos, sin tratamiento profiláctico sufren de sangrados tras cirugías o extracciones dentales. La incidencia de sangrado es de 1 al año a 1 cada 10 años. El diagnóstico de estos pacientes se da en edad avanzada (Konkle & Nakaya, 2023).

1.2.2.1. Estructura del factor IX.

El gen que codifica por el factor IX, como se muestra en la figura 2, se localiza en el brazo largo del cromosoma X en Xq27.1, mide aproximadamente 34kb de ADN. Es más simple estructuralmente que el gen del factor VIII, contiene 8 exones de los que el más largo mide 1935 pares de bases (pbs) (Shah et al., 2022).

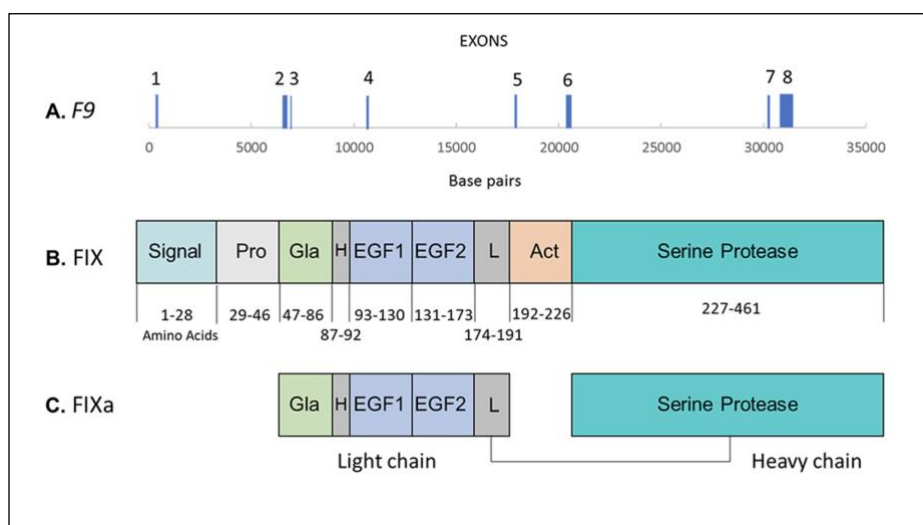
El factor IX es una proteína más pequeña que la del factor VIII y posee menos epítomos, pesa 55 kDa, su concentración plasmática es de 3 a 5 $\mu\text{g/mL}$ y es un zimógeno que al activarse posee función serina proteasa (Castaman & Matino, 2019; Shah et al., 2022; Majumder, 2022).

Esta proteína incluye un péptido de señal, un propéptido, dominios de ácido gamma carboxilglutámico (Gla), dos dominios tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF), una secuencia de unión y un dominio catalítico de proteasa. De los dominios Gla, 12 necesitan de carboxilación gamma dependiente de vitamina K. Al activarse se produce el FIXa (ver figura 2), el cual consiste en una cadena ligera que incluye dominios GLA y EGF, y una cadena pesada que es el dominio catalítico la cual posee actividad serina proteasa (Miller, 2021).

El factor IX puede ser activado por el factor VII (FVII) y el factor tisular (FT), o por el factor XI (FXI), ya sea en las vías extrínsecas o intrínsecas respectivamente. Este en

presencia de su cofactor VIII activa al factor X (FX) que se encargará de convertir la protrombina en trombina para facilitar con esto la formación del coágulo (Miller, 2021).

Figura 2. Componentes de la proteína de factor IX de la coagulación.



Componentes del factor IX desde el gen *F9* (A.), siguiendo por la proteína FIX (B.) Hasta su forma activada (C.). Incluye dominios de péptido de señal ("Signal"), un propéptido (Pro), ácido gamma carboxiglutámico (Gla), un segmento hidrofóbico (H), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) 1 y 2, un péptido de unión (L), un péptido de activación (Act.) y una serina proteasa. Tomado de Miller (2021).

1.3. Proceso de coagulación normal y fisiopatología de la hemofilia

El proceso de coagulación consta de 3 fases: iniciación, amplificación y propagación que llevan a la generación de trombina. El fin de la hemostasia es generar la trombina suficiente para estabilizar el coágulo (Sidonio et al., 2023). En la figura 3 se observa representado el proceso normal de coagulación con la producción final de fibrina.

1.3.1. Fase de iniciación

Durante la fase de iniciación pequeñas cantidades de factor X activado (FXa), FIXa y trombina son producidas en las células que expresan factor tisular (FT). La interacción entre el factor tisular y el factor VII activado (FVIIa) es el proceso fundamental en la iniciación de la coagulación. El complejo tenasa extrínseca (FVIIa/FT) activa a los factores X y IX, y el factor Xa formado, es capaz de generar pequeñas cantidades de trombina de manera local. La trombina producida en esta fase es crucial para la activación plaquetaria en un estado procoagulante (Sidonio et al., 2023).

1.3.2. Fase de amplificación

La fase de amplificación es dependiente de la presencia de membranas plaquetarias activadas y de la interacción de estas con los factores de la coagulación (Baute et al., 2011). La activación plaquetaria permite que expresen receptores y sitios de unión para factores de la coagulación activados. Con estas activaciones la trombina activa a los cofactores V, VIII y XI en la superficie plaquetaria (Sidonio et al., 2023).

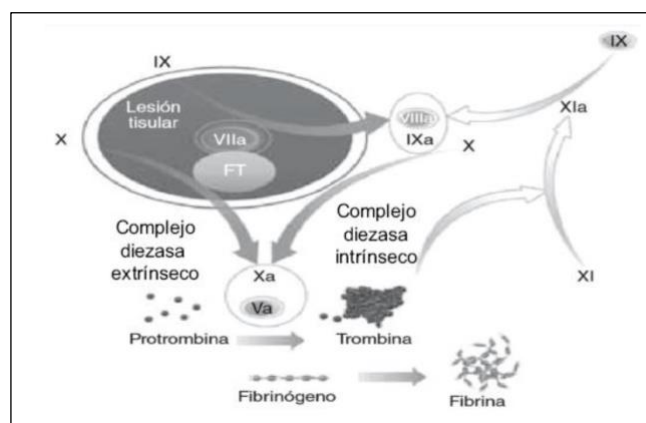
1.3.3. Fase de propagación

La activación del FVIII lo libera del FvW y con esto se inicia la fase de propagación (López-Arroyo et al., 2023).

En casos donde se presenta una lesión tisular, el factor IX activado se une al factor VIII activado (FVIIIa) sobre una capa lipídica rica en factor tisular formando el Complejo Tenasa intrínseca en la superficie plaquetaria (ver figura 3). Este tiene la capacidad de generar el 90% de la trombina ante un daño tisular con una eficiencia 50 veces mayor que el complejo formado por la tenasa extrínseca; el cual se caracteriza por alto contenido de FVIIa. La tenasa intrínseca activa al FX. El FXa y el FVa forman el complejo protrombinasa FXa/FVa que activa la protrombina (FII) y produce trombina (FIIa), esta va a convertir el fibrinógeno soluble en cadenas de fibrina insoluble (López-Arroyo et al., 2023; Sidonio et al., 2023).

Al darse la deficiencia de los FVIII o IX se manifiestan los eventos de sangrado clásicos de la hemofilia donde se da un desbalance entre proteínas pro- y anti-coagulantes, con una reducción de la generación de trombina en la superficie plaquetaria activada durante la fase de amplificación. Esto causa inestabilidad del coágulo que conlleva al desarrollo de las manifestaciones de sangrado. Los pacientes con hemofilia presentan una coagulopatía debido a la incapacidad de magnificar, controlar y mantener la generación de trombina (López-Arroyo et al., 2023; Sidonio et al., 2023).

Figura 3. Representación del proceso de coagulación.



En la figura se observan los complejos diezasa (tenasa) extrínseco formado por el factor tisular (FT) y el factor VII activado (FVIIa) que activan al factor X (FX) y al factor IX (FIX). Se presenta el complejo diezasa (tenasa) intrínseco formado por los FIXa y Factor VIIIa que van a activar al FX. Se muestra el complejo protrombinasa donde el FXa (Factor X activado) convierten la protrombina en trombina y esta transforma el fibrinógeno en fibrina. Tomado de García-Chávez & Majluf-Cruz (2013).

1.4. Clínica asociada

Las manifestaciones clínicas de la hemofilia A (HA) y la hemofilia B (HB) son iguales y dependen de la cantidad de factor deficiente circulante. El fenotipo característico de la hemofilia es la tendencia hemorrágica, su principal hallazgo clínico es el sangrado a nivel articular (hemartrosis) en los casos severos, el cual sin una terapia adecuada e integral puede llevar al paciente a desarrollar una artropatía hemofílica crónica, lo que representa la principal causa de morbilidad en esta población. (López-Arroyo et al., 2023; Srivastava et al., 2020).

La gravedad de las manifestaciones hemorrágicas en la hemofilia generalmente se correlaciona con el grado de deficiencia de factor de coagulación (Srivastava et al., 2020).

1.4.1. Principales signos de hemofilia

Debería sospecharse de hemofilia en personas que presentan historial de propensión a hematomas (moretones), hemorragias espontáneas particularmente en articulaciones, músculos y tejidos blandos, y hemorragias excesivas posteriores a traumatismos o cirugías. En niños muy pequeños es importante prestar atención a síntomas precoces de hemorragias articulares, ya que constituyen un indicador clave de hemofilia grave (Srivastava et al., 2020).

1.4.2. Hemofilia en recién nacidos y niños menores de 2 años

En estos pacientes se observa hemartrosis con una incidencia de 70-80%, esta se presenta principalmente a nivel de los tobillos, pero también en las rodillas y en menor cantidad en los codos (Doncel et al., 2023).

Si presentan hemofilia grave, es común observar hemorragias comunes intramusculares, en tejidos blandos, en mucosas, extracraneales y posterior a procedimientos médicos como venopunciones, circuncisión y tamizaje a nivel del talón (Doncel et al., 2023; Srivastava et al., 2020).

En niños no tratados se observan hematomas subcutáneos y sangrados articulares, muchos son referidos a los centros de salud por trauma no accidental. Con el crecimiento, los niños se vuelven más activos físicamente, lo que conlleva a un aumento en los sangrados espontáneos, de ahí la importancia de un tratamiento profiláctico en este grupo de edad (Srivastava et al., 2020).

1.4.3. Hemofilia en adultos

En adultos se da principalmente moretes, sangrados de mucosas, epistaxis, sangrados prolongados por traumas o cirugías. También se generan sangrados a nivel muscular con una incidencia del 70-80% y del SNC con menos del 5% de incidencia, siendo esta la primera causa de muerte. El uso de tratamiento profiláctico ha disminuido esta incidencia (Doncel et al., 2023).

Otras manifestaciones menos frecuentes que presentan estos pacientes menos frecuentes son hematuria, sangrado gastrointestinal, del tracto respiratorio y del sistema nervioso central. En pacientes con deficiencia severa el sangrado lleva a artropatía, defectos neurocognitivos e incluso la muerte. Las constantes lesiones por sangrados a nivel articular generan atrofia y se les conoce como artropatía hemofílica, la cual tiene un curso crónico e incapacitante (Doncel et al., 2023).

1.4.4. Clasificación clínica de la hemofilia:

1.4.4.1. Hemofilia grave.

En estos pacientes la concentración de factores VIII o IX es de <1 UI/dL (<0.01 UI/mL) o menos de 1%. Estos pacientes cursan con hemorragias en articulaciones, músculos y órganos internos espontáneas (Doncel et al., 2023; Srivastava et al., 2020).

1.4.4.2. Hemofilia moderada.

En estos pacientes la concentración de factores VIII o IX es de 1-5 UI/dL (0.01-0.05 UI/mL) o de 1% a 5%. Presentan hemorragias espontáneas ocasionales, hemorragias prolongadas por traumatismos o cirugías menores (Doncel et al., 2023; Srivastava et al., 2020).

1.4.4.3. Hemofilia leve.

En estos pacientes la concentración de factor VIII o IX es de 5-40 UI/dL (0.05-0.40 UI/mL) o de 5% a 40%. Estos podrían no necesariamente presentar hemorragias anormales o prolongadas hasta que experimenten un traumatismo grave o se sometan a cirugía. Las hemorragias espontáneas son poco comunes (Doncel et al., 2023; Srivastava et al., 2020).

En resumen las manifestaciones más comunes que se pueden observar en pacientes hemofílicos son (Konkle & Nakaya, 2023):

- Hemartrosis asociada a traumas menores o sin antecedente del mismo.
- Hematomas de músculo profundo
- Sangrados intracraneales en ausencia de traumas mayores.
- Cefalohematoma neonatal o sangrado intracraneal.
- Sangrados prolongados posterior a extracciones dentales, lesiones bucales o circuncisión.
- Sangrados prolongados o dilatados con dificultad en los procesos de sanación posterior a cirugías o traumas.
- Sangrado gastrointestinal inexplicable o hematuria.
- Sangrado menstrual fuerte, especialmente con el inicio de la menarquía.
- Sangrados nasales recurrentes y bilaterales.
- Moretes excesivos especialmente con hematomas subcutáneos.

En ambos tipos de hemofilia se presentan episodios de artropatía severa, atrofia muscular, pseudotumores que llevan a dolor crónico y movilidad reducida de articulaciones, las cuales pueden llegar a necesitar cirugías y artroplastia para mejorar la movilidad. Se ha visto que la HA y la HB difieren en las frecuencias de sangrado, en el consumo de factores y en las necesidades de cirugía ortopédica (Castaman & Matino, 2019).

1.4.5. Otros estudios importantes

Si se sospechara hemofilia, el médico debería obtener el historial de hemorragias del paciente y familiar, que pudieran haber presentado cualquiera de los hermanos o de los parientes maternos varones (primo, tío o abuelo) a fin de evaluar patrones hereditarios y de apoyar el diagnóstico (Srivastava et al., 2020).

Se utilizan múltiples herramientas médicas y radiológicas para valorar el estado de articulaciones y grupos musculares específicos. La medición de actividades y participación puede ser autorreportada por el paciente u observada por el médico (Srivastava et al., 2020).

1.5. Estudios moleculares en hemofilia

La hemofilia generalmente se hereda a través de un cromosoma X con una mutación en el gen FVIII o FIX. Ambos genes son proclives a nuevas mutaciones, y alrededor del 30% de todos los casos son resultado de variantes genéticas espontáneas. Hay estudios prospectivos que reportan que más del 50% de personas recién diagnosticadas con hemofilia grave no tiene un historial familiar previo de hemofilia (Srivastava et al., 2020).

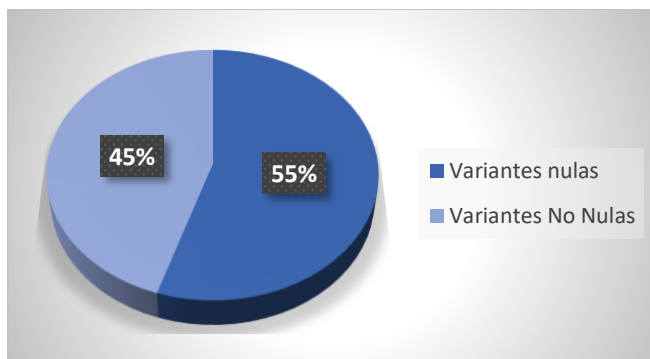
La valoración genética de la hemofilia es importante para definir la biología de la enfermedad, para establecer un diagnóstico en casos difíciles, para predecir el riesgo de la aparición de inhibidores, y para ofrecer diagnóstico prenatal en caso deseado. A todos los pacientes con hemofilia se le debe de realizar el análisis de genotipo (Srivastava et al., 2020).

Se han determinado 2 fenotipos, su prevalencia se ve representada en las figuras 4 y 5:

- **Nulo:** en este caso no se tiene síntesis del factor, se asocia a mayor severidad y a la formación de mayor cantidad de inhibidores. Corresponde a variantes asociadas a grandes deleciones, duplicaciones, inserciones, inversiones, mutaciones sin sentido, y variantes en sitios de empalme (“splicing”). Estas se relacionan mejor a la aparición de inhibidores y equivalen a un 55% de las variantes de hemofilia A y a un 40% de las variantes de hemofilia B (Doncel et al., 2023; Pezeshkpoor et al., 2022; Srivastava et al., 2020)
- **No nulo:** Corresponde a otras variantes como deleciones pequeñas, duplicaciones o inserciones donde se conserva el marco de lectura; y a mutaciones de cambio de

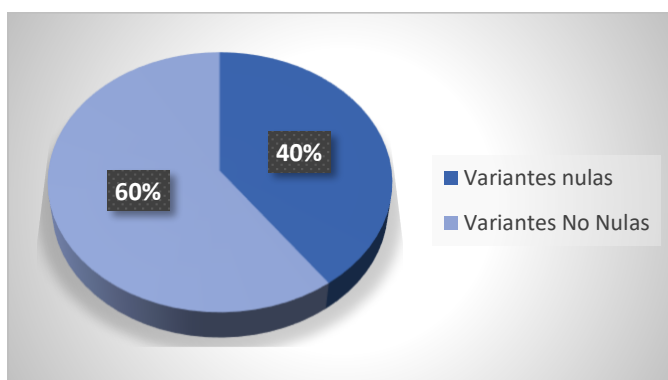
sentido. Equivalen al 45% de las variantes de hemofilia A y 60% de las variantes de hemofilia B (Doncel et al., 2023; Srivastava et al., 2020)

Figura 4. Prevalencia de las variantes nulas y no nulas de hemofilia A



Elaborado a partir de datos de Pezeshkpoor et al. (2022)

Figura 5. Prevalencia de las variantes nulas y no nulas de hemofilia B



Elaborado a partir de datos de Pezeshkpoor et al. (2022)

Actualmente el análisis completo del gen FVIII o FIX se realiza mediante pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de Sanger, o secuenciación de nueva generación (Srivastava et al., 2020). En pacientes con hemofilia A o B se han encontrado mutaciones puntuales, deleciones, inserciones y rearrreglos o inversiones, las diferencias entre ambas hemofilias se basan en la incidencia de estas alteraciones en cada tipo. Así mismo para ambos tipos de hemofilia existe una correlación entre el tipo de mutación y la actividad del factor asociado. Se ha visto que los pacientes con HA o HB que presenten mutaciones nulas podrían experimentar historial similar de sangrados (Castaman & Matino, 2019).

1.5.1. Alteraciones moleculares de la hemofilia A

El gen del Factor VIII se encuentra formado por dominios que interaccionan (A1, A2, B, A3, C1 y C2), mutaciones en alguno de estos dominios se consideran causa de Hemofilia A (Doncel et al., 2023).

En 1984 se publica la secuencia del gen del FVIII y con esto se permitió la identificación de una gran cantidad de mutaciones como causantes de la patología, las más comunes son la inversión del intrón 22 (inv22) y del intrón 1 (inv1), las cuales equivalen a un 50% de los casos. Se han reportado mutaciones puntuales, deleciones, inserciones, re-arreglos y mutaciones sin sentido (Doncel et al., 2023).

Las mutaciones sin sentido, la inv22 y deleciones se han asociado a hemofilia severa y a un mayor riesgo de tener inhibidores (alo-anticuerpos contra el factor VIII exógeno utilizado como tratamiento). (Doncel et al., 2023).

Entre las mutaciones más importantes se encuentran:

- *Inversión del intrón 22*

Es la mutación más frecuente, se da en el 45% de los casos. Este es el intrón más largo (40kb), esta inversión se produce por una recombinación homóloga entre la región intragénica (int22h1) y las regiones extragénicas (int22h2 y int22h3). Presenta una translocación de los exones 1 al 22, lo que produce la ausencia completa del FVIII (Castaman & Matino, 2019; Doncel et al., 2023).

- *Inversión del intrón 1:*

Representa alrededor del 2% de los casos (Castaman & Matino, 2019). Se da por una recombinación intracromosomal entre una secuencia de 1kb en el intrón 1 y su secuencia homóloga, ambas se encuentran separadas por 140kb en la dirección 5' del telómero. El resultado de esta es un gen de FVIII dividido que posee el promotor separado del exón 1, lo que lleva a hemofilia severa (Castaman & Matino, 2019; Doncel et al., 2023).

- *Deleciones o inserciones:*

Pueden ser grandes (de más de 50 pbs) alterando el marco de lectura, estas se presentan en el 3% de los casos; o pueden ser pequeñas (menos de 50 pbs) cambiando el marco de lectura y generando codones de finalización tempranos, estas se dan en el 16% de los casos de HA. Las grandes se asocian a hemofilia A severa (Castaman & Matino, 2019; Doncel et al., 2023).

- *Mutaciones puntuales con cambio de sentido:*

En estas se cambia un aminoácido por otro en la proteína, puede producir fenotipos con diferente severidad y se asocian al 15% de los casos (Castaman & Matino, 2019; Doncel et al., 2023).

- *Mutaciones sin sentido*

Estas producen un codón de terminación (TAA,TAG,TGA), dependiendo donde se produzca se observa un fenotipo más severo. Se asocian al 10% de los casos de pacientes con HA (Castaman & Matino, 2019; Doncel et al., 2023).

- *Mutaciones en el sitio de empalme*

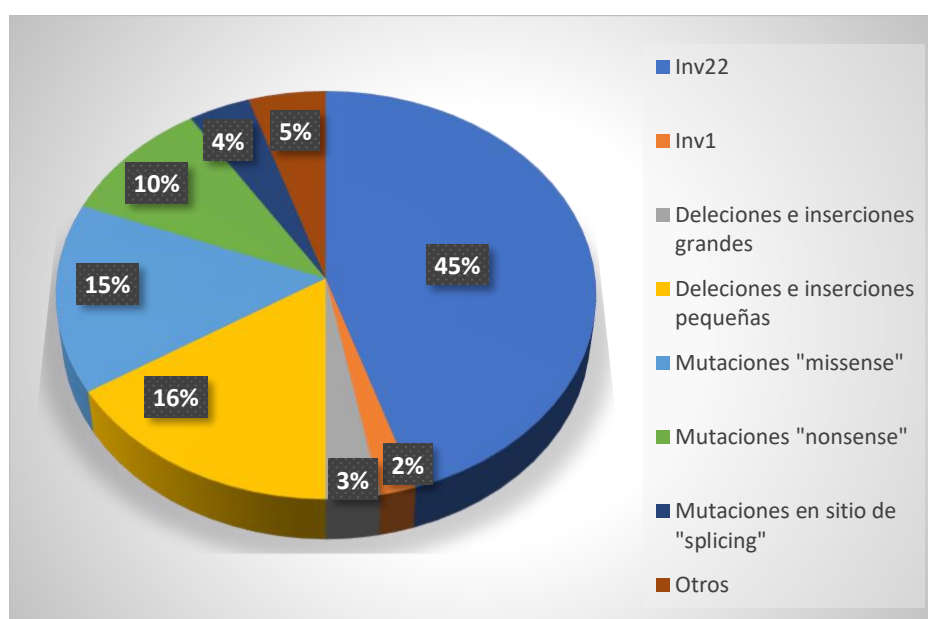
Estas equivalen al 3% de los casos (Castaman & Matino, 2019).

- *Otras alteraciones:*

Existen otras alteraciones genéticas de origen desconocido que se asocian a un 5% de los casos de Hemofilia A (Castaman & Matino, 2019).

La distribución de estas variantes se puede observar en la figura 6, donde se muestra que la mayor prevalencia para la HA se asocia a la variante dada por inversión del intrón 22.

Figura 6. Distribución de las mutaciones del gen *f8*, encontradas en pacientes con hemofilia A



"Nonsense": sin sentido, "Missense": con pérdida de sentido, "Splicing": empalme. Elaborado a partir de la información obtenida en Castaman & Matino (2019).

1.5.2. Alteraciones moleculares de la hemofilia B

La hemofilia B es un desorden genético que se produce como resultado de alrededor de 1000 variantes conocidas patogénicas en el gen del FIX. Se ha observado un predominio de mutaciones sin sentido y cambios en el marco de lectura. Los hombres son los que se ven principalmente afectados, sin embargo mujeres heterocigotas con inactivación al azar o no del cromosoma X podrían tener sangrados excesivos. Se han reportado mujeres homocigotas, hemicigotas o heterocigotas compuestas y variantes de FIX con mosaicismo germinal o somático (Miller, 2021).

En estos pacientes las mutaciones génicas sin sentido son categorizadas como nulas. En algunos casos el mecanismo de lectura de ribosomas podría restaurar la traducción alterada por las mutaciones y se podría encontrar una biosíntesis mínima de proteínas de longitud completa, modificando la clínica del paciente (Castaman & Matino, 2019). Este es un mecanismo natural que consiste en suprimir la terminación de la traducción producida por la introducción de un codón de terminación (UAA, UAG, UGA) en la secuencia del ARNm. El ribosoma pasa por este codón y continúa con la traducción hasta el próximo codón de terminación (Dąbrowski et al., 2015).

Es importante comprender que para que se dé la terminación efectiva de la traducción se requiere de un codón terminal en el sitio A del ribosoma, la interacción de 2 factores de liberación, eRF1 y eRF3, y una cercanía entre el ribosoma terminal y la señal de poliadenilación (poli(A)) de unión a proteína (PABP) unidas a 3'UTR (Dąbrowski et al., 2015).

El eRF1 reconoce los 3 codones de terminación, eRF3 une eRF1 y a guanosina trifosfato (GTP) formando un complejo; y eRF3 tiene actividad guanosina trifosfatasa (GTPasa) al interactuar con PABPs presentes en los 3'UTR del ARNm. La hidrólisis del GTP lleva al posicionamiento correcto de eRF1 en el centro de la peptidil transferasa ribosomal que cataliza la escisión del enlace peptidil-ARN de transferencia (ARNt) y libera la cadena polipeptídica del ribosoma. En este mecanismo la interacción de un ARNt casi afín que compite con el reconocimiento del codón STOP por el eRF1 inhibe el proceso de terminación y permite la adición de un aminoácido a la cadena polipeptídica, por lo que el ribosoma continúa con la traducción hasta el siguiente codón de terminación (Dąbrowski et al., 2015).

En pacientes con HB hay una mayor prevalencia de mutaciones con menor severidad, por lo que se asocia a un fenotipo de sangrado más leve que el de la HA. Esto se ve ejemplificado en un estudio realizado en Estados Unidos del 2012 al 2018

donde se determinó que de 27 748 hemofílicos tratados por el Centro de Tratamiento de Hemofilia de ese país; el 48,1% de los que tenían HA tienen cuadro severo, mientras que para los pacientes con HB es el 28,7% (Castaman & Matino, 2019, Soucie et al., 2020). Esto podría también explicar la menor prevalencia de inhibidores que se presentan en pacientes con HB versus HA. La presencia de estos se asocia principalmente con un codón de finalización o una delección parcial o total del gen del FIX, además de que este factor posee una menor cantidad de epítomos por su menor tamaño (Castaman & Matino, 2019).

En los pacientes con hemofilia se presentan alteraciones del gen de factor IX como:

- *Mutaciones con pérdida de sentido o sin sentido*

Ocurren en el 58% de los casos y se asocian a la inclusión de un codón de terminación (Castaman & Matino, 2019).

- *Mutaciones con cambio de sentido*

Se presentan en el 18% de los casos de HB y se asocian al cambio de un aminoácido por otro (Castaman & Matino, 2019).

- *Delecciones pequeñas*

Se presentan en el 10% de los casos de HB (Castaman & Matino, 2019).

- *Mutaciones en el sitio de empalme:*

Se asocian al 7 % de los casos de Hemofilia B (Castaman & Matino, 2019).

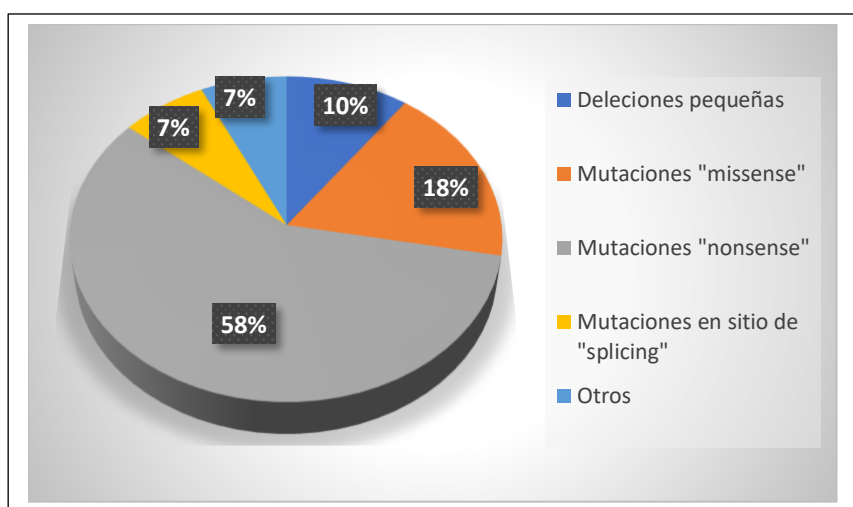
- *Otras alteraciones:*

El porcentaje restante se asocia a delecciones mayores y mutaciones en el promotor del gen del FIX, que se dan con menor incidencia en los pacientes con hemofilia B (Castaman & Matino, 2019).

La distribución de estas variantes se puede observar en la figura 7, donde se muestra que la mayor prevalencia para la hemofilia B se asocia a la variante dada por mutaciones sin sentido.

Es importante definir algunas de las principales variantes del FIX ya que estas han sido muy estudiadas para su uso en estudios de terapia génica en hemofilia.

Figura 7. Distribución de las mutaciones del gen *f9*, encontradas en pacientes con hemofilia B.



“Nonsense”: Sin sentido, “Missense”: Con pérdida de sentido. “Splicing”: Empalme. Elaborado a partir de la información obtenida en Castaman & Matino (2019).

1.5.3. Variantes del factor IX

Las variantes del factor IX pueden ser consideradas patogénicas si se asocian a causas de enfermedad o pueden no afectar la actividad del FIX y considerarse benignas. El 76,7% de las variantes que causan patología se asocian a mutaciones puntuales, seguidas de deleciones con una incidencia de 17,2% (Miller, 2021).

1.5.3.1. Factor IX Leyden.

En algunos de los casos graves de Hemofilia B se encuentra la variante Leyden, la cual se ha asociado a alteraciones en los sitios del promotor proximal del gen de factor IX, se caracteriza por una hemostasia alterada al nacimiento que empeora en la pubertad, estos pacientes sufren una recuperación progresiva de la expresión del FIX hasta su normalización en la adultez, este efecto ha sido asociado a niveles hormonales en etapas posteriores a la pubertad (Castaman & Matino, 2019).

Esta variante se da a nivel de la región promotor del FIX y esta cura aparente se asoció a los receptores de andrógenos, pero se ha visto aumentos del factor en pacientes previo a la pubertad y en mujeres heterocigotas; por lo que se sugiere que no depende del sexo (Miller, 2021).

1.5.3.2. Variante Padua.

La variante R338L conocida como FIX Padua fue identificada inicialmente como un caso raro de hemofilia ligado a X que está asociado a un aumento en la actividad

específica del factor IX comparado con el silvestre (“wild type”, WT). Esta variante se produce por una mutación puntual en la que se intercambia una arginina por una leucina en la posición 338 de la proteína. Esta variante se está estudiando para su uso en terapia génica ya que al tener mayor actividad de factor IX se obtiene una eficacia de 5 a 10 veces mayor que con la WT. La variante Padua permite el uso de una menor cantidad de dosis del vector y con esto mayor seguridad para el paciente (Simioni et al., 2009; Srivastava et al., 2020; VandenDriessche & Chuah, 2018).

Uno de los estudios sobre la importancia de esta variante y su uso potencial en terapia génica la realizaron Samelson-Jones et al. (2021), quienes publicaron un estudio sobre las variantes del FIX R338 que podrían ocurrir de forma espontánea. Ellos realizaron la modificación de plásmidos de ADN complementario (ADNc) con sustitución de un aminoácido en la posición R338 del factor IX. Estos se introdujeron en distintas líneas de cultivo celular humanas y se cuantificó el factor, así mismo se analizaron las variantes de este aminoácido en 767 pacientes con trombofilia. Entre los puntos que concluyeron, indican que la mayoría de las variantes en R338 incrementan la actividad esperada del factor, además demostraron para múltiples líneas celulares que la variante humana del FIX R388L es la que tenía una mayor actividad. Ellos respaldan la hipótesis de que el R388 del FIX tipo salvaje limitaría la actividad y demuestran que otras variantes en este punto pueden llevar a aumentos de actividad de factor y estos aumentos pueden conllevar a una amplificación de la formación de trombina (Samelson-Jones et al., 2021a).

1.5.3.3. Otras variantes importantes.

El estudio de nuevas variantes hiperactivas es importante para las investigaciones en hemofilia B. Una de las que se está estudiando es el FIX Shangai (R338Q) que se ha encontrado en pacientes con trombosis de venas profundas. (Samelson-Jones et al., 2021a).

Los estudios genéticos en pacientes con hemofilia permitirían en una edad temprana predecir mejor el patrón de sangrado y un mejor manejo clínico (Doncel et al., 2023). La valoración genética de la hemofilia es importante para definir la biología de la enfermedad, para establecer diagnósticos en casos difíciles, para identificar mujeres portadoras y para proporcionar diagnóstico prenatal, si fuera deseado (Srivastava et al., 2020).

1.6. Mujeres con hemofilia

La hemofilia generalmente solo afecta a varones que heredan un cromosoma X materno afectado. Las mujeres con hemofilia (FVIII o FIX <40 IU/dL) son poco comunes. En estos casos ambos cromosomas X están afectados, o uno está afectado y el otro está inactivo. A una mujer con un cromosoma X afectado se le denomina portadora de la hemofilia (Srivastava et al., 2020).

1.6.1. Mujeres heterocigotas o portadoras

Estas presentan un amplio rango de niveles de FIX debido al fenómeno de inactivación del cromosoma X, donde se inactiva al azar un cromosoma X en cada célula somática de una mujer. Con esto se iguala la dosis de cromosomas X del hombre y la mujer. Este proceso se da al azar de forma temprana en el desarrollo y resulta en una población clonal de células con un cromosoma X materno o paterno inactivo. Hay portadoras que pueden tener niveles de FIX completamente normales, sin embargo, el 30% de las mujeres heterocigotas presentan actividad de FIX menor al 40% y se encuentran en riesgo de sangrar, con síntomas usualmente de hemofilia B media. De ahí la importancia de los estudios moleculares en esta población a través de la secuenciación (Miller, 2021; Konkle & Nakaya, 2023).

Dado que los niveles basales de factor en las portadoras podrían ser normales o presentar una reducción variable, los síntomas y complicaciones de la hemofilia son menos comunes en mujeres, y estos a menudo son pasados por alto y no diagnosticados; las hemorragias articulares en portadoras con frecuencia no son reconocidas, generando articulaciones deficientes debido a problemas articulares no diagnosticados. Son necesarios un mejor diagnóstico y tratamiento de los problemas hemorrágicos en ellas (Srivastava et al., 2020).

Otros problemas hemorrágicos incluyen complicaciones musculoesqueléticas, flujo menstrual prolongado o abundante y otras secuelas de la hemofilia que se observan en varones (Miller, 2021).

Es importante incluir a un ginecólogo en el equipo de atención integral de estas pacientes, ya que requieren de atención especializada específica para aspectos reproductivos, asesoría y pruebas genéticas, planificación y diagnóstico prenatal, pruebas a recién nacidos, y asesoría psicosocial (Srivastava et al., 2020).

En mujeres con bajos niveles de FIX y FVIII, la FMH recomienda que se realice el apoyo diagnóstico con pruebas moleculares (Srivastava et al., 2020).

1.6.2. Mujeres con hemofilia

Las mujeres con hemofilia son poco comunes, incluyen homocigosis donde tienen dos copias de la misma variante patológica; heterocigosis compuesto donde la paciente posee dos variantes diferentes patológicas en trans; y la heterocigosis donde solamente un alelo tiene la variante (Miller, 2021).

En estas pacientes es importante el historial familiar de sangrados, si no hay historia familiar se debe iniciar análisis de factores vitamina K dependientes, factor IX y VIII de ambos padres, estudio de inhibidores y secuenciación (Miller, 2021).

Actualmente se está intentando cambiar el dogma de que únicamente los hombres sufren de hemofilia, es importante nuevos estudios en mujeres que demuestren la importancia del diagnóstico certero en este grupo con el fin de correlacionar las manifestaciones clínicas que padecen y brindar un mejor tratamiento a estas pacientes.

1.7. Inhibidores de la coagulación

En pacientes con Hemofilia A o B que al no producir uno de sus factores de la coagulación reciben terapia con concentrados del factor deficiente, el sistema inmune produce una reacción de defensa contra estos, a través de la producción de aloanticuerpos neutralizantes llamados inhibidores. La producción de estos inhibidores por parte del sistema inmune del paciente con hemofilia causa que la terapia de reemplazo utilizada se vuelva ineficiente con lo que no se pueden prevenir los eventos de sangrado. Estos son más comunes en personas con hemofilia A que con hemofilia B (Carcao & Goudeman, 2018).

La incidencia de aloanticuerpos contra FVIII y FIX es de 25% a 35% y de 3% a 5% en pacientes con HA y HB severa respectivamente (Marchesini et al., 2021). Estudios en hemofílicos A muestran que estos anticuerpos son de tipo inmunoglobulina G (IgG) de las subclases IgG1 e IgG4 y que estos se unen a epítomos funcionales que por lo general se encuentran en los dominios A2, C1 y C2 del factor proteico. Los anticuerpos IgG4 predominan en pacientes con inhibidores de título alto, mientras que los anticuerpos IgG1 son más abundantes en pacientes con inhibidores de título bajo. La determinación de estos anticuerpos implica su cuantificación en unidades Bethesda (UB). Esta unidad es la concentración de IgG (IgG4 e IgG1 policlonales) capaz de inhibir

el 50% del factor en una mezcla del plasma del paciente y un pool de plasma normal (Carcao & Goudeman, 2018; Doncel et al., 2023).

Algunos pacientes pueden presentar anticuerpos no neutralizantes, algunos de tipo IgG pero que no afectan sitios importantes en la actividad del factor, por lo que no inhiben o neutralizan su función coagulante. Algunos otros, principalmente aquellos con hemofilia B severa presentan reacciones anafilácticas asociadas a anticuerpos de otro tipo de inmunoglobulina, la IgE (Carcao & Goudeman, 2018).

La presencia de estos inhibidores se ha asociado a un incremento en la mortalidad y la morbilidad debido a que el paciente no responde a terapia estándar, por lo que el tratamiento es inefectivo (Doncel et al., 2023).

Hay dos tipos de inhibidores: los de baja respuesta, donde sus niveles se mantienen menores o iguales a 5 unidades Bethesda por mililitro (UB/mL) y mayores a 0,6 UB/mL; y los inhibidores de alta respuesta que se presentan cuando los pacientes tienen niveles mayores o iguales a 5 UB/mL (Doncel et al., 2023).

En pacientes tratados con concentrados de FVIII que fueron expuestos a estos por 150 días, se ha observado una incidencia de 2 a 5 por cada 1000 individuos tratados. Mientras que en aquellos con 1 a 50 días de exposición a los concentrados de FVIII, se observó una incidencia de 25,9% (Doncel et al., 2023).

Se han asociado diversos factores al desarrollo de aloanticuerpos inhibidores como mutaciones genéticas e historia familiar. Hay estudios que muestran una mayor incidencia en personas no caucásicas; se han reportado hasta 4,9 veces mayor incidencia en afrodescendientes, seguido por latinos. En otros reportes se ha visto que polimorfismos o tipos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) como CMH-DR15 y CMH-DQ6 se asocian al doble de riesgo de presentar inhibidores que otros tipos de CMH. La severidad de la hemofilia y la presencia de polimorfismos genéticos en la interleucina 10 (IL10) y en el factor de necrosis tumoral (TNF) también se han asociado a mayor incidencia en la producción de inhibidores (Carcao & Goudeman, 2018; Doncel et al., 2023).

Incluso el tratamiento que recibe el paciente se ha asociado a inhibidores, estudios reflejan que el factor recombinante tiene una mayor relación con la aparición de estos que el factor derivado de plasma. La frecuencia del tratamiento, asociada a una mayor cantidad de eventos de sangrado, así como la edad de iniciación del mismo son factores

que influyen en la producción de estos anticuerpos (Carcao & Goudeman, 2018; Doncel et al., 2023).

Uno de los principales factores de riesgo asociados a la producción de inhibidores son las alteraciones moleculares. En el 2012 se publicó un estudio que correlacionó la presencia de inhibidores con las mutaciones genéticas a través de la recopilación de información bibliográfica. En esta recopilación se obtuvo información de 5383 pacientes con hemofilia A severa, todos con una exposición previa de 50 días y a los que se correlacionó la presencia de inhibidores con las mutaciones presentadas. Los investigadores demostraron que las mutaciones donde se presenta una ausencia completa de la proteína, se asocian a un mayor riesgo de presentar inhibidores. Por su parte, las mutaciones que resultan en la producción de cierta cantidad de proteína se asocian a un menor riesgo de presentar estos aloanticuerpos. Ellos indican que deleciones largas, mutaciones sin sentido e inversiones de los intrones 1 y 22 inducen una deficiencia completa de la producción de cualquier polipéptido de FVIII, lo que demuestra porqué los pacientes con estas mutaciones poseen un riesgo incrementado de producir inhibidores (Gouw et al., 2012). En esta investigación los autores reportaron que se observó una mayor incidencia de inhibidores en pacientes con grandes deleciones que con inversión del 22, lo que correlaciona con estudios donde se reporta que algunos pacientes con esta inversión, expresan su FVIII como un polipéptido de 2 cadenas. Este estudio también indica que en pacientes con mutaciones sin sentido o con pérdida de sentido hay un mayor riesgo si la mutación se asocia a los dominios de la cadena ligera (dominios A1, A2 o B) de la proteína. Además observaron que las deleciones e inserciones pequeñas que incluyen la señal de poli adenilación conllevan un menor riesgo de inhibidores (Gouw et al., 2012). Es de gran importancia realizar estudios genéticos para predecir el riesgo de aparición de inhibidores en los hemofílicos (Doncel et al., 2023).

Para el FVIII, se ha visto que las deleciones largas, mutaciones sin sentido e inversión del intrón 22 presentan una alta prevalencia de inhibidores, 7 a 10 veces mayor en relación con los que presentan otras mutaciones. (Doncel et al., 2023).

Los pacientes que presentan inversión del intrón 22 poseen un ARNm del gen *F8* truncado, el cual corresponde a los exones del 1 al 22 del gen *F8*. Una de las hipótesis en estudio indica que la región del dominio C1 del FVIII codificada por el ARNm que abarca el sitio de "splicing" del exón 22 al 23 es considerada como la única región extraña del FVIII terapéutico, por lo que se cree que actuaría como un neo-epítipo promiscuo y altamente inmunogénico en los pacientes que desarrollan inhibidores. En

aquellos que no los desarrollan se considera que la producción endógena de proteínas parciales de FVIII podrían conferir auto-tolerancia, disminuyendo la inmunogenicidad de la terapia de reemplazo en estos pacientes (Gunasekera et al., 2023).

En el caso de los inhibidores de FIX se han asociado principalmente a deleciones, cambios en el marco de lectura, mutaciones sin sentido que llevan a la ausencia de la proteína o a la producción truncada de esta y se han reportado solamente una variante con pérdida de sentido y 2 variantes en la zona de “splicing” (Srivastava et al., 2020).

Actualmente el uso de productos como el polietilenglicol (PEG) o los fragmentos cristalizables (Fc) para los productos de vida media prolongada podrían contribuir a proteger al FVIII y FIX recombinante del sistema inmunológico, sin embargo, se necesitan más estudios en este tema (Carcao & Goudeman, 2018).

El uso de PEG permite aumentar el peso de la molécula, reducir la filtración glomerular de esta, la degradación proteolítica y el aclaramiento por receptores específicos, resultando en la prolongación de la vida media de la proteína. Sin embargo, aún es necesario realizar estudios de toxicidad renal y de formación de anticuerpos anti-PEG. Actualmente su uso está restringido por la EMA en pacientes mayores de 12 años (Carcao & Goudeman, 2018).

El uso de fragmentos cristalizables (Fc) permite su unión al receptor Fc neonatal (FcRn) que se ubica en las células endoteliales y facilita el reciclaje de la proteína a la superficie celular para ser liberada a la circulación, incrementando la vida media plasmática de la proteína y prolongando su actividad terapéutica (Carcao & Goudeman, 2018).

La obtención de los factores a partir de líneas celulares humanas contribuiría a obtener más fielmente un FVIII humano natural, resultando en una menor formación de inhibidores (Carcao & Goudeman, 2018).

1.8. Hemofilia adquirida

Existen situaciones donde se pueden presentar autoanticuerpos (inhibidores) contra el FVIII propio en personas que no tienen hemofilia. A este suceso se le llama hemofilia adquirida. Estas personas (que no nacieron con hemofilia) tienden a ser de edad avanzada (mayores de 60 años) y pueden presentar anticuerpos que atacan y destruyen el FVIII debido a un problema en su sistema inmunológico (Carcao & Goudeman, 2018). Se da por la producción de IgG₁ e IgG₄ policlonales y cadenas ligeras kappa dirigidas

contra regiones de los dominios A1, A2 y C2 del FVIII. La pérdida de la tolerancia a este factor aún no está clara, pero se considera que factores genéticos y ambientales podrían estar relacionados en el desarrollo de los auto anticuerpos (García-Chávez & Majluf-Cruz, 2019; Viesca-Contreras et al., 2017).

La incidencia se estima de 1,3 a 1,5 casos por millón de personas al año y se estima de que hay mucho subregistro de esta enfermedad (García-Chávez & Majluf-Cruz, 2019).

Los auto anticuerpos inhiben la función del factor VIII o aumentan su depuración, afectando la hemostasia al alterar la generación de trombina y fibrina. En casos donde el auto anticuerpo se produce contra el dominio C2 se ve afectada la unión al FvW y con ello se acorta la vida media del FVIII en circulación (García-Chávez & Majluf-Cruz, 2019).

Estos autoanticuerpos pueden aparecer sin exposición a un FVIII exógeno. El 52% de los casos de hemofilia adquirida no se asocian a una enfermedad concomitante, sin embargo el 48% restante se ha asociado a medicamentos u otras patologías (García-Chávez & Majluf-Cruz, 2019):

- Enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, pénfigo, enfermedad inflamatoria intestinal crónica, asma o reacciones alérgicas graves (García-Chávez & Majluf-Cruz, 2019).
- Enfermedades linfoproliferativas y tumores sólidos, como linfomas, leucemias, macroglobulinemia, cáncer de próstata y cáncer de pulmón (García-Chávez & Majluf-Cruz, 2019).
- Se ha asociado a mujeres primíparas durante los primeros tres meses de puerperio. En muchos de estos casos desaparece el cuadro por depuración del anticuerpo. Puede haber transferencia intrauterina con normalización en 6 semanas (García-Chávez & Majluf-Cruz, 2019).

La Hemofilia adquirida se presenta usualmente de forma abrupta, grave y agresiva en pacientes previamente sanos, se caracteriza por equimosis extensas, hemorragias en mucosas o hemorragias internas en personas sin historial de sangrado. En el menor de los casos la patología de fondo se agrava con el cuadro de sangrado (García-Chávez & Majluf-Cruz, 2019).

1.9. Diagnóstico de laboratorio

Para el diagnóstico de laboratorio es importante la determinación primero de los tiempos de protombina (TP), tiempos de tromboplastina parcial activado (TTPa) y recuento plaquetario. Seguidos de pruebas específicas de determinación de factores (Srivastava et al., 2020).

1.9.1. Toma y procesamiento de la muestra

1.9.1.1. Condiciones del paciente

Es importante tomar en cuenta la condición del paciente, los ejercicios vigorosos, estrés, embarazo y la inflamación podrían elevar los niveles de factores (Srivastava et al., 2020).

1.9.1.2. Toma de muestra

La recomendación de la FMH es tomar la muestra en citrato trisódico dihidratado acuoso al 3,2%, las muestras deben ser centrifugadas 1700 gravedades (g) por 10 minutos a temperatura ambiente y debe analizarse 4 horas (h) posterior a la recolección (Srivastava et al., 2020).

1.9.1.3. Almacenamiento de la muestra

Las guías de la FMH indican que la muestra de plasma sin plaquetas puede mantenerse a temperatura ambiente (18-25° Celsius (°C)) por 4 h antes de ser procesada o debe ser almacenada a -70 °C hasta por 6 meses. Almacenamientos a -20 °C son inadecuados. Almacenamiento de 2 a 8°C podría afectar la actividad del FVIII. El proceso de descongelamiento rápido debe realizarse a 37°C en baño de agua por 4 a 5 minutos para evitar crioprecipitación (Srivastava et al., 2020).

1.9.2. Pruebas iniciales

En pacientes con sospecha de hemofilia es necesario realizar la determinación de TP, el cual va a estar normal, TTPa usualmente prolongado y recuento plaquetario normal. Es importante notar que un TTPa prolongado no es específico de hemofilia y un TP prolongado es indicativo de otro tipo de patología (Tiede et al., 2020). La FMH recomienda que para la prueba de TTPa se utilice un reactivo con factor tisular no humano y que un resultado de TTPa normal no descarta la presencia de hemofilia A o B leve (Srivastava et al., 2020). Es importante tomar en cuenta que las mediciones iniciales de la coagulación como el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) y

el tiempo de protrombina (TP), solo dan información sobre la formación del coágulo durante la fase de iniciación, además se debe tomar en cuenta que el punto final de estas pruebas ocurre tras la formación de únicamente el 5% del total de trombina. Por lo que no representan el proceso de formación del coágulo completo (Sidonio et al., 2023).

1.9.3. Test de mezclas

Los estudios de mezclas se realizan con el fin de distinguir entre una deficiencia de factor y la presencia de inhibidores. Tienen el propósito de determinar la causa de la prolongación de TP o TTPa. Estos se realizan al adicionar iguales cantidades de plasma del paciente y de un pool normal, lo cual se incuba por 2h a 37°C. Posterior a la incubación esta se somete nuevamente a la prueba alterada. Si se da una corrección del tiempo prolongado en la mezcla se debe sospechar de una deficiencia del factor; si se mantiene elevado podría haber una presencia de inhibidores (Manta & Khakhlari, 2023; Srivastava et al., 2020).

Estas pruebas son poco estandarizadas y no pueden excluir o establecer un diagnóstico de hemofilia, siempre es necesario que se realice una mayor investigación realizando la determinación de factores (Tiede et al., 2020).

1.9.4. Determinación de deficiencia de factores

Es importante realizar la medición de la actividad funcional del factor VIII por técnicas coagulométricas y cromogénicas (Sueldo et al., 2020). En hemofílicos A leves con confirmación genética se ha visto que por los métodos coagulométricos se obtienen actividades menores que por los métodos cromogénicos. En otros casos esto puede ocurrir a la inversa, es por ello que para confirmar hemofílicos leves se debe determinar la deficiencia del factor con más de un ensayo. Es importante que en el proceso de diagnóstico se realice la determinación por ambas metodologías (Srivastava et al., 2020; Sueldo et al., 2020).

Hay discusión respecto a cuál es el ensayo que refleja mejor la gravedad clínica de los pacientes, las distintas guías internacionales sugieren utilizar ambos ensayos en los centros de hemofilia, ya que como se ha mencionado hay pacientes con determinadas mutaciones que muestran discrepancias entre ambos métodos (Sueldo et al., 2020).

1.9.5. Pruebas coagulométricas de un paso

En el caso de los métodos coagulométricos (FVIII:Coag), estos se basan en la medición del tiempo de formación del coágulo a través de un sensor que mide los cambios en la luz. En pacientes hemofílicos el TTPa se va a prolongar en pacientes debido a la deficiencia del factor. Esta prueba consiste en mezclar la muestra con un plasma deficiente de factor y hacerlo reaccionar con un reactivo que contiene un activador como la kaolina o sílica y fosfolípidos. La adición del cloruro de calcio promueve la formación de fibrina y se mide el tiempo de formación del coágulo (Doncel et al., 2023; Sueldo et al., 2020).

En casos donde se presenta la variante de FIX Padua se han obtenido 1,6 veces mayores resultados por esta metodología que por la cromogénica (Srivastava et al., 2020).

Los ensayos coagulométricos se ven influenciados por la presencia de anticuerpos como el anticoagulante lúpico o por muestras con heparina (López-Santiago, 2016).

1.9.6. Métodos cromogénicos

Los métodos cromogénicos fueron creados en 1995, miden el resultado por fotometría a través de un complejo coloreado. En el caso de la determinación de FVIII cromogénico (FVIII:C), el ensayo se basa en que el FVIII (cofactor) acelera la activación del FX en Factor X activado (FXa) en la presencia de FIX (enzima). Esto se evalúa por medio de la hidrólisis del sustrato cromogénico p-nitroanilina específica para FXa, que al ser liberada produce un producto coloreado amarillo. La concentración del FXa es proporcional a la cantidad de FVIII presente en la muestra. Este se determina midiendo la absorbancia del producto a 405nm. Para su determinación se utiliza un exceso de los otros factores (Sueldo et al., 2020).

Este método tiene menor variabilidad en el diagnóstico de personas con HA leve. Sin embargo, tanto el método coagulométrico como el cromogénico presentan mayor variación cuando los niveles de FVIII:C son menores a 5 UI/dL (Sueldo et al., 2020).

El ensayo cromogénico debe utilizarse para el monitoreo pacientes que se encuentran utilizando terapias de no reemplazo como el emicizumab. Esta técnica no presenta las dificultades asociadas a la detección del coágulo en los distintos sistemas de medición y no se ve afectada por heparina, inhibidores directos de trombina o por la presencia de anticoagulante lúpico en la muestra del paciente (Sueldo et al., 2020).

La metodología cromogénica presenta una menor variabilidad de diferentes ensayos en el mercado en comparación con la coagulométrica; sin embargo este sí se ve afectado por la presencia de inhibidores de FXa (Sueldo et al., 2020).

1.9.7. Alteraciones moleculares y su influencia en las pruebas diagnósticas

En pacientes con hemofilia A se pueden presentar discrepancias entre los resultados obtenidos por las técnicas coagulométricas y cromogénicas, obteniendo resultados menores para la cromogénica. Se cree que algunas mutaciones podrían estar asociadas a estas discrepancias produciendo un cambio en el fenotipo del paciente. En un ensayo de validación del método por Sueldo et al., se procesaron 154 muestras de las que 4 tuvieron discrepancias importantes, cambiando la categorización inicial de la severidad de la enfermedad. Ellos determinaron la actividad del FVIII con ambas metodologías, los resultados obtenidos mostraron que la determinación por el método cromogénico para estos 4 pacientes daba resultados menores que con el método coagulométrico y que estos correlacionaban mejor con su fenotipo de sangrado (Sueldo et al., 2020).

Algunas mutaciones asociadas a discrepancias en los resultados obtenidos con ambas técnicas son:

1.9.7.1. Mutaciones de cambio de sentido

La hemofilia A es una enfermedad que se presenta asociada a variantes en el dominio de interface A1-A2-A3 que causan un FVIIIa inestable. La relación obtenida de los resultados de actividad de FVIII por ambas metodologías (FVIII:Coag/FVIII:C) muestra resultados $>1,5-2,0$, por lo que el fenotipo es mejor detectado por el método cromogénico (Doncel et al., 2023).

1.9.7.2. Otras mutaciones en los sitios de corte por trombina o sitios de unión al FIXa

La relación FVIII:Coag/FVIII:C al determinar la actividad de FVIII por ambas metodologías es $<0,5$. Por lo que el método coagulométrico es más sensible a la detección de estas mutaciones debido a que utiliza concentraciones fisiológicas de FIX y trombina (Doncel et al., 2023).

1.9.8. Prueba de Bethesda

Para la medición de los inhibidores del FVIII en pacientes tratados con este factor exógeno, la cuantificación de los anticuerpos se realiza utilizando la prueba de Bethesda

o su modificación Bethesda-Nijmegen que posee mayor sensibilidad y especificidad (Doncel et al., 2023; López-Arroyo et al., 2023). Esta modificación inactiva al factor VIII o IX en la muestra para determinar la presencia del inhibidor, si la concentración de este es de 5 o más UI/dL (Srivastava et al., 2020).

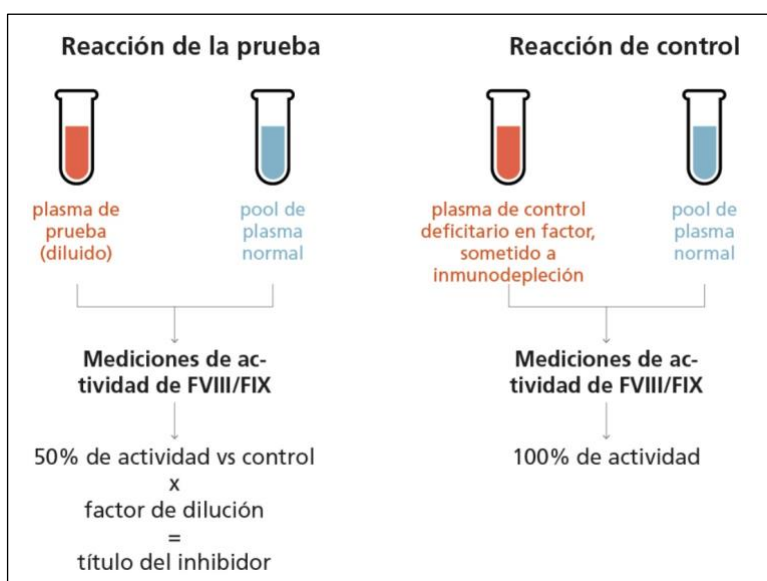
La prueba consiste en mezclar volúmenes iguales de plasma normal y la muestra del paciente, incubar por 2 horas a 37°C (para inhibidores de FVIII) o procesar de inmediato (para inhibidores de FIX), y medir la actividad residual del factor en la mezcla (ver figura 8). Se debe utilizar como control un plasma libre de factor VIII o IX y se pueden realizar diluciones seriadas del plasma del paciente (López-Arroyo et al., 2023).

Posteriormente se determina la actividad del FVIII. Una unidad Bethesda del inhibidor (BU) es definido como el título del inhibidor que neutraliza el 50% de actividad del factor en un mililitro de plasma (Doncel et al., 2023; López-Arroyo et al., 2023). Si después de la incubación el factor residual equivale al 100% del nivel en la muestra control, entonces el nivel de inhibidor es cero. Si el FVIII residual equivale al 50% o al 25% del control, el nivel de inhibidor es de 1 o 2 UB, respectivamente. En caso de resultado sea menor al 25%, el plasma del paciente se somete a diversos grados de dilución (López-Arroyo et al., 2023). Títulos mayores de 0,6 UB/mL son clínicamente importantes (Srivastava et al., 2020).

Para la determinación de inhibidores anti FIX en una mezcla que contenga >5 UI/dL de actividad del FIX, la FMH recomienda que, antes de la prueba la muestra se caliente a 56°C durante 30 minutos y se centrifugue a temperatura ambiente por un mínimo de 1700 g durante por lo menos 5 minutos (Srivastava et al., 2020).

El monitoreo posterior a infusiones de FVIII o FIX podrían variar dependiendo de si se utiliza un concentrado u otro. La confirmación de la presencia de inhibidores requiere del uso de un ensayo de inhibidor específico. Los inhibidores funcionales de la hemostasia más comunes son los anticoagulantes lúpicos, los cuales no están dirigidos contra factores de la coagulación específicos y cuya presencia debe excluirse previo a la determinación de inhibidores específicos (Srivastava et al., 2020).

FIGURA 8. Esquematización de la determinación de inhibidores por el método Bethesda.



Tomado de Physicians World Europe GmbH (2024).

1.9.9. Otros aspectos importantes

Los estudios moleculares, el diagnóstico y el tratamiento de la hemofilia requieren de acceso a instalaciones, experiencia y recursos adecuados para realizar con exactitud ensayos de factor y otras pruebas de coagulación. Los ensayos y pruebas de detección de inhibidores son vitales para que cualquier programa integral de tratamiento de la hemofilia pueda ofrecer tratamiento médico y terapias enfocada en la reducción de estos inhibidores y la inducción de tolerancia a ellos; sin embargo, la mayoría de los centros del mundo no cuenta con la capacidad para realizar estas pruebas (Srivastava et al., 2020).

1.10. Tratamiento

1.10.1. Primeros tratamientos utilizados

En los 1900 la esperanza de vida de estos pacientes era de 13 años, estos recibían transfusiones de familiares como tratamiento. Entre los tratamientos utilizados se encuentra la cal, gelatina, oxígeno, peróxido de hidrógeno y otros. En 1930 se estudian los venenos de serpiente como tratamiento para la hemofilia, ya que algunos de ellos diluidos inducían la coagulación de la sangre. A partir de 1926 se utiliza plasma y con él se obtienen buenas respuestas en pacientes con sangrados musculares y articulares, se utilizaba con el fin de reemplazar los factores de la coagulación faltantes. En 1937 se describe por primera vez la presencia de una inmunoglobulina anti-hemofilia por parte

de los doctores Patek y Taylor que disminuía los tiempos de coagulación. Aun así, la esperanza de vida en 1960 era de menos de 20 años (NBDF, 2023).

En 1965 se observa como los crioprecipitados contenían factor VIII en mayor concentración, el cual podía ser transfundido para controlar sangrados severos. En los 1970s aparecen los liofilizados de factor VIII y IX que podían ser almacenados en casa, eran fáciles de reconstituir y se inyectaban vía intravenosa (IV), permitiendo disminuir las visitas al hospital (Mannucci, 2023; NBDF, 2023).

Para 1992 y 1997 se aprueba por la FDA el primer factor VIII y IX respectivamente, elaborados con tecnología recombinante, así mismo se aprueban drogas sintéticas como el acetato de desmopresina utilizado para el tratamiento de la HA media y severa. Estos nuevos tratamientos causaron el desarrollo de inhibidores en estos pacientes (NBDF, 2023).

Para el siglo 21 se empiezan a desarrollar nuevas terapias recombinantes que no se desarrollan a partir de productos derivados de plasmas humanos o animales con lo que se disminuyen las reacciones alérgicas al tratamiento o inhibidores (NBDF, 2023). Y en el 2013 se comienzan a desarrollar nuevas tecnologías en terapia génica para el tratamiento de hemofilia A y B (NBDF, 2023).

1.10.2. Tratamiento para hemofilia en la actualidad

En la actualidad el principal fin del tratamiento es corregir la deficiencia del factor a través de la administración de factor recombinante o concentrado plasmático. La aplicación se da ya sea después de un episodio de sangrado o como profilaxis para prevenir ese evento (Doncel et al., 2023).

La primera línea de tratamiento para todos los casos de hemofilia grave es la terapia de reemplazo periódica (profilaxis) con concentrados de factor de coagulación (CFC), ya sea derivados de plasma o recombinantes de aplicación intravenosa, u otros productos hemostáticos como desmopresina (DDAVP) o emicizumab. Los antifibrinolíticos como ácido tranexámico o el ácido ϵ aminocaproico (AEAC), por sí solos o como tratamiento complementario, se utilizan para el control de hemorragias en mucosas y para procedimientos dentales invasivos. Estos tratamientos se pueden utilizar en pacientes con hemofilia media o moderada que van a ser sometidos a una cirugía (Doncel et al., 2023; Srivastava et al., 2020). En la tabla 1 se observa un resumen de los principales agentes terapéuticos utilizados para el tratamiento de la hemofilia, así como la utilidad y su mecanismo de acción.

Las guías indican que en caso de no haber CFC disponibles se deben utilizar hemocomponentes seguros, como plasma fresco congelado (PFC) y crioprecipitados, adecuadamente sometidos a pruebas de detección y/o inactivación viral (Srivastava et al., 2020).

El fin de la profilaxis es mantener los niveles de factor por encima de 1 UI/dl para convertir el fenotipo de sangrado de severo a moderado, preservar mejor la función articular, disminuir la mortalidad y mejorar la calidad de vida de los pacientes (Doncel et al., 2023). La terapia se debe iniciar en la primera etapa de la vida (antes de los 3 años) con el propósito de prevenir complicaciones musculo esqueléticas, resultado de hemorragias recurrentes en articulaciones y músculos. La terapia de reemplazo de factor de coagulación episódica ya no debería considerarse una opción de tratamiento a largo plazo (Srivastava et al., 2020).

1.10.3. Diferentes líneas de tratamiento

1.10.3.1. Terapia de reemplazo

Después de descubrir que la hemofilia se asoció a la deficiencia de un factor de la coagulación plasmático, se implementó la infusión de plasma como tratamiento, proveniente de donantes sanos. Posteriormente se inicia el uso de crioprecipitados provenientes de un solo donante, los cuales poseían una actividad específica baja para FVIII (0,2 IU/mg/mL), lo que equivale aproximadamente a 100 IU de FVIII, aproximadamente de 14 a 21 bolsas de crioprecipitados para un hombre de 70kg (dosis 20-30 kg/mL). Además su almacenamiento a -20 °C en bolsas de plástico dificulta su utilidad como tratamiento en comparación con los productos liofilizados como el emicizumab que se almacenan a 2-8°C (Marchesini et al., 2021; Roche, 2024).

El principal problema de estos concentrados de factor fue la aparición del HIV y la transmisión a través de ellos a un 75% de los pacientes tratados (Marchesini et al., 2021).

Esto fue corregido antes de finalizar el último milenio con la mejora de las técnicas de screening de donantes de sangre y de manufactura, que permitieron disminuir la transmisión viral. Debido a estas dificultades las compañías farmacéuticas inician el desarrollo de concentrados de FVIII liofilizados a partir de un pool de plasma y purificado a través de técnicas de cromatografía de inmunoafinidad con anticuerpos monoclonales (Marchesini et al., 2021; Srivastava et al., 2020).

Tabla 1. Principales terapias utilizadas para el tratamiento de pacientes con hemofilia.

Tratamiento	Tipo	Mecanismo	Uso
Concentrados de FVIII y FIX derivados de plasma sanguíneo	Terapia de reemplazo	Concentrado liofilizado y purificado del FVIII o FIX que reemplaza al factor de la coagulación faltante	<ul style="list-style-type: none"> Primera línea en hemofílicos graves. Uso inyectado. Utilizado como profilaxis o para controlar sangrados.
Concentrados de factor VIII y IX recombinantes		Concentrados de FVIII y FIX, fabricados por tecnología de ADN, que actúan como el factor faltante.	
Acetato de desmopresina	Hemostático	Compuesto químico sintético semejante a la vasopresina. Estimula la liberación del FVIII y FVW desde los tejidos.	<ul style="list-style-type: none"> En hemofílicos A leves y moderados Aumenta los niveles de FVIII. Intravenoso (DDAVP®) o nasal (Stimate®)
Emicizumab		Anticuerpo humanizado específico para FIXa y FXa, que actúa como el FVIIIa formando el complejo tenasa intrínseca con ellos.	
Ácido épsilon aminocaproico (Amicar)	Antifibrinolítico	Evita que se deshaga el coágulo, lo hace más firme.	<ul style="list-style-type: none"> Intravenoso o por vía oral. Uso en caso de sangrado bucal
Ácido tranexámico		Bloquea la formación de plasmina mediante la inhibición de la actividad proteolítica de los activadores del plasminógeno, por lo que inhibe la fibrinólisis.	
Concentrado del complejo protrombínico activado (CCAP)	Agente de puenteo, de "bypass" o de desvío hemostático	Concentrado con factores II, IX y Xa que puentean al FVIII para generar trombina, por lo que posee alto potencial protrombótico.	<ul style="list-style-type: none"> Controlan la hemorragia. Se puede usar como primera línea si no hay FVIIIr y si hay presencia de inhibidores de FVIII. Importantes en hemofilia adquirida. En hemorragias no graves.
rFVIIa		Puentea la hemostasia desde la vía extrínseca evitando la intrínseca.	

FVIIIr: factor VIII recombinante, rFVIIa: factor VII activado recombinante, FIX: factor IX, FVIII: factor VIII, DDAVP: 1-deamino-8-D-arginina vasopresina, FVW: factor de Von Willebrand, Ac: anticuerpos. Elaborado a partir de FMH (2012); Piamo y Rojas (2018); García-Chávez y Majluf-Cruz (2019); Srivastava et al. (2020); Marchesini et al. (2021); CDC (2023) y Doncel et al. (2023).

La vida media de los concentrados de FVIII o FIX decae de forma exponencial desde la infusión intravenosa, así su vida media es corta, de 12 a 15 horas y de 25 a 30 horas

respectivamente; además poseen un mayor riesgo de la formación de inhibidores (Marchesini et al., 2021; Srivastava et al., 2020).

Las terapias emergentes tienen perfiles farmacocinéticos mejorados, utilizan dosis mensuales, mejoran el apego al tratamiento y disminuyen las dificultades de su aplicación (Srivastava et al., 2020).

En la tabla 2 se observan las diferentes terapias de reemplazo para el factor VIII y en la tabla 3 para el factor IX que se encuentran en el mercado actualmente.

Lo que busca la terapia de reemplazo es prevenir sangrados fatales y los efectos del sangrado en articulaciones y músculos. Con solo mantener los niveles de FVIII y FIX por encima de 3-5 IU/dL es suficiente para reducir el número de eventos de sangrado a uno o dos eventos al año (Marchesini et al., 2021).

Tabla 2. *Diferentes concentrados de FVIII que se encuentran en el mercado.*

Tipo de Producto	Marca	Nombre Internacional
Recombinante de longitud completa	Advate ®, Kogenate ® FS, Kovaltry ®	Octocog ALFA
FVIII con BDD	NovoEight ®	Turoctocog alfa
FVIII con BDD	ReFacto AF ®	Moroctocog alfa
FVIII con BDD fusionado a la porción Fc de la IgG1	Elocta ®/ Eloctate ®	Efmoroctocog alfa
FVIII con dominio B truncado, con fracción de PEG de 40kDa en un sitio específico.	Esperoct ®	Turoctocog alfa pegol
FVIII con BDD con PEG de 60kDa en un sitio específico.	Jivi ®	Damoctocog alfa pegol
FVIII recombinante de longitud completa, con pegilación de 20kDa en un sitio específico.	Adynovate ®/ Adynovi ®	Rurioctocog alfa pegol
FVIII recombinante de cadena única	Afstyla ®	Lonoctocog alfa
FVIII porcino recombinante con BDD	Obizur ®	Susoctocog alfa

BDD: con dominio B eliminado, FVIII: Factor VIII, kDa: kilodalton, IgG1: inmunoglobulina G1.

Fuente: modificado a partir de Srivastava et al. (2020).

Tabla 3. *Diferentes concentrados de FIX que se encuentran en el mercado.*

Tipo de Producto	Marca	Nombre Internacional
FIX recombinante fusionado a la porción Fc de la IgG1	Alprolix ®	Eftrenonacog alfa
Proteína de fusión recombinante que enlaza el FIX a la albúmina	Idelvion ®	Albutrepenonacog alfa
FIX recombinante con pegilación de 40 kDa dirigida a un sitio específico.	Refixia ® Rebinyn ®	Nonacog beta pegol

FIX: factor IX, kDa: kilodalton, IgG1: inmunoglobulina G1. Fuente: Modificado a partir de Srivastava et al. (2020).

1.10.3.2. Concentrados de factores recombinantes de vida media extendida

Uno de los principales problemas de los CFC es la necesidad de infusiones repetidas frecuentemente intravenosas cada 2 a 3 días para FVIII y cada 5 a 7 días para concentrados de FIX. La búsqueda de concentrados de vida media extendida para pacientes principalmente pediátricos es muy importante (Marchesini et al., 2021).

Los concentrados de factores de la coagulación (CFC) que poseen una vida media prolongada han contribuido a disminuir la frecuencia en la que los pacientes requieren de atención médica y mantienen por más tiempo los niveles mínimos del factor elevados, al compararlos con los CFC de vida media estándar (Marchesini et al., 2021; Srivastava et al., 2020). Los Concentrados de FIX recombinantes de Vida media extendida permiten una reducción en la frecuencia del tratamiento durante la profilaxis o un incremento en el tiempo entre dosis (Marchesini et al., 2021).

Entre las principales modificaciones que se dieron, está la unión de la molécula a PEG de 20kDa a 60kDa, aumentando su peso molecular con lo que disminuye su filtración glomerular y degradación proteolítica (Ruiz-Sáez, 2021). La conjugación con albúmina recombinante o con fragmentos Fc cristalizables de IgG1 han sido utilizadas ya que ambas moléculas unen al FcRn en el endosoma de las células endoteliales, facilitando su reciclaje y evitando su destrucción intracelular en el lisosoma (Ruiz-Sáez, 2021). Estas modificaciones ayudan a extender la vida media de estos factores recombinantes en sangre (Marchesini et al., 2021). Se ha visto un aumento de la vida media de más de 1,3 veces la vida media tradicional del factor sin modificar (WFH, 2023).

Aunque estos medicamentos reducen la frecuencia en la administración, aún deben ser administrados vía IV, con las dificultades que esto conlleva y mantienen los problemas de ser inmunogénicos para el paciente (Marchesini et al., 2021).

1.10.3.3. Agentes hemostásicos

El fenotipo de sangrado de los pacientes con hemofilia es determinado por varios factores que influyen en el balance hemostático natural que se basa en el equilibrio entre los factores procoagulantes y anticoagulantes. Considerando esto, es importante realizar un equilibrio en el sistema hemostático de este paciente. Estos agentes actúan aumentando la coagulación como emicizumab o inhibiendo la anticoagulación como fitusiran o el concizumab (Marchesini et al., 2021).

Estas terapias le permiten al paciente participar de muchas más actividades sin el temor de una hemorragia, mejorando su calidad de vida (Srivastava et al., 2020).

El indicador más importante de la eficacia de la terapia hemostática es la frecuencia de las hemorragias, particularmente de hemorragias articulares y musculares. Es el principal parámetro para la toma de decisiones de tratamiento y también se utiliza como pronóstico de posibles lesiones musculoesqueléticas a largo plazo (Srivastava et al., 2020).

a) Emicizumab

El emicizumab (Hemlibra), es un nuevo anticuerpo humanizado específico para FIXa y FXa, generado a través de un complejo proceso biomolecular. Se produjo en cultivos celulares (células de riñón humano embrionario HEK-293) transfectados con plásmidos que contenían los genes de la cadena pesada y ligera de IgG (Marchesini et al., 2021).

Emicizumab actúa como el cofactor FVIIIa, este se une al FIXa y FX, y asume una estructura tridimensional en el complejo tenasa. Las uniones son débiles, garantizando el equilibrio del proceso de coagulación y permitiendo la activación del FX y las reacciones a partir de esta. Su función depende de fosfolípidos por lo que depende de los sitios de sangrado (Marchesini et al., 2021).

Se ha visto que una dosis inicial de 3,0 mg/kg y una dosis posterior de 1,5mg/kg semanales por 4 semanas logra prevenir los sangrados. Este tiene la capacidad de lograr la hemostasia equivalente a la lograda con niveles de FVIII del 15% (Srivastava et al., 2020).

Se administra de forma subcutánea y con dosis menos frecuentes que los CFC. Su vida media es de 4 a 5 semanas, en los primeros estudios con este fármaco, se observó que después de 24 días de administrado se observaba una disminución de TTPa y un aumento de la trombina sin marcadores de hipercoagulabilidad, además no se

observaban eventos adversos. Hay estudios en niños con edades entre los 1 y 15 años, y en pacientes con inhibidores donde se obtuvieron buenos resultados (Marchesini et al., 2021). Sin embargo, algunos pacientes han presentado tromboembolismo venoso o microangiopatía trombótica asociados a la administración concomitante de concentrado de complejo protrombínico activado (CCPA) (Srivastava et al., 2020).

Este tratamiento no es una versión del factor deficiente, por lo que no actúa como terapia de reemplazo, tiene una vida media larga en comparación con los otros tratamientos y es ideal en niños porque no se aplica por acceso venoso sino vía subcutánea. Sin embargo, es necesario más investigaciones en niños menores de 1 año (Srivastava et al., 2020).

Emicizumab no se encuentra indicado para el tratamiento de episodios hemorrágicos agudos. La hemorragia entre dosis recibe tratamiento con dosis de CFC o con agentes de desvío que sean suficientes para lograr la hemostasia (Srivastava et al., 2020).

b) Fitusiran

Es una molécula que interfiere con el ARN de la antitrombina (AT) disminuyendo la expresión del ARNm a nivel hepático. Actúa evitando la inactivación del FXa y de la trombina por parte de la AT, este puede llevar a un estado protrombótico. En pacientes hemofílicos reduce las tendencias de sangrado y mejora la producción de trombina. Se administra subcutáneamente una vez al mes en dosis de 80mg (Marchesini et al., 2021). Actualmente hay 7 estudios reportados con este fármaco, donde se busca demostrar la eficiencia y seguridad de fitusiran en pacientes con hemofilia A o B que presentan o no inhibidores contra FVIII o FIX, de estos 4 (NCT02554773, NCT03417245, NCT03417102 y NCT03549871) se encuentran concluidos y los otros 3 aún en proceso (National Library of Medicine [NIH] et al., 2024c).

c) Concizumab

Es un anticuerpo de tipo IgG₄ monoclonal con selectividad por el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), el cual es el primer regulador de esta vía (FT). Inhibe la fase de iniciación al unirse al factor Xa y al FT-FVIIa, ya que presenta alta afinidad por serina proteasas. Concizumab reduce la anticoagulación de TFPI, se administra vía subcutánea y se ha asociado a casos de trombosis en algunos estudios (Marchesini et al., 2021). Actualmente hay 9 estudios reportados en la base de datos de ensayos clínicos del Gobierno de los Estados Unidos, de los cuales hay 3 (NCT02490787,

NCT03196284 y NCT03196297) completados y 6 están aún en proceso (NIH et al., 2024a).

1.10.4. Tratamiento para pacientes con inhibidores

El tratamiento de estos pacientes depende del título de inhibidores. En pacientes que poseen inhibidores con título bajo se ha visto que estos pueden llegar a desaparecer sin necesidad de tratamiento. Pero debe realizarse la determinación del título cada 2 a 4 semanas, con el fin de vigilar que estos no se conviertan en inhibidores de alto título. En casos donde estos persistieran por mucho tiempo o el paciente empezara a sufrir sangrados se debe de inducir tolerancia o aumentar la dosis de tratamiento hasta 3 veces, para evitar sangrados (Carcao & Goudeman, 2018).

En el caso de pacientes que presentan hemofilia A leve con bajo título de inhibidores, y estos no inhiben completamente al factor VIII endógeno, se podría utilizar desmopresina para aumentar la liberación de FVIII. Esto permite neutralizar a los inhibidores circulantes e incrementar suficientemente los niveles plasmáticos de FVIII para detener hemorragias menores o permitir procedimientos quirúrgicos menores (Carcao & Goudeman, 2018).

Los inhibidores de títulos altos tienden a ser persistentes y causan que el paciente sea completamente resistente a los concentrados de factor. En estos pacientes es necesario cambios considerables en el tratamiento mediante el uso de agentes de desvío o de "bypass"; el uso de FVII recombinante activado (rFVIIa) aprobado en caso de que los pacientes con inhibidores presenten sangrados; o CCPA son ejemplos de este tipo de agentes (Carcao & Goudeman, 2018; Marchesini et al., 2021).

En estos pacientes se debe eliminar contacto con el factor, con el fin de disminuir los títulos de anticuerpos, para luego iniciar el tratamiento con rFVIIIa y posteriormente la inducción de tolerancia (Carcao & Goudeman, 2018).

En pacientes con hemorragias menores se puede aplicar presión en la zona y dar terapia antifibrinolítica, como el ácido tranexámico o ácido ϵ aminocaproico. Cuando estas medidas no dan resultado o son inadecuadas para el tipo de sangrado, entonces son necesarios los agentes de desvío (CCPA o rFVIIIa). CCPA son derivados de plasma atenuados viralmente con FII, FVII, FIX y FX y sus formas activas, que contribuyen a formar el coágulo, este posee una pequeña cantidad de FVIII (Carcao & Goudeman, 2018).

El uso de agentes de desvío como tratamiento profiláctico por lo general ha estado reservado para pacientes con una tendencia hemorrágica alta o con considerable daño articular preexistente. Así mismo se ha apoyado el uso de la profilaxis en pacientes con inhibidores (Carcao & Goudeman, 2018).

Otro fármaco importante en estos pacientes es el emicizumab el cuál fue aprobado por FDA en el 2017 para su uso en pacientes con hemofilia A e inhibidores (Carcao & Goudeman, 2018).

Capítulo 2. Generalidades en terapia génica

Los inicios de la terapia génica se remontan a la década de 1970s, en 1973 se descubre una técnica de ingeniería genética que permite introducir material genético (ADN) de un individuo, replicarlo y expresarlo en otro, a través del uso de un plásmido, para luego introducirlo en la bacteria *Escherichia coli*. Cuando la bacteria se reprodujo, replicó el DNA introducido (Silva, 2022).

En 1989 Rosenberg et al. condujeron el primer ensayo de transferencia génica en humanos. Utilizaron un retrovirus para introducir un marcador génico que codifica por resistencia a neomicina (gen *NeoR*) en linfocitos infiltrantes de tumores humanos, previo a su uso en 5 pacientes con melanoma avanzado. Este ensayo demostró la flexibilidad del uso de la transducción génica retroviral en humanos y sentó las bases para nuevos estudios (Edelstein et al., 2004; Wirth et al., 2013). A partir de este estudio, el grupo de Rosenberg obtuvo los permisos para tratar dos pacientes con melanoma avanzado con linfocitos infiltrantes de tumores modificados para expresar TNF, sus resultados mostraron que no había crecimiento tumoral en el sitio de inyección y las células tumorales no eran viables en esta zona (Wirth et al., 2013).

El 14 de setiembre de 1990, investigadores del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos realizaron el primer procedimiento aprobado de terapia génica en humanos, en una niña de 4 años con inmunodeficiencia severa combinada (SCID), enfermedad genética asociada a una alta vulnerabilidad a infecciones con pobre supervivencia (Coutts, 1994). En 1995 realizan una publicación a 5 años de la realización del procedimiento, donde exponen la persistencia del gen de la adenosin desaminasa (ADA) introducido por terapia génica en dos niños deficientes para este (Blaese et al., 1995).

En 1999 surge uno de los peores sucesos en la historia del uso de la terapia génica, la muerte de Jesse Gelsinger de 18 años, como consecuencia directa del uso de una estrategia de terapia génica en un estudio clínico. Jesse sufría una deficiencia de la enzima ornitina transcarbamilasa, una enfermedad del hígado ligada al cromosoma X, cuyos síntomas incluyen la incapacidad de metabolizar el amonio. Dicha enfermedad es mortal en recién nacidos, pero en este caso la enfermedad se asoció a una mutación espontánea con menor severidad. Sin embargo, el paciente se sometió a ensayos clínicos en la Universidad de Pensilvania, él fue tratado con un adenovirus modificado que contenía el gen que curaría su enfermedad, sufrió fallo multiorgánico y muerte

cerebral asociado a la respuesta inmune contra el vector viral utilizado (Silva, 2022). En el año 2000, 4 pacientes desarrollaron leucemia asociada al vector adenovirus. Estos dos eventos llevaron a un alto en el desarrollo de la terapia génica y a la preocupación sobre la seguridad y la necesidad del uso de vectores virales más seguros (Zhao et al., 2021).

En el 2003 China se convierte en el primer país en aprobar la terapia génica para uso clínico. Gendicine™ desarrollado por SiBiono Gene Tech Co. es un vector adenoviral donde el gen E1 de adenovirus es reemplazado por un ADNc del p53 humano; se utilizó un virus no replicativo y fue aprobado para el tratamiento de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. La Administración Estatal de Alimentos y Medicamentos de China aprobó el medicamento sin resultados de ensayos clínicos en fase III. El medicamento fue cuestionado en cuanto a su eficacia como tratamiento (Wirth et al., 2013).

Lo anterior dio cabida para que en el 2005 se aprobara también en China Oncorine™, un adenovirus que se replica de forma condicional desarrollado por Sunway Biotech Co.Ltd, el cual en combinación con quimioterapia se utilizó en el tratamiento de cáncer nasofaríngeo refractario. Oncorine™ posee una delección en una región de 55kb del gen *E1B* adenoviral que restringe al virus para unirse e inactivar a la proteína silvestre p53, replicándose solo en células deficientes de p53. Con esto se mantiene la vía apoptótica durante la infección lítica en las células malignas, donde la proliferación viral lleva a oncolisis, importante en el tratamiento contra tumores sólidos malignos (Wirth et al., 2013).

En el 2004, Ark Therapeutics Group Plc recibe la primera certificación “Good Manufacturing Practice” en la Unión Europea para la manufactura de suplementos comerciales de medicina basada en genes; específicamente en Cerepro®, un vector de adenovirus que albergaba el gen para la timidina kinasa del virus del herpes simplex. Su fin era ser utilizado en el tratamiento de tumores cerebrales malignos, a través de la capacidad de esta enzima en conjunto con otras kinasas celulares para convertir al análogo de nucleótido ganciclovir en su metabolito final ganciclovir trifosfato, que por su citotoxicidad inhibe la ADN polimerasa evitando la replicación del ADN. Su eficacia se evaluó en dos ensayos de fase II y en el 2008 se convierte en el primer vector adenoviral que completa un ensayo clínico en fase III (Wirth et al., 2013).

En el 2009 la revista *Science* define la terapia génica como uno de los mayores avances científicos del año debido al éxito obtenido en el tratamiento de enfermedades

oculares y de inmunodeficiencias primarias, incluso después de una mezcla de algunos resultados decepcionantes y otros satisfactorios en los ensayos clínicos realizados (Kumar et al., 2016).

En el 2012 la Agencia de Medicina Europea (EMA) aprobó la primera terapia génica que utilizaba como vector un virus adenoasociado que contenía un gen que codifica por una lipoproteinlipasa, para el tratamiento de su deficiencia (Argirò et al., 2023).

Así mismo, en el 2012 fue descubierto por Charpentier y Doudna CRISPR Cas9, un sistema de repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas, acoplado a una endonucleasa Cas9. Este es un sistema inmune bacteriano que puede cortar ADN de bacteriófagos o plásmidos, permite programar la inserción o delección en un sitio específico del genoma y es utilizado para la edición génica, por ejemplo en células madres hematopoyéticas (Frangoul et al., 2021; Leonova & Gainetdinov, 2020; Silva, 2022). CRISPR Cas9 es la tecnología de edición génica que ha causado un mayor impacto en los últimos años en temas de investigación biomédica, ya que hace posible corregir errores en el genoma, encender y apagar genes de forma rápida, fácil y a bajo costo (Redman et al., 2016).

En el 2016 EMA aprueba Strimvelis (GSK2696273). La primera terapia génica con adición de genes, basada en el uso de retrovirus para modificar células madre ex vivo con el fin de tratar inmunodeficiencia severa combinada por deficiencia de adenosina desaminasa (ADA-SCID). Esta terapia se basa en la modificación de un grupo de células CD34+ autólogas con un vector retroviral con el fin de que se inserte el ADNc que codifica por la adenosina desaminasa humana (ADA) en estas células, para luego infundirlas en el paciente, el cual producía un ADA funcional (Shahryari et al., 2022).

En ese mismo año (2016) se realiza el primer ensayo clínico utilizando tecnología CRISPR/Cas 9. Lu y sus colegas en el Hospital de China Occidental en Sichuan, inyectaron células T editadas provenientes de los mismos pacientes. Para este estudio se utilizaron plásmidos que codificaban por Cas9 y ARN guía que tenían como diana el gen PD-1, obteniéndose una reducción significativa en la expresión de este en las células T editadas y sin efectos adversos. Este estudio dio las bases para el uso de la tecnología de edición génica en aplicaciones clínicas (Li et al., 2023).

En el 2017 la FDA aprueba Tisagenlecleucel (Kymriah), la terapia de células T con receptores quiméricos de antígenos (CAR T), la cuál es curativa para el tratamiento de niños con leucemia linfocítica aguda (LLA) en recaída (NIH, 2022). CAR T se convierte en el nuevo pilar de la inmunoterapia celular contra el cáncer, ha mostrado respuestas

clínicas impresionantes en pacientes con leucemia de células B, linfomas o mielomas (Jogalekar et al., 2022; NIH, 2022). Esta terapia fue desarrollada a partir de técnicas de ingeniería genética donde células T autólogas o alogénicas son modificadas para expresar receptores modificados y generados de forma artificial. Estos receptores son dirigidos contra antígenos específicos en la superficie de las células cancerígenas y se les llamó receptores antigénicos quiméricos (CARs) (NIH, 2022; Jogalekar et al., 2022). Las células T CD8+ son modificadas por medio de un virus que contiene el ADNc que codifica por los CARs. Las células CAR T son posteriormente expandidas ex vivo e infundidas en el paciente (Jogalekar et al., 2022). Esta terapia combina la especificidad de un anticuerpo monoclonal con las habilidades proliferativas y citotóxicas de una célula T CD8+ (Kumar et al., 2016).

Posteriormente se desarrollaron técnicas de ingeniería genética utilizando vectores virales o no virales para eliminar la expresión de proteínas del CMH tipo I y II en células T alogénicas; con el fin de evitar rechazo en el tratamiento (Jogalekar et al., 2022). Actualmente hay 6 terapias de células CAR T aprobadas por FDA para el tratamiento de LLA, linfoma no Hodgkin de células B (LNH B), linfoma de células del manto (LCM), linfoma folicular (LF) y mieloma múltiple (MM) (NIH, 2022).

En el 2023 se aprueba Roctavian, una terapia génica basada en vectores de virus adeno asociados para el tratamiento de adultos que padecen hemofilia A severa y a finales de este mismo año se aprueba la terapia génica para hemofilia B (Silva, 2022; FDA, 2023). Desde sus inicios, más de 2500 ensayos clínicos se han iniciado para un amplio rango de enfermedades desde monogénicas hasta infecciosas, desórdenes neurodegenerativos y cáncer (Anguela & High, 2019).

2.1. Definición de terapia génica

Para definir terapia génica se debe entender el concepto de gen. Los genes son la unidad funcional y física de herencia, se encuentran formados por una secuencia ordenada de nucleótidos localizados en una zona particular del cromosoma. Cada gen codifica por un producto funcional como por ejemplo una proteína, son los encargados de determinar los diferentes rasgos de una persona y tiene la propiedad de ser heredados de un padre a sus hijos. Un gen está formado por cadenas largas de ADN, esas cadenas están formadas por subunidades de ADN llamados nucleótidos (nts). Sólo en el ser humano hay alrededor de 3 billones de parejas de nts en los cromosomas de las células humanas, alrededor de 30 000 genes por célula (Patil et al., 2018).

En los genes se pueden presentar mutaciones que pueden ser pasadas de una generación a otra y que pueden causar una patología en la persona donde se presentan. Las secuencias específicas de bases en cada gen codifican por instrucciones para hacer proteínas, estas proteínas van a ser las encargadas de realizar las funciones vitales y forman parte de las estructuras celulares. Alteraciones en estos genes causan que las proteínas por las que codifican no puedan llevar a cabo sus funciones normales y ocurran desórdenes genéticos (Patil et al., 2018).

La terapia génica va a ser cualquier procedimiento mediante el cual se modifiquen genéticamente las células de un paciente con el propósito de tratar o aliviar una enfermedad (Silva, 2022). Esto lo logra a través del reemplazo, manipulación o la complementación de genes afuncionales o con mal funcionamiento, con genes sanos (Patil et al., 2018).

En terapia génica cobra mucha relevancia la combinación de tres elementos claves (Silva, 2022):

- El material genético a transferir.
- El método de transferencia
- El tipo de célula diana que incorporará el material genético.

La terapia génica busca modificar o manipular la expresión de un gen o alterar las propiedades biológicas de las células vivas para uso terapéutico. Esta trabaja a través de varios mecanismos, donde se tiene como fin reemplazar un gen que causa enfermedad por una copia sana de este, inactivar un gen que no está funcionando de forma adecuada, o introducir un gen nuevo o modificado en el cuerpo con el fin de tratar una patología (Center for Biologics Evaluation and Research [CBER], 2018).

Los ensayos exitosos en terapia génica, desarrollados en los últimos años, se realizan con el fin de curar patologías donde la enfermedad se asocia a la deficiencia de una proteína funcional, esta proteína no debe interferir con la terapia con el fin de que esta sea exitosa (Kumar et al., 2016).

Este tratamiento tiene el potencial de curar enfermedades que son tratables pero no curables con la medicina convencional; y de proveer tratamientos para enfermedades clasificadas previamente como no tratables (Kumar et al., 2016). Los productos de terapia génica se están estudiando para tratar enfermedades genéticas, infecciosas y cáncer (CBER, 2018).

2.2. Tipos de Terapia Génica:

Existen 2 tipos de terapia génica:

2.2.1. *Terapia génica somática*

Esta se refiere a la introducción de un gen normal en una célula diana con la finalidad de tratar al paciente. Pero estos genes no son transmitidos a la descendencia. En estos casos los hijos del paciente mantendrán los genes mutantes. Esta es la forma de terapia génica más común (Patil et al., 2018).

2.2.2. *Terapia génica de línea germinal:*

En este caso se insertan genes extraños en óvulos fecundados o en células productoras de espermatozoides, el fin es que el cambio genético sea transmitido a las generaciones futuras (Patil et al., 2018).

Actualmente la legislación permite la terapia génica solo en células somáticas (Silva, 2022). En los Estados Unidos el gobierno federal prohíbe el uso de recursos para investigaciones en línea germinal y ningún ensayo clínico puede ser considerado para la aprobación por la FDA, así mismo otros países presentan restricciones en esta área (Dunbar et al., 2018).

2.3. Material genético a transferir

La FDA define la terapia génica como un producto que media sus efectos a través de la transcripción y/o traducción del material genético transferido, o por integración dentro del genoma del hospedero. Este producto es administrado como ácidos nucleicos, virus o microorganismos genéticamente modificados (Goswami et al., 2019). Por su parte la Agencia de Medicina Europea (EMA) describe la terapia génica como un medicamento biológico que contiene una sustancia activa, la cual consiste en un ácido nucleico recombinante usado o administrado en humanos para regular, reparar, reemplazar, adicionar o borrar secuencias génicas. EMA indica que el efecto terapéutico, profiláctico o diagnóstico se relaciona directamente con la secuencia de ácido nucleico que contienen o con el producto de la expresión génica de esa secuencia (Goswami et al., 2019).

El material genético que puede ser transferido a la célula diana es muy diverso. Pueden ser genes naturales, fragmentos de DNA que codifican por proteínas naturales con un efecto biológico conocido; o genes quiméricos, sintetizados en el laboratorio y

que codifican para proteínas artificiales. Incluso puede ser otro tipo de material genético que no ejerce su efecto terapéutico a través de una proteína, como las ribozimas, los oligonucleótidos antisentido, el ARN interferente (iARN), el ARNm, los ARN pequeños de interferencia (siARN) y los micro ARN (miARN). Todos ellos son secuencias cortas de ácidos nucleicos que se unen específicamente a secuencias de DNA o RNA y bloquean su expresión. Su administración terapéutica en una célula o tejido defectuosos busca restaurar una función genética específica o desactivar un gen responsable del desarrollo de una enfermedad o trastorno (Goswami et al., 2019; Ruiz & Sangro, 2005).

Otros métodos utilizados incluyen intercambio del gen mutado por un gen funcional a través de los mecanismos de recombinación homóloga, reparación del gen mutado utilizando mutación reversa selectiva o regulando el gen mutado (Goswami et al., 2019).

2.3.1. Ácido desoxirribonucleico

El ADN es “la molécula de la vida”, y es la que lleva codificada la información genética característica de los diferentes seres vivos. Mediante ese código, regula el funcionamiento de cada tipo de célula; controla la transmisión de esa información, tanto en el tiempo como en el lugar donde actúa la misma; coordina la complejísima red de interacciones del funcionamiento celular y tisular; controla también su propia duplicación, reparación y autorregulación. Igualmente, controla y coordina los procesos de reproducción y mantenimiento de las características de cada especie. Todas estas actividades funcionales son reguladas y conducidas por un conjunto de instrucciones que constituyen el llamado código genético (Martínez - Frías, 2010).

El ADN codifica la información genética mediante combinaciones de las bases, de forma que cada secuencia correlativa de 3 bases (triplete), que se denomina codón, codifica un aminoácido. Esta información se encuentra contenida en los genes que codifican por cada proteína. En la transcripción del mensaje genético, lo primero que ocurre es la copia completa del gen (con los exones e intrones) formando un pre-ARNm. Posteriormente, se produce una separación de los intrones quedando sólo los exones formando así el ARNm que se traducirá en la proteína (Martínez - Frías, 2010).

En la terapia génica la sustitución de genes tiene como objetivo reemplazar un gen defectuoso por una copia funcional para lograr un efecto terapéutico que atenúe los efectos de una mutación de pérdida de función. Los productos de sustitución de genes pueden incluir plásmidos (molécula de ADN circular) o material genético encerrado en vectores virales, que permiten la transducción de una copia exógena del gen de interés a la célula diana (Argirò et al., 2023).

La terapia génica con plásmidos puede producir un efecto duradero y que a la vez minimiza la inactivación genética del genoma de la célula, se asocia a un menor potencial oncogénico que las terapias génicas con vectores virales. Sin embargo, la administración de plásmidos al núcleo es difícil, y es posible que la expresión de proteínas no sea duradera, especialmente en células en división (Argirò et al., 2023).

2.3.2. ARN mensajero

El ARN mensajero (ARNm) es un tipo de ácido ribonucleico de una sola cadena que se transcribe de una banda de ADN y que lleva la información que codifica para la síntesis proteica. Posteriormente será transcrito y procesado en proteínas funcionales. Su uso permite la síntesis de cualquier proteína a través de la maquinaria de procesamiento y síntesis proteica en las células transfectadas *in vitro* o *in vivo* (Qin et al., 2022).

A diferencia de las drogas basadas en ADN, los transcritos de ARNm son eficientes, ya que tienen alta transfección con baja toxicidad; al no necesitar entrar al núcleo para ser funcionales. El uso de esta molécula no tiene riesgo potencial de una infección accidental o una inserción mutagénica oportunista. El ARNm tiene el potencial para tratar enfermedades que requieren de la expresión de una proteína con una mayor eficacia terapéutica. Esto se logra gracias a que se da una traducción continua de la proteína o péptido por el que codifica ese ARNm, desencadenando una expresión de larga duración en comparación con los fármacos peptídicos tradicionales. Sus diferentes propiedades le han permitido entrar rápidamente en los campos de la biomédica en la búsqueda del tratamiento de enfermedades que se pensaban incurables (Qin et al., 2022).

El uso terapéutico del ARNm ha generado grandes esperanzas para combatir una amplia gama de enfermedades incurables. Los rápidos avances recientes en biotecnología y medicina molecular han permitido la producción de casi cualquier proteína o péptido funcional en el cuerpo humano mediante la introducción del ARNm como vacuna o agente terapéutico. Esto representa un campo creciente de la medicina con gran promesa para prevenir y tratar muchas enfermedades genéticas intratables (Qin et al., 2022).

El ARNm transcrito *in vitro* ha logrado una producción programada, que es efectiva, rápida en diseño y producción, flexible y rentable. Basándose en estas extraordinarias ventajas, las vacunas de ARNm tienen las características de una respuesta más rápida ante brotes de enfermedades infecciosas a gran escala (Qin et al., 2022).

Factores como su alta susceptibilidad a ARNasas (enzimas ribonucleasas que degradan el ARN); las dificultades que presenta al pasar la membrana celular aniónica debido a que es una molécula negativamente cargada; y el que pueden inducir una respuesta inmune con toxicidad asociada; son restricciones que deben ser subsanadas durante su desarrollo como terapia (Qin et al., 2022; Úsuga & Rugeles, 2006).

2.3.3. *ARN pequeños de interferencia*

Los ácidos ribonucleicos pequeños de interferencia (siARN) son ácidos ribonucleicos pequeños de doble cadena. Estos ácidos ribonucleicos interferentes inhiben la expresión génica secuencia específica en organismos eucariotas, esta vía se ha convertido en una estrategia prometedora para el tratamiento de múltiples enfermedades humanas como el cáncer, infecciones virales, enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas. Su uso se basa en un mecanismo que consiste en el silenciamiento postranscripcional de la expresión génica (Flumian et al., 2011).

2.3.4. *Micro ARN*

Los micro ARN (miARN) son microrreguladores de la expresión génica en una gran variedad de tipos celulares y procesos fisiológicos. Son pequeños RNA de alrededor de 22 nucleótidos que no codifican para proteína. Estas pequeñas moléculas de ARN están codificadas en el genoma celular y son transcritos a ARN en el núcleo, dando lugar a los llamados pre-micro-ARN, los cuales son procesados y exportados al citoplasma donde, ya como miARN maduros, realizan su función (Carrasco et al., 2016).

Actualmente los miARN han alcanzado una gran relevancia clínica debido a su cada vez más importante papel en la regulación de múltiples procesos tanto fisiológicos como patológicos. Los miARN regulan la expresión génica a nivel postranscripcional mediante unión con la región 3' UTR del ARNm de sus genes diana. Con esto pueden disminuir la expresión de determinadas proteínas con las que existe cierta complementariedad en regiones específicas de su secuencia. Los miARN maduros se integran al complejo RISC acoplado a una endonucleasa o helicasa, guiándolo hacia las secuencias de ARNm diana, e induciendo su degradación o inhibiendo la traducción a proteína (Carrasco et al., 2016).

Cada vez hay más evidencias de que procesos tan importantes como la muerte y la supervivencia celular, o la división y diferenciación están regulados por micro ARN. Distintas áreas de conocimiento como la biología del desarrollo o la oncología están

destinando grandes esfuerzos en investigar sobre estas moléculas (Carrasco et al., 2016).

En el ser humano hay descritos entre 1.200 y 1.500, los cuales se estima regulan hasta una tercera parte de los genes del organismo. Un miARN determinado puede tener varios genes diana y, a su vez, cada gen puede ser diana de varios miARNs, formando circuitos de regulación de alta complejidad (Carrasco et al., 2016).

Se ha visto como estas moléculas controlan el crecimiento celular, diferenciación y apoptosis. Tienen la capacidad de regular una gran cantidad de ARNm a los que se unen por complementariedad, modulando su expresión (Tong & Nemunaitis, 2008).

Actualmente se están realizando estudios de su utilidad en terapia génica contra cáncer, con el fin de dirigirlos contra múltiples redes génicas que pueden ser controladas por un único miARN aberrantemente expresado. El uso de miARNs supresores de tumores o la eliminación de secuencias de miARN oncogénicos se están estudiando con el fin de obtener resultados antitumorales favorables (Tong & Nemunaitis, 2008).

2.3.5. *Oligonucleótidos antisentido*

Los oligonucleótidos antisentido (ASOs) son polímeros de ácidos nucleicos de una sola cadena, pequeños (de 18 a 30 nucleótidos aproximadamente) y sintéticos. Estas moléculas poseen el potencial de tratar un amplio rango de enfermedades a través de la modulación de la expresión génica vía varios mecanismos (Roberts et al., 2020).

Estudios han mostrado que pueden inhibir la inhibición de la traducción al interferir corriente arriba con marcos de lectura que regulan de forma negativa este proceso; por lo que con su uso se podría activar la expresión proteica. Además, se han asociado a evitar el ensamblaje de las uniones entre exones y se ha visto que pueden influenciar las señales de poliadenilación con el fin de aumentar la estabilidad transcripcional (Roberts et al., 2020).

La mayoría de las terapias basadas en el uso de oligonucleótidos se han enfocado en el silenciamiento génico, aunque se están utilizando también en la modulación del proceso de "splicing" y la activación génica (Roberts et al., 2020).

2.4. Metodologías utilizadas en terapia génica

Existen tres formas de modificar el genoma celular a través de la terapia génica.

2.4.1. Adición génica

La adición génica se basa en la adición de material genético a las células con el fin de compensar un gen faltante o defectuoso, se insertan copias de un transgén en las células del paciente. El vector entrega este material genético *in vivo* o *ex vivo*. Una vez dentro de la célula, el transgén da instrucciones a la célula que conducen a la producción de proteínas funcionales. En esta terapia el gen no necesita ser reemplazado ni eliminado. Esta se utiliza principalmente en enfermedades monogénicas como hemoglobinopatías, anemia de células falciformes, talasemias, fibrosis quística y hemofilia (Silva, 2022).

La meta de la adición génica es restaurar la función celular normal adicionando una copia funcional del gen en trans sin afectar el gen causante de la enfermedad. Se puede realizar tanto *in vivo* en enfermedades como hemofilia y atrofia muscular espinal y *ex vivo* como en el tratamiento de la inmunodeficiencia severa combinada ligada a X (Anguela & High, 2019).

2.4.1.1. Diseño del casete génico

El diseño del material genético a introducir en la terapia génica depende del defecto genético primario que se desea tratar, el tamaño del gen modificado y las características de los órganos o tejidos dianas. Es importante tomar en cuenta el tamaño del casete génico, la capacidad de empaquetamiento del vector viral, el método de entrega (*in vivo* o *ex vivo*), el potencial para integrarse dentro del genoma del hospedero y si las células diana se dividen o no ("Gene Therapy," 2024).

En la terapia génica existen dos pasos críticos, la transferencia de los genes a las células diana y su posterior expresión. La acción de transferencia de material genético a una célula diana es conocida como transducción y el gen transducido como transgén. La transducción de la célula diana puede realizarse fuera del organismo (*ex vivo*) o por administración directa (*in vivo*) (Ruiz & Sangro, 2005).

Existen un gran número de barreras presentes en los espacios intravascular, intersticial e intracelular que pueden impedir una adecuada transducción. Para proteger los genes se usan vehículos o vectores. Los vectores virales son los más utilizados y se fabrican eliminando las porciones del genoma viral que son esenciales para su replicación y sustituyéndolas por aquellos genes que se desea introducir en las células diana (Ruiz & Sangro, 2005).

La región que ocupan estos genes se llama "casete". El casete génico se encuentra formado por un transgén y por elementos regulatorios necesarios para la expresión génica. Entre estos elementos se encuentran las secuencias repetidas terminales largas (LTR) en modelos asociados al uso de lentivirus (LV), el promotor, las repeticiones terminales invertidas (ITR) y las señales de terminación transcripcional utilizadas en modelos que utilizan virus adeno asociados (AAV). El diseño va a depender del vector viral utilizado ("Gene Therapy," 2024).

La regulación deseada de la expresión transgénica se puede obtener a través del uso de promotores o potenciadores específicos del tejido, del tipo celular o de la etapa de diferenciación. La regulación post-transcripcional se puede obtener agregando regiones no traducidas (UTRs) 5' o 3' que mejoran la unión a ribosomas o la estabilidad del ARNm, o por medio de secuencias diana para microARNs específicos que regulan la expresión de proteínas mediante mecanismos fisiológicos de interferencia del ARN. Las proteínas de la cubierta viral también pueden diseñarse con el fin de mejorar la transducción de ciertos tipos celulares específicos (Poletti & Mavilio, 2021).

a) *Transgén*

Un transgén es una pieza de ADN construida experimentalmente que es integrada en el genoma de un organismo receptor. El desarrollo de los transgenes permite expresar el gen deseado a diferentes tiempos de desarrollo y en diferentes líneas celulares, con el fin de probar mecanismos como el funcionamiento de un ARN específico o de una proteína (Mosimann & Zon, 2011).

b) *Promotor*

El promotor es una secuencia de DNA que dirige la expresión del transgén, indica dónde y cuándo se da esta expresión; por lo que es el elemento más importante dentro del genoma del vector que dicta la fuerza con que se expresa y su especificidad (Ruiz & Sangro, 2005; Powell et al., 2015; "Gene Therapy," 2024). El promotor puede ser universal si expresa el transgén en cualquier célula, o se considera específico de tejido cuando el transgén sólo es expresado en cierto tipo de células. También el promotor puede ser inducible, en casos donde el transgén es expresado sólo cuando una droga inductora es administrada al paciente por separado (Ruiz & Sangro, 2005).

La mayoría de los protocolos de las terapias génicas utilizan vectores que mantienen su tropismo intrínseco (si lo tienen) y utilizan casetes de expresión génica simple, dirigidos por promotores virales fuertes. Más recientemente se ha visto que la

modificación del tropismo del vector para expandir o restringir la entrega del gen en tejidos específicos *in vivo* y el adicionar una mayor selectividad por el tejido diana, han llevado a mejores avances en la terapia génica. Esto permite minimizar el título inicial requerido para obtener la respuesta deseada.

Una de las técnicas utilizadas es la adición de genes corriente abajo de un promotor, como el de la albúmina en los hepatocitos. Donde la regulación del gen introducido o corregido es controlada por el promotor endógeno, resultando en una expresión génica mayor y mejor regulada (Dunbar et al., 2018).

El control de la expresión génica puede modificarse para utilizar elementos que responden a un estímulo particular como los niveles de glucosa; o elementos que regulan encendiendo o apagando interruptores, consiguiendo un estricto control exógeno de la expresión transgénica. Con el estudio de los mecanismos de transcripción eucariotas se ha obtenido un aumento de los niveles de expresión de los promotores eucariotas a través de la incorporación de elementos como intrones y regiones de control en los casetes de expresión génica (Papadakis et al., 2004).

Entre los tipos de promotores que se pueden utilizar:

- *Promotores virales:*

La mayoría de los estudios en terapia génica han utilizado los promotores virales, los cuales tienen la capacidad de permitir una propagación viral eficiente e inducen niveles más altos de transcripción en comparación con los promotores eucariotas. Una de sus ventajas es que tiene la habilidad de controlar y reclutar la maquinaria de transcripción celular. Estos promotores pueden empacarse de forma más compacta y sencilla en los vectores utilizados en terapia génica (Papadakis et al., 2004).

Uno de los promotores más utilizados es el promotor y potenciador principal inmediatamente temprano de citomegalovirus (CMV-IE), el cual tiene la habilidad de inducir altos niveles de expresión génica en muchos tipos de tejidos. Otros promotores que se han utilizado son los de virus de simio 40, LTRs del virus del sarcoma de Rous, LTR del virus de leucemia murina de Moloney, y otros promotores LTR virales. Los estudios pre-clínicos en hemofilia A y B demostraron que se podía obtener niveles terapéuticos y sustentables del vector con el uso de promotores virales (Papadakis et al., 2004).

Es importante tomar en cuenta que las células hospederas han desarrollado mecanismos para silenciar y detectar la expresión transgénica viral, por lo que en ciertos

casos no se sostiene la expresión génica *in vivo*. El uso de promotores virales como el de CMV se ha relacionado con hepatotoxicidad y con activación de la respuesta inmune celular y humoral. Sin embargo, los estudios con su uso aún continúan (Papadakis et al., 2004).

- *Promotores eucariotas*

Hay estudios que demuestran que promotores como el de la α_1 -antitripsina humana y el de la ARN polimerasa murina II tienen una mayor expresión génica que el uso de promotores LTR de vectores virales *in vivo* (Papadakis et al., 2004).

El uso de promotores eucariotas tiene la ventaja de lograr una expresión por largo tiempo *in vivo*. El uso de promotores eucariotas selectivos de tejido le agrega un componente de especificidad y con ello una mayor seguridad para los protocolos de transferencia de genes, ya que minimizan la expresión de transgenes ectópicos a través de un direccionamiento transcripcional. Así mismo el uso de promotores tejido específico permite evitar la inducción de una respuesta inmune (Papadakis et al., 2004).

También se están probando promotores inespecíficos como el pequeño promotor de ARN nuclear U1b que se asoció a una producción de niveles más bajos del transgén que el obtenido con el promotor de apoA-1 (apolipoproteína A-I) (Papadakis et al., 2004).

Gill et al. (2001) realizaron estudios con el promotor de ubiquitina C (UBC) y el del factor de elongación 1α (EF1 α) en terapia génica con plásmidos para el tratamiento de fibrosis quística. En estos obtuvieron una expresión transgénica *in vivo* en el pulmón meses posterior a la aplicación; mientras que al compararla con el promotor de CMV, se obtuvo una disminución en la expresión a las 2 semanas de iniciado el procedimiento (Papadakis et al., 2004).

Una gran variedad de promotores tejido-específicos o inespecíficos están siendo estudiados, entre ellos tenemos los promotores hepatocito específicos como el de Apo A-I, Apo E, α_1 -antitripsina (hAAT), albúmina y otros. Promotores del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), del FvW y otros endotelio específicos; promotores de la cadena de miosina músculo específicos; promotores de la proteína básica de mielina y de la prolactina que son neuroespecíficos; promotores específicos de línea eritroide como el de dectina 2, anquirina y α -espectrina; entre otros (Papadakis et al., 2004).

Otros promotores utilizados incluyen el promotor de la α -fetoproteína en el carcinoma hepatocelular; promotores del antígeno carcinoembrionario (CEA) y mucina 1, en tumores que los expresan; promotor de la α -lactoalbúmina en cáncer de mama; el promotor de ciclooxigenasa 2 en cáncer gastrointestinal; el promotor de la prolactina en cáncer de la glándula pituitaria y el promotor de la osteocalcina 2 en osteosarcomas; entre otros (Papadakis et al., 2004).

- *Elección del promotor*

En general promotores como el de EF1 α , CMV-IE, β actina de pollo (CBA), el de la β glucoronidasa o de la ubiquitina C se pueden utilizar como promotores en la mayoría de los tejidos (Powell et al., 2015).

Una de las limitantes a tomar en cuenta en el uso del promotor es el tamaño ya que es importante notar que deben empacarse en vectores de tamaño tan pequeño como el de los AAV (4.1–4.9 kbs). Es por ello que un promotor como como CBA que permite expresiones por mayor tiempo por encima de los otros promotores citados anteriormente, no se prefiere debido a su tamaño de 1,7kbs en comparación con los promotores de EF1 α (1,2kbs) y CMV-IE (0,8kbs) (Powell et al., 2015).

Se debe tomar en cuenta si el promotor es tejido específico o no, si sostiene por más tiempo la expresión génica y que tengan el tamaño necesario para poder ser empacados en el vector utilizado (Powell et al., 2015).

Dos promotores muy utilizados en el uso de terapia génica restringida al hígado son el promotor de la α_1 -antitripsina y el de la globulina de unión a tiroxina que dirigen la expresión génica de forma restrictiva al hígado con una mínima invasión de otros tejidos (Powell et al., 2015).

c) Otras secuencias regulatorias.

En la figura 9 se observa un esquema de un casete génico utilizado en vectores virales AAV o lentivirales, y que puede adaptarse a otros vectores. Este incluye el promotor, el transgén y las secuencias de poli(A), tres elementos indispensables en la elaboración de cualquier casete génico. Por su parte en el diagrama se incluyen otros elementos como potenciadores, intrones, elementos reguladores post transcripcionales, secuencias complementarias de miARN endógenos, Secuencias LTR asociadas al uso de vectores LV, ITRs asociadas al uso de vectores AAV y potenciadores corriente arriba de la cola de poli(A) (Powell et al., 2015).

Figura 9. Esquema de un casete génico utilizado en vectores virales adeno asociados o lentivirales.



ITR: repeticiones terminales *invertidas* asociadas al uso de vectores AAV, LTR: secuencias terminales repetidas largas asociadas al uso de vectores LV, CE: potenciador o “enhancer”, Promoter: promotor. Transgene: transgén. I: intrón, W: elementos regulatorios postranscripcionales (WPRE), M: secuencias diana de miARNs endógenos, U: potenciador corriente arriba de la señal de poli (A). pA: señal de poli adenilación (poliA). Tomado de Powell et al. (2015).

- *Señal de poliadenilación (poliA)*

La señal de poliadenilación es un mecanismo de terminación de la transcripción incorporado en los genes que codifican por proteínas en los eucariotas. Esta secuencia se encuentra en la región 3' (Zhang et al., 2015).

La poliadenilación de un transcrito es crítico para la exportación nuclear, traducción y la estabilidad del ARNm. Su eficiencia es importante en la expresión del transgénico y es independiente del tipo celular (Powell et al., 2015).

- *Potenciadores de la señal de poli (A)*

La eficiencia de la poliadenilación es incrementada con el uso de un potenciador corriente arriba de esta, aumentando la expresión transgénica (Powell et al., 2015).

- *Secuencias complementarias a micro ARNs endógenos*

Los miARN fueron descubiertos en 1993, son moléculas pequeñas de ARN (21 a 23 nucleótidos) no codificantes para proteínas, que controlan la expresión proteica al actuar como reguladores postranscripcionales. Están implicados en la regulación de procesos biológicos como la diferenciación celular, la proliferación, la apoptosis y en el desarrollo embrionario y tisular. Actúan silenciando genes diferentes de aquellos de los que fueron transcritos, algunos poseen función promotora o coactivan diferentes genes (Giner et al., 2016).

En terapia génica tienen la capacidad de inhibir la transcripción transgénica al unirse a sus secuencias diana complementarias en el casete génico y permiten mantener la especificidad celular del transgén porque al unirse a sus sitios diana se restringe la expresión de este en sitios inespecíficos. Hay estudios donde con el uso de miARN

endógenos se puede dirigir la especificidad de un transgén únicamente a un grupo de células (Powell et al., 2015).

- *Secuencias terminales repetidas largas (LTR)*

Son secuencias de nucleótidos que flanquean los genes y secuencias estructurales, accesorias y regulatorias, necesarias para la iniciación de la transcripción reversa en el extremo 5' y su terminación en el extremo 3'; así como el empaquetamiento de los lentivirus (Poletti & Mavilio, 2021)

Se encuentran a cada extremo del casete génico. Los LTRs facilitan la integración de las secuencias contenidas en el plásmido al genoma del hospedero y poseen además una señal que le permite al virus auto inactivarse después de la integración (“Gene Therapy,” 2024).

En la región 3'LTR se ubican regiones reguladoras accesorias y poliadeniladas en el dominio señal (Poletti & Mavilio, 2021).

- *Repeticiones terminales invertidas (ITR)*

Son los únicos componentes propios del AAV que se mantienen en los vectores AAV (Pan et al., 2021). Estos se ubican a cada extremo del casete y se encargan de dirigir la recombinación intermolecular o intramolecular para formar genomas episomales circulares que puedan persistir en el núcleo (“Gene Therapy,” 2024).

Las ITRs contienen el origen de replicación y un auto iniciador, son necesarias para la regulación de la transcripción y proporcionan la señal para el empaquetamiento viral. Estas secuencias median la integración del AAV a las secuencias diana en el genoma del huésped o en plásmidos (Liñan-Torres et al., 2023).

- *Intrones*

La presencia de un intrón o secuencia intermedia del ARNm se describió por primera vez *in vitro*. El uso de estas secuencias es importante para el procesamiento del ARNm y para la expresión génica. Los intrones son ubicados entre el promotor y el transgén con el fin de que se aumente la expresión de este (Powell et al., 2015).

Su utilidad en la construcción de vectores parte de estudios en levaduras donde los genes con intrones poseen una mayor expresión génica que aquellos sin intrones. Los intrones también se encuentran asociados al transporte del ARNm y al ensamblaje proteico. Estudios han reportado que transcritos que son sujetos a “splicing” son transportados más rápidamente del núcleo al citoplasma que aquellos que no pasan por

este proceso. Los intrones procesan elementos regulatorios postranscripcionales que inducen eficientemente el transporte del ARNm fuera del núcleo y potencian su estabilidad. (Jo & Choi, 2015).

- *Elementos regulatorios postranscripcionales (WPRE)*

Son un elemento tripartito de 600 pbs que contiene elementos gamma, alfa y beta; contribuye a una expresión más fuerte del transgén en los sistemas AAV. Tiene la capacidad de potenciar la expresión de un transgén que carece de intrones (Choi et al., 2014).

Choi et al. (2014) realizan un estudio donde analizan la expresión de diferentes casetes utilizando vectores AAV. Lo que buscaban era evaluar la eficiencia de su expresión con el fin de maximizar el tamaño del transgén que es posible empaquetar en un virus AAV sin comprometer su expresión. En este estudio realizaron una comparación entre el uso de WPRE o intrones con el fin de medir si había diferencias en la expresión transgénica; los resultados mostraron que el uso de WPRE es crítico para una expresión más fuerte (Choi et al., 2014).

2.4.2. Supresión génica

La supresión génica consiste en suprimir un gen mutado para restaurar la competencia celular a través de la reducción de la expresión de este. En este caso se pueden utilizar ARNs que causan interferencia (Anguela & High, 2019).

Las terapias de supresión génica buscan disminuir la expresión de genes específicos al ser dirigidos contra genes mutados que producen proteínas alteradas, con el fin de disminuir sus niveles. Entre los diferentes tipos de terapias de supresión génica se encuentran los ARN de interferencia (ARNi) y los oligonucleótidos antisentido (ASOs) (Santos et al., 2023).

2.4.2.1. Supresión génica utilizando ARN de interferencia

En la mayoría de las células eucariotas, la presencia de un ARN doble banda (ARNdb) genera una respuesta de silenciamiento específico de secuencia conocida como ARNi. Este se conoce también como silenciamiento de genes postraduccional o “*knock down*” génico, y se considera una de las mejores herramientas biotecnológicas para analizar la funcionalidad de los genes. La fuente de este ARNdb puede ser exógena o endógena (genes nucleares) (Gamero et al., 2022).

Al dispararse el mecanismo primero ocurre una hidrólisis de la molécula en pequeños fragmentos que activan ribonucleasas que atacarán posteriormente al ARN banda sencilla (ARNbs) con cadenas complementarias. Este mecanismo es altamente conservado, ya que regula la expresión de genes que codifican proteínas e intervienen en la resistencia a ácidos nucleicos patógenos. Hay dos mecanismos en los eucariotas: uno de autonomía celular, donde el silenciamiento se da en las células donde se genera el ARNi o donde se introduce; y el de autonomía no celular que se caracteriza por una propagación del efecto lejos del lugar donde se inició (Gamero et al., 2022).

El mecanismo por el cual el ARNi desencadena el silenciamiento intracelularmente consiste la activación de una ARNasa III, una enzima llamada Dicer, que pertenece a la familia de las ribonucleasas. Esta enzima toma el ARNi y lo transforma en fragmentos de ARN de interferencia pequeños (siARN) (Gamero et al., 2022; Santos et al., 2023).

Normalmente los siARNs, son reconocidos e incorporados a un complejo enzimático llamado RISC (Complejo de silenciamiento inducido por ARN) el cual se encuentra formado por ribonucleoproteínas. RISC se ensambla y actúa como una helicasa que desenrolla al siARN y que se queda con la hebra anti-sentido o guía. El núcleo catalítico de RISC está unido a la proteína Argonauta 2 (Ago2) (Correa et al., 2008; Flumian et al., 2011). La cadena guía dirige el proceso de degradación del ARNm complementario y lo destruye a través de la enzima Ago 2, con lo que el siARN puede llevar a inhibir su traducción silenciándolo. La otra hebra es degradada durante el proceso (Gamero et al., 2022; Santos et al., 2023).

El acople del siARN al complejo RISC le da protección y le permite actuar de manera catalítica degradando varios ARNm (Flumian et al., 2011). Otro componente de este mecanismo es una ARN polimerasa dependiente de ARN que contribuye a amplificar la señal de inducción del mecanismo mediante la generación de ARN secundarios (Gamero et al., 2022).

Los siARN fueron descritos por Fire y Mello, a quienes se les otorgó el Premio Nobel de fisiología y medicina en el 2006 por este descubrimiento. Esta molécula de cadena doble consta de 21 a 23 nucleótidos con 2 o 3 nucleótidos libres en el extremo 3' de forma simétrica. Tiene la capacidad de ser introducida de forma exógena con el fin de contrarrestar la sobreexpresión de genes asociados a distintas patologías (Correa et al., 2008; Flumian et al., 2011).

Un ejemplo del uso de ARNi es Onpattro® (Patisiran), medicamento que en el 2018 se aprueba por FDA y EMA. Esta la primera droga aprobada que utiliza ARN pequeños

de interferencia para el tratamiento de polineuropatía en pacientes con amiloidosis transtiretina hereditaria. Esta patología se caracteriza por una amiloidosis secundaria a un mal plegamiento de la proteína transtiretina (TTR) mutante. La enfermedad se da por una mutación puntual donde se sustituye una valina por una metionina en la posición 30 (Urits et al., 2020).

La TTR es un transportador plasmático de la hormona tiroidea, el retinol y la tiroxina que al alterarse cambia su configuración de una proteína tetramérica a una monomérica. La proteína alterada puede depositarse en muchas regiones extracelulares de órganos, pero el estado más crítico se da cuando los depósitos se dan en células cardíacas y axonales (Urits et al., 2020).

Partisiran consiste en un siARN liposomal de doble cadena, dirigido contra TTR, específicamente contra la proteína mutante reduciendo su síntesis. La droga se formuló como una nanopartícula lipídica compuesta de lípidos catiónicos, fosfolípidos, colesterol y lípidos modificados con PEG; combinados en condiciones ácidas. Los liposomas fueron fusionados en una partícula de mayor tamaño a pH neutro. La célula diana son los hepatocitos, sitio de síntesis de la proteína (Urits et al., 2020).

Una vez que la partícula entra a circulación, se pierden los lípidos modificados con PEG y son reemplazados con proteínas séricas como la apoE que interactúa con los componentes lipídicos de esta y dirige la molécula al hígado, donde una vez dentro del hepatocito es direccionado al endosoma. Los lípidos catiónicos ionizables al entrar en contacto con el pH ácido del endosoma activan un proceso de osmosis que permite la liberación del siARN en el citoplasma (Urits et al., 2020).

El siARN es incorporado a RISC que lo separa en dos ARNbs, libera la hebra sentido y se deja su hebra guía para que una al ARNm complementario. siARN se une a una región conservada de la región no traducida 3' (3'UTR) del ARNm mutante y silvestre de TTR. Esto desencadena la activación de Ago2 en RISC que degrada el ARNm inhibiendo de esta forma la síntesis de la proteína TTR, con lo que disminuye sus niveles en suero y los depósitos tisulares (Urits et al., 2020).

Esta terapia permite una reducción de la acumulación de TTR en tejidos y con ello una mejora en la neuropatía y la función cardíaca. Se han observado reducciones de hasta un 80% dentro de los 10 a 14d de tratamiento y una máxima reducción de 88% a los 18 meses post inicio del tratamiento con dosis 1 vez cada 3 semanas (Urits et al., 2020).

2.4.2.2. Supresión génica utilizando oligonucleótidos anti-sentido (ASO)

ASO son oligonucleótidos sintéticos anti-sentido de banda sencilla complementarios a una secuencia específica de ARNm. Cuando se unen a su secuencia diana se pueden dar una variedad de mecanismos que llevan al bloqueo de la expresión génica, el mecanismo más común se basa en la inducción de una RNasa H endonucleasa (RNASEH1) (Roberts et al., 2020; Santos et al., 2023). La cual reconoce como sustrato el heterodúplex formado por el oligonucleótido (ADN) y el ARNm, catalizando la degradación del ARNm diana y silenciando la expresión del gen (Roberts et al., 2020).

Este sistema ha sido muy utilizado como un medio para regular a la baja genes que causan enfermedad o que modifican enfermedad (Roberts et al., 2020).

Existe otro mecanismo donde los ASOs realizan un bloqueo estérico al unirse a transcritos diana con alta afinidad, pero sin inducir su degradación, ya que no son sustratos de la RNasa H. Estos se utilizan para enmascarar secuencias específicas en el transcripto, con lo que interfieren en interacciones de este con el ARN o con proteínas (Roberts et al., 2020).

Una de sus aplicaciones es modular el “splicing” con el fin de excluir o retener selectivamente un exón específico; convirtiendo al exón en invisible para la maquinaria de empalme y produciendo alteraciones en el proceso de empalme (Roberts et al., 2020).

Los ASOs también se han utilizado para restaurar el marco de lectura en el proceso de traducción, con el fin de rescatar la producción de una proteína terapéutica; o para corromper el proceso, al omitir un exón. Con esto se altera la traducción del gen diana y se evita la producción de isoformas proteicas dañinas, o se promueve la expresión de aquellas que son beneficiosas (Roberts et al., 2020).

El uso de ASO permite la exclusión de un exón específico en un ARNm primario, al unirse alteran el ensamblaje del pre-ARNm omitiendo al exón diana, al que se unen (Pascual, 2012).

2.4.3. Edición génica

La edición génica incluye técnicas de ingeniería genómica que incorporan modificaciones sitio específicas dentro del ADN, estas se basan en el desarrollo de diferentes mecanismos que utilizan nucleasas para crear los cortes sitio específicos en el ADN y en la activación de los mecanismos de reparación del ADN celular (Khalil, 2020)

Una de las limitantes de la edición génica es que necesita activarse únicamente en células que se encuentren en replicación. El nivel de actividad va a depender del tipo de célula y del locus diana (Khalil, 2020).

La edición génica permite que una zona específica del genoma diana sea modificada por medio de una delección, adición o sustitución de nucleótidos (Howard et al., 2017). Resultando en la inactivación de los genes diana, adquisición de rasgos genéticos nuevos y la corrección de mutaciones genéticas patogénicas (Dunbar et al., 2018).

La búsqueda de realizar modificaciones sitio específicas en la molécula de ADN, inicialmente tenía como fin investigar la función de cada gen, posteriormente toma importancia la búsqueda de revertir o prevenir enfermedades producidas por mutaciones puntuales en el genoma, como la distrofia muscular o la fibrosis quística (Chávez-Jacobo, 2018). Las técnicas de edición génica explotan los mecanismos naturales de reparación del ADN para generar la sustitución de un nucleótido por otro o incluso la eliminación de un segmento de gran tamaño (Cota-Coronado et al., 2020).

Las estrategias más exitosas se basan en el empleo de las nucleasas de dedos de zinc (ZFN), las nucleasas tipo activadores de transcripción (TALEN's) que utilizan los principios de reconocimiento del ADN-proteína para introducir cortes específicos en la molécula de ADN; y las repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente inter espaciadas (CRISPR) asociadas a la proteína Cas9 (Chávez-Jacobo, 2018).

2.4.3.1. Mecanismos de reparación génica

La reparación del ADN cortado posterior a un proceso de edición génica se puede dar a través de dos mecanismos endógenos de autorreparación:

a) La unión de extremos no homólogos de ADN (NHEJ)

Este mecanismo modifica las terminaciones del ADN roto y los une sin homología o con poca homología generando delecciones o inserciones. Es propensa a errores y a la producción de mutaciones, su utilidad clínica radica en casos donde se busca anular un gen (Giono, 2017; Mao et al., 2008; Xu & Li, 2020).

b) Vía de reparación dirigida por homología (HDR) o recombinación homóloga

Esta vía repara el ADN utilizando como molde la región de ADN correspondiente del cromosoma homólogo o puede utilizar una molécula exógena de ADN provista para llevar a cabo la correcta unión de los extremos y reparar el daño. Gracias a este sistema

se da la reconstitución de la secuencia original; este cromosoma editado es heredado por las células hijas (Giono, 2017; Xu & Li, 2020).

2.4.3.2. Nucleasas de dedos de zinc (ZFNs)

En los 1990s se desarrolla una de las herramientas para la edición del genoma, las nucleasas asociadas a dedos de Zinc, enzimas que pueden cortar el ADN de doble hebra en un sitio específico (Cota-Coronado et al., 2020; Becker & Boch, 2021).

ZFNs fueron de las primeras nucleasas en ser utilizadas en un ensayo clínico. Tebas et al. (2014) realizaron un ensayo (NCT00842634) donde infundieron linfocitos T CD4+ autólogos con el gen de CCR5 modificado, inactivando a 12 pacientes HIV+ avirémicos crónicos que recibían terapia antiretroviral, este gen es co-receptor del HIV. En este estudio se observó una disminución en el ADN proviral en la mayoría de los pacientes sometidos a esta droga, los niveles fueron indetectables en 4 de los pacientes que fueron evaluados y se mantuvieron bajos al removerles la terapia antiretroviral. Ellos demostraron que la infusión de células T CD4 autólogas modificadas por esta tecnología fue segura (Tebas et al., 2014).

ZFNs son ideales para la ingeniería genómica porque combinan el reconocimiento específico de ADN de las proteínas con dedos de zinc con la actividad enzimática robusta pero restringida del dominio de corte de la enzima de restricción FokI, una nucleasa (Tebas et al., 2014). Hoy en día se pueden diseñar los dedos de zinc para dirigirlos contra ciertas secuencias del ADN a voluntad, con el fin de que puedan buscar dentro del genoma estas secuencias complejas de forma específica (Cota-Coronado et al., 2020).

Las nucleasas de dedos de zinc son enzimas de restricción, desarrolladas de forma artificial para la edición génica específica. Los dedos de zinc son factores transcripcionales, cada uno de ellos reconocen de 3 a 4 pbs en el ADN. Las ZFNs van a ser proteínas híbridas heterodiméricas donde cada subunidad contiene varios dominios de dedos de zinc y un dominio endonucleasa Fok1 que induce la formación de cortes de doble banda (Khalil, 2020). El dominio de dedos de zinc está formado por un arreglo en tándem de 2 aminoácidos de Cisteína (Cys₂), 2 aminoácidos de Histidina (Hys₂) y una molécula de Zinc (Tebas et al., 2014; Maeder & Gersbach, 2016) La región α hélice de cada dedo hace contacto con 3 a 4 pbs de ADN. Arreglos en tándem de dedos de zinc envuelven el ADN uniéndose a su secuencia diana (Maeder & Gersbach, 2016).

La endonucleasa de restricción bacteriana (proveniente de la bacteria *Flavobacterium okeanokoites*) tipo II FokI no tiene especificidad de secuencia y debe dimerizarse para cortar el ADN. Cuando los dominios de unión a ADN y los de corte al ADN se fusionan juntos, se forman unas tijeras genómicas altamente específicas (Tebas et al., 2014; Khalil, 2020).

Después de que este sistema realice el corte en el material genético, este puede ser reparado por HDR y NHEJ. La recombinación homóloga repara el corte preservando la secuencia de ADN original. Por su parte la unión de extremos no homóloga puede resultar en una inserción al azar o una delección de nucleótidos en el sitio de corte, teniendo como resultado una alteración en la secuencia primaria de ADN, la ventaja de esto es que puede ser utilizado para mutar un gen que se desea apagar (Tebas et al., 2014).

Los dedos de zinc se caracterizan por poseer un acceso óptimo a la cromatina, ser una opción práctica en casos donde se necesita un ajuste de encendido/apagado; y tienen la ventaja de poseer una proteína de poco tamaño que permite una mayor compatibilidad con los virus adeno asociados. Las ZFNs pueden entregarse por medio de electroporación o con vectores virales, mientras que otras técnicas de edición génica como los TALENs tienen una mayor dificultad de entrega *in vivo* debido al gran tamaño de su ADN y su alta probabilidad de recombinación. CRISPR Cas9 por su parte posee también dificultad de entrega *in vivo* debido a que Cas9 es una proteína grande de difícil empaquetamiento. Sin embargo, las ZFNs tienen la característica que necesita desarrollar una proteína para cada secuencia de ADN, por lo que en comparación con otras técnicas de edición génica tiene una mayor dificultad de programación y su citotoxicidad es de variable a alta (Khalil, 2020; Harmatz et al., 2022).

2.4.3.3. Nucleasas efectoras tipo activadores de la transcripción (TALENs)

La tecnología TALEN inició su uso en el 2010 y se ha utilizado ampliamente. Con esta técnica se puede cambiar el material hereditario en células vivas. TALEN se desarrolló a partir de la fusión de un efector tipo activador transcripcional y el dominio catalítico de la endonucleasa de restricción FokI (Becker & Boch, 2021).

Estas proteínas se encuentran en la bacteria patógena de plantas *Xanthomonas*, la cual se inyecta en las células de la planta, se desplaza al núcleo y se une a promotores diana induciendo expresión génica. Posee 3 dominios funcionales (ver figura 10): un dominio N- terminal que alberga la señal de secreción bacteriana y tiene actividad de

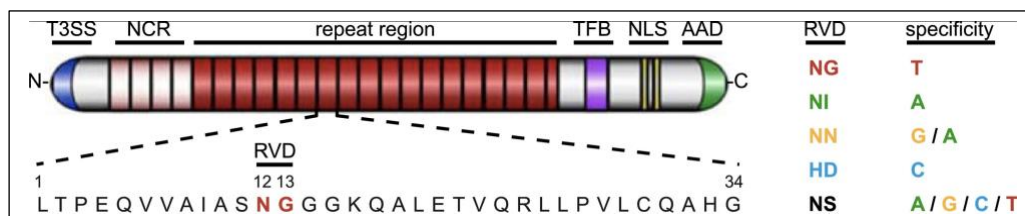
unión al ADN no específica; su dominio C- terminal alberga una zona de interacción para el factor de transcripción IIA de la planta, dos señales de localización nuclear funcionales y un dominio ácido de activación (Becker & Boch, 2021).

La unión al ADN específica y programable se da gracias a una secuencia de repeticiones en tándem de 33 a 35 aminoácidos, la especificidad la dan los aminoácidos que están en las posiciones 12 y 13 de cada repetición llamados di-residuos de repetición variable (RVD), con varias posibles combinaciones que reconocen un nucleótido u otras con mayor flexibilidad que reconocen 2, 3 o 4 nucleótidos. Los arreglos de estas repeticiones en tándem permiten las diferentes especificidades de unión al ADN, en la figura 10 se observa los RVD y sus especificidades asociadas (Becker & Boch, 2021).

TALENs forman una estructura helicoidal que envuelve el ADN y realiza una búsqueda rápida, imparcial, unidimensional y no rotacional de la secuencia diana (Becker & Boch, 2021).

Cada repetición forma dos alfa hélices que se conectan por una región bucle en donde se ubican los RVDs, es importante que siempre se incorporen dos RVDs muy fuertes y eficientes HD y NN (Ver figura 10). Las repeticiones de TALEN se pueden ajustar libremente, por lo que se puede colocar una pareja de TALEN para que corten específicamente en el nucleótido deseado dentro de la secuencia diana de ADN. Un TALEN puede reconocer secuencias diana normales o aquellas que tienen una delección de 1 pbs próxima a la secuencia diana, además algunos RVDs tienen la habilidad de discriminar entre nucleótidos con diferentes estados de metilación. Otra ventaja es que pueden discriminar entre dos secuencias diana que se diferencian sólo por un nucleótido metilado, lo que permite que sean utilizados en manipulación génica dependiente de metilación (Becker & Boch, 2021).

Figura 10. *Arquitectura de TALEN y las afinidades de diferentes combinaciones de RVD.*



Observar que está formada por una señal de secreción tipo III (T3SS) y 4 repeticiones no canónicas en el extremo N- terminal. Además, posee un sitio de unión a factor transcripcional (TFB), dos señales de localización nuclear (NLS) y un dominio de activación ácido (AAD) en el

dominio C- terminal. La zona de repeticiones de número variable altamente conservadas posee 33 a 35 aminoácidos en tándem. Tomado de Becker & Boch (2021).

TALEN se forma uniendo el dominio catalítico de la endonucleasa FokI a alguno de los dominios terminales de TALE, esto permite el corte del ADN (Becker & Boch, 2021).

Un ejemplo del uso de TALENs es publicado por Qasim et al. (2017), quienes demostraron que es posible utilizar esta técnica de edición para interrumpir el gen de CD52. Esta molécula es el antígeno diana de alemtuzumab en células T modificadas que expresan receptores de antígeno quiméricos (CAR T) contra CD19. Esta supresión génica permitió aumentar la supervivencia de las células en la presencia de un anticuerpo anti CD52 linfodepletor. Utilizando esta tecnología también se alteró la expresión en la superficie celular del receptor de células T $\alpha\beta$ (TCR $\alpha\beta$) minimizando el riesgo de la enfermedad injerto versus huésped. Ambas modificaciones permitieron el uso de CART de donantes alogénicos con el CMH compatible, en dos niñas con LLA B, permitiendo llevarlas a remisión y a trasplante de células madre (Qasim et al., 2017; Benjamin et al., 2022). Un ensayo donde se aplican estas CART universales (uCART) en adultos (NCT02746952) fue publicado en el 2022 y muestra resultados prometedores en el uso de esta terapia (Benjamin et al., 2022).

La gran versatilidad de TALE le permite unirse no solo a nucleasas sino a otros dominios como recombinasas, modificadores de transcriptomas, modificadores de histonas, transposasas, editores de bases, activadores y modificadores de epigenomas como metilasas o desmetilasas, entre otros. En general TALEN comparte con CRISPR eficiencia y especificidad, pero tiene como ventaja su naturaleza proteica pura y su posicionamiento altamente flexible. La principal desventaja que posee es lo laborioso de su construcción (Becker & Boch, 2021).

Una de las ventajas de TALEN es que muestra mayor tasa de éxito (99%) que CRISPR (90%) y que ZFNs (24%). Además, posee una menor posibilidad de actuar fuera de su secuencia diana y no tiene limitaciones de secuencia, mientras que las nucleasas con dedos de zinc poseen una mayor tasa de actividad fuera de diana y necesitan ingeniería para dirigirse a ciertas secuencias ya que tienen dificultad de unión a secuencias con bajo contenido de guanina. Por su parte CRISPR posee una alta capacidad de unión a su secuencia diana con mínimos efectos fuera de esta. TALEN posee una menor citotoxicidad que las ZFNs pero su uso implica un mayor costo y una mayor complejidad de diseño (Khalil, 2020).

2.4.3.4. Sistemas de repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) en conjunto con la proteína asociada 9 (CAS9)

El terreno de la edición génica dio un giro cuando en el 2012 Doudna y Charpentier mostraron que un sistema de defensa bacteriano compuesto por repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) y la proteína 9 asociada, una endonucleasa, podía utilizarse en procesos de edición génica. Se demostró que este sistema puede programarse eficientemente para que corte el ADN en los sitios de interés, a partir del diseño de un pequeño ARN guía complementario al sitio diana (Dunbar et al., 2018).

CRISPR-Cas es un sistema inmune adaptativo que existe en la mayoría de las bacterias y Arqueas, el cual evita que sean infectadas por fagos, virus y otros elementos génicos foráneos. Cuando un material genético invade las bacterias, las proteínas Cas lo cortan en fragmentos pequeños, luego estos fragmentos son incorporados en un arreglo CRISPR como nuevos espaciadores. En el momento en que el mismo agente vuelve a invadir la bacteria, el ARN de CRISPR, un transcrito que se produce a partir de arreglos entre las secuencias repetidas CRISPR y los espaciadores virales, lo reconoce rápidamente y se empareja con el ADN foráneo guiando a la proteína Cas a cortar estas secuencias diana de ADN viral, protegiendo al hospedero (Xu & Li, 2020).

Este sistema se encuentra formado por una endonucleasa Cas9 guiada por ARN y un ARN guía (ARNg) único copiado a partir de las secuencias virales almacenadas. La proteína Cas 9 posee dos dominios nucleasa HNH y RuvC, cada uno de los cuales corta una hebra del ADN diana. El ARNg durante el proceso de edición, recluta la proteína Cas9, juntos forman una ribonucleoproteína que puede unir y cortar el ADN diana a nivel de la doble hebra (Xu & Li, 2020). Este ARNg posee en su extremo 5' una secuencia que determina el ADN del sitio diana y en su extremo 3' una estructura dúplex de ARN que se une a Cas9 (Doudna & Charpentier, 2014).

El proceso de reconocimiento por parte del ARNg requiere de motivos protoespaciadores adyacentes (PAMs), una secuencia corta enriquecida con guaninas (Li et al., 2023).

Cas9 solo corta ADN diana para formar cortes de banda doble que son reparados a través de los mecanismos de reparación endógenos: HDR y NHEJ. Con esto se daña la secuencia del gen original resultando en su inactivación (Li et al., 2023).

CRISPR Cas9 se clasifica en 2 clases, 1 y 2; en 6 tipos que van del I al VI y muchos subtipos. Complejos efectores proteicos multi-Cas pertenecen a los sistemas de clase 1 y tipos I, III y IV; mientras que sistemas de una sola proteína efectora pertenecen a los sistemas de clase 2 y subtipos II, V y VI. El tipo II se obtuvo de *Streptococcus pyogenes* y es el mejor caracterizado y más utilizado actualmente (Xu & Li, 2020).

a) Aplicaciones de CRISPR/Cas.

A diferencia de los otros sistemas de edición génica, CRISPR no necesita diseñar la enzima para cada secuencia que se desea editar, por lo que es más simple y accesible. CRISPR simplifica el proceso de edición génica, se puede utilizar en gran variedad de aplicaciones como el bloqueo transcripcional, el reclutamiento de reguladores epigenéticos o la corrección de mutaciones a nivel de una sola base (Dunbar et al., 2018).

Se ha utilizado para encender o apagar genes específicos; en estudios a gran escala con múltiples ARNg que buscan identificar genes de un proceso celular en estudio. Ha sido utilizado en la creación de modelos animales de enfermedades humanas, para direccionar proteínas a secuencias específicas del genoma y en la modificación genética de plantas, entre otros (Giono, 2017).

Estudios en esta proteína, buscan mutar su dominio estructural e introducir efectores que actúen como herramientas regulatorias transcripcionales (Cas9 “muerto” o inactiva) y herramientas de sustitución de una sola base como los editores de bases de citosina (EBC), editores de base de adenina (EBA) y editores de “primers” (EP). Incluso se está investigando en reconocimiento y corte de ARN por medio de un sistema CRISPR asociado a Cas13a aislado de *Leptotrichia shahii* (Li et al., 2023).

Otras aplicaciones del Sistema CRISPR/Cas son:

- *Cas9 muerto*

A partir de este sistema se ha desarrollado el sistema Cas9 muerto (“dead” Cas9, dCas9), en el cual se introducen dos mutaciones puntuales H840A y D10A en los dominios nucleasas HNH y RuvC, perdiendo la capacidad de cortar el ADN sin afectar la unión a este. Al adicionar a dCas9 un represor o activador transcripcionales, se produce un sistema que puede activar o inhibir genes diana. Esta tecnología permite unir a dCas9 una citosina deaminasa o adenosina deaminasa, las cuales pueden

introducir mutaciones puntuales donde cambian bases de Citosina (C) o Guanina (G) por Timina (T) o Adenina (A) respectivamente; o de A, T por G, C respectivamente, en las zonas diana guiadas por un ARNg sin la necesidad de cortar el ADN. Esta técnica está siendo utilizada en múltiples líneas celulares, embriones, bacterias, plantas y animales con el fin de realizar mutaciones dirigidas de forma eficiente, gran cantidad de variantes génicas podrían ser reparadas a través de la sustitución de bases C por T o G por A (Xu & Li, 2020).

- *Cas9 acoplada a transcriptasa reversa*

Otra modificación es el sistema de edición principal desarrollado por Anzalone et al. (2019) donde se acopló una proteína Cas9 con actividad catalítica reducida a una transcriptasa reversa y a un ARN guía principal de edición (pegARN). El pegARN especifica el sitio de destino y codifica la edición deseada. Este grupo realizó más de 175 ediciones que incluyen inserciones, deleciones y 12 mutaciones puntuales, sin necesitar roturas del ADN de doble cadena ni el uso de secuencias moldes de ADN (Anzalone et al., 2019).

- *CRISPR Cas13*

El sistema CRISPR Cas13 posee una proteína Cas13 con un ARN guía que reconoce ARNs. Este sistema de edición génica posee actividad ribonucleasa donde al unirse al ARN banda simple (bs), corta específicamente la secuencia diana. La unión del sistema al ARN diana conlleva un cambio conformacional de Cas13 e induce la actividad catalítica de sus dominios nucleasa, llevando a silenciamiento del ARN (Huynh et al., 2020; Xu & Li, 2020).

Se han identificado 3 subtipos de proteínas Cas13, Cas13a, Cas13b y Cas13c. Cas13a se ha adaptado como herramienta para la detección de ácidos nucleicos, destrucción de ARNs y seguimiento de transcripciones. La naturaleza programable de las enzimas Cas13 las hace un punto de inicio atractivo para el desarrollo de herramientas de perturbación y unión a ARN (Cox et al., 2017)

Al mediar la degradación de moléculas de ARN, representa una alternativa para reemplazar o complementar el uso de ARNi al ser un mecanismo de mayor especificidad y altamente eficiente (Huynh et al., 2020; Li et al., 2023). Permitiría regular el “splicing”, ser utilizado en la detección viral y en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades del ser humano (Xu & Li, 2020).

b) Vectores utilizados en terapias con CRISPR/Cas

El uso de plásmidos de ADN como vectores para la entrega de los sistemas CRISPR es ideal debido a que no es fácilmente degradado, se puede producir en alta cantidad y puede modificarse fácilmente. Después de entrar a la célula el plásmido lleva a CRISPR/Cas 9 al núcleo donde se transcribe el ARNm que codifica por Cas9 y por el ARNg. La introducción de este sistema también puede realizarse a través del uso de ARNm, donde el proceso es más rápido y sencillo, pero está expuesto a una degradación más fácil de la molécula de ARNm y a una menor estabilidad de este. Los sistemas ribonucleoproteína (RNP) Cas9 son complejos, se caracterizan por la fusión *in vitro* de Cas 9 purificada, ARNg y RNPs, que al ingresar a la célula empiezan a funcionar. La introducción de RNPs a la célula se dificulta por su carga, por lo que las proteínas y ácidos nucleicos deben ingresarse por electroporación (Li et al., 2023).

CRISPR Cas9 se encuentra sujeto a degradación y aclaramiento inmune *in vivo* posterior a su liberación directa, es por ello la necesidad del uso de vectores que permitan su entrega a las células (Li et al., 2023). En la terapia génica *ex vivo*, la respuesta inmune contra Cas9 se puede eludir al utilizar una expresión transitoria de Cas9 y esperando a que la proteína sea eliminada antes de administrar las células corregidas al paciente. En la terapia *in vivo* el sistema es entregado por un vector viral y se produce una expresión a largo plazo de Cas 9, que en presencia del sistema inmune del receptor desencadena una respuesta contra la proteína. Esta respuesta se asocia a anticuerpos y en mayor medida a linfocitos T citotóxicos contra la proteína, desencadenados por exposición previa a las proteínas Cas9 de *Staphylococcus aureus* o de *Streptococcus pyogenes*. En terapia génica se tiene el riesgo de que la respuesta inmune lleve a la destrucción de las células corregidas, de ahí la importancia de buscar estrategias que eviten que esta se desencadene, como la inducción de tolerancia, el uso de corticosteroides o una expresión transitoria de la proteína que disminuya el impacto de la respuesta (Crudele & Chamberlain, 2018).

El uso de vectores virales Adeno asociados (AAV) no son adecuados para ciertas enfermedades debido a su baja capacidad de empaquetamiento y su baja habilidad de ser dirigidos a una célula diana específica. En el caso del sistema CRISPR Cas 9, este es muy grande comparado con otros sistemas de edición génica, por lo que excede la capacidad de los vectores AAV, los cuales son los que se están utilizando en la mayoría de los estudios en terapia génica (Li et al., 2023).

Para este sistema se podría utilizar vectores como los lentivirus, sin embargo, estos tienen el inconveniente de que se integran al azar en el genoma humano, desencadenan la respuesta inmune y se han asociado a causar cáncer (Li et al., 2023).

Por su parte el uso de vectores no virales como las nanopartículas lipídicas (liposomas), se están utilizando de forma importante en la clínica como mecanismo de transporte para la tecnología CRISPR. Estas son estables en suero, pero tienden a enriquecerse en el hígado debido a que este órgano es el que metaboliza lípidos, haciendo importante explorar su uso en el tratamiento de enfermedades hepáticas. Otras moléculas en investigación para este fin son nanopartículas poliméricas, que tienen las ventajas de baja inmunogenicidad, buena biocompatibilidad y alto potencial de modificación. También se están investigando nanomateriales biomiméticos y exosomas (Li et al., 2023).

c) Nuevos avances en el uso de tecnología CRISPR/ Cas

Para marzo del 2024 el Centro Nacional de Información en Biotecnología del Gobierno de los Estados Unidos (NCBI) reporta 53 ensayos clínicos desarrollándose utilizando CRISPR Cas9, algunos de ellos incluyen estudios en angioedema hereditario (NCT05120830) y varios ensayos clínicos donde se busca modificar vía CRISPR Cas 9 células madre progenitoras hematopoyéticas autólogas con el fin de tratar la drepanocitosis (NCT06287086 y NCT04774536) (NIH et al., 2024b).

Otros ensayos asociados a modificación de células madre hematopoyéticas buscan corregir el gen *HBB* y su posterior implantación en pacientes con beta talasemia (NCT03728322), hay ensayos clínicos en el uso de CRISPR Cas 9 para editar células CART con el fin de que ataquen CD19, CD20 y CD22, especialmente en pacientes donde las células tumorales han perdido la expresión de CD19, asociado a leucemias y linfomas refractarios (NCT03398967) (NIH et al., 2024b).

CRISPR ha sido utilizado con el fin de modificar las células T genéticamente para desactivar PD-1 (proteína de muerte celular programada) con el fin de tratar tumores como el cáncer de próstata donde no se puede realizar cirugía (NCT02867345), en el tratamiento de cáncer de vejiga con invasión muscular (NCT02863913) y con el fin de inducir inmunidad a largo plazo en pacientes con COVID 19 (NCT04990557) (NIH et al., 2024b).

En la base de datos del NCBI se reportan ensayos en pacientes HIV como el que utiliza EBT-101 para cortar y extraer del genoma humano el ADN proviral del HIV, que

no es destruido por antirretrovirales (NCT05144386), así como estos ensayos, muchos otros se encuentran en desarrollo (O'Hanlon, 2023; NIH et al., 2024b).

Actualmente se está utilizando en terapia génica con el fin de poder curar enfermedades monogénicas hematológicas como beta talasemia, drepanocitosis y hemofilia B (Xu & Li, 2020).

d) Primera terapia de edición génica aprobada para su uso

La primera terapia génica basada en edición génica aprobada por FDA y EMA en el 2023 es Casgevy (exagamglogene autotemcel), desarrollada por Vertex Pharmaceuticals y CRISPR Therapeutics (Rao et al., 2024). Es la primera terapia aprobada para el tratamiento de pacientes con drepanocitosis que sufren de crisis vaso oclusivas recurrentes o pacientes beta talasémicos dependientes de transfusiones, de 12 años o más (Rao et al., 2024).

Existen cerca de 25 mil pacientes en EEUU y en Europa que se beneficiarían de esta terapia. La drepanocitosis es un desorden hereditario causado por una mutación puntual en el gen *HBB* que codifica por la β globina del adulto, los adultos sanos poseen un complejo hemoglobínico que consiste en 2 α globinas y 2 β globinas. Los pacientes con drepanocitosis poseen un complejo hemoglobínico alterado debido a la polimerización de la β globina drepanocítica mutada al enfrentarse a niveles bajos de oxígeno, lo que conlleva a la formación de los glóbulos rojos con forma falciforme. Estas células tienen una vida media acortada y tienden a adherirse a los vasos capilares contribuyendo a eventos vaso oclusivos agudos que atentan contra la vida de estos pacientes y que necesitan de transfusiones sanguíneas inmediatas (Rao et al., 2024). Por su parte la beta talasemia se atribuye a diferentes mutaciones en el gen *HBB*, que resultan en una disminución de la producción de β globina y un exceso de α globina, con la consecuente formación de cadenas de α globina insolubles que se agregan y causan hemólisis intramedular. Los pacientes que presentan casos severos de β talasemia necesitan de transfusiones de glóbulos rojos empacados regulares para sobrevivir (Rao et al., 2024).

Casgevy (Exa-cel) utiliza CRISPR Cas 9 para suprimir la expresión del gen *BCL11A* (Rao et al., 2024). A partir de estudios en polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en adultos con mayor expresión de la hemoglobina fetal (HbF), se observó que algunos de estos ocurren en el locus del gen *BCL11A* y que se asocian a una menor severidad en ambas patologías (Frangoul et al., 2021). El *BCL11A* es un factor de transcripción que contiene dedos de zinc y que reprime la expresión de la γ globina, y por ende de la

HbF. La HbF puede compensar la β globina defectuosa al formar tetrámeros $\alpha_2 \gamma_2$ en pacientes con drepanocitosis y beta talasemia (Frangoul et al., 2021; Rao et al., 2024). Casgevy es un sistema de edición génica *ex vivo* en células madres hematopoyéticas (HSC) del paciente, que posterior a su modificación se le re infunden a este (Rao et al., 2024).

La edición génica se realiza *ex vivo* por medio de la introducción de un complejo CRISPR/Cas9 ribonucleoproteína (RNP) utilizando electroporación en células CD34+. El ARNg incluido en el complejo RNP permite al CRISPR/Cas 9 hacer un corte preciso de doble banda en el sitio de unión del factor de transcripción GATA1, en la región potenciadora específica del gen *BCL11A* eritroide. Con esto se introduce una mutación en el sitio de unión de GATA1 y la expresión de *BCL11A* es reducida, lo que lleva a un aumento en la producción de las γ globinas y por lo tanto de la HbF (Frangoul et al., 2021). Frangoul et al. (2021) exponen los resultados para los primeros dos pacientes, uno con drepanocitosis y otro con beta talasemia, en los ensayos clínicos (NCT03655678 y NCT03745287). Los resultados mostraron aumentos de la HbF a partir del mes 2 post infusión para ambos pacientes, el paciente drepanocítico aumentó sus niveles de HbF de 9,1% pre-infusión a 43,2% post infusión y disminuyó los de HbS de 74,1% pre-infusión a 52,3% a los 15 meses post infusión. Mientras que el paciente con beta talasemia pasó de tener HbF en 0,3 g/dL a 13,1 g/dL a los 18 meses post infusión (Frangoul et al., 2021).

e) Ventajas y desventajas del uso de CRISPR Cas 9 en la edición génica

Entre las ventajas del uso de esta técnica de edición génica se pueden destacar la facilidad de diseño, bajo costo, alta eficiencia, buena rentabilidad y un ciclo corto. Sin dejar de lado que en la actualidad se han desarrollado variantes de CRISPR-Cas9 de alta fidelidad con poco o ningún efecto detectable fuera de la secuencia blanco (Dunbar et al., 2018; Xu & Li, 2020). Esta tecnología es altamente específica y simple de diseño, con un clivaje altamente eficiente, facilidad de edición génica y de programación. Se ha visto que presenta una tasa alta de éxito que ronda el 90% con una tasa de mutación de un 20% con baja citotoxicidad (Khalil, 2020). Todo esto la convierten en la tecnología de edición génica más utilizada en los laboratorios moleculares alrededor del mundo (Xu & Li, 2020).

Sin embargo, se ha visto que su uso en regiones de alta cromatización en el genoma podría ser una limitante, debido a que podría no tener facilidad de acceso a estas (Li et al., 2023). Una de sus principales dificultades es su entrega *in vivo*, debido a la baja

capacidad de empaquetamiento en vectores virales. Por su parte *in vitro* es fácilmente entregado (Khalil, 2020).

Las técnicas de edición génica se enfrentan a varios desafíos, es importante realizar un corte preciso y eficiente en la zona donde se encuentra la mutación o en la zona donde se desea editar, es por ello que se deben desarrollar técnicas que detecten si se generaron cortes no deseados en el genoma. La reparación del ADN debe ser la correcta, lo cual se dificulta por la baja eficiencia de la vía del HDR en comparación con la del NHEJ. En el caso de estudios en embriones uno de los retos es llevar la terapia génica en algún punto lo suficientemente temprano para que todas las células del organismo posean la secuencia modificada y que no se genere mosaicismo, donde algunas de las células portan el gen modificado y otras el original (Giono, 2017).

2.5. Métodos para la transferencia génica

La terapia génica funciona mediante la introducción del material genético en el núcleo celular, para esto se utilizan diferentes sistemas llamados vectores. Estos son vehículos que despachan el material genético a la célula blanco y tienen un importante rol en la eficacia y seguridad del producto (Zu & Gao, 2021; Silva, 2022).

Existen muchas barreras que pueden causar la captura o destrucción de los ácidos nucleicos terapéuticos antes de que lleguen a su meta, es por ello que se desarrollan estrategias con el fin de evadir estos problemas. Uno de ellos es la carga superficial, para ello la molécula se blinda con polietilenglicol (PEG) con el fin de aumentar la estabilidad estérica. Otro obstáculo importante para los ácidos nucleicos es que al ser liberados tienden a ser degradados por el ambiente ácido y rico en enzimas de los endosomas y lisosomas intracelulares, después de su absorción celular vía endocitosis, la polietilenimina (PEI) permite evadir esta degradación a través del efecto esponja de protones, donde escapa del endosoma, este puede ser incorporado en las nanopartículas, mejorando el proceso. Sin embargo el uso de PEI tiene sus límites en la aplicación *in vivo* debido a su alta citotoxicidad (Cheng et al., 2021).

Los vectores deben diseñarse de acuerdo a los diferentes mecanismos utilizados para cada terapia génica que se desea utilizar. El desarrollo de un vector efectivo y seguro necesita de una comprensión de las propiedades biológicas y fisicoquímicas del material genético a entregar (plásmidos de ADN, ARNm, iARN, siARN, entre otras), del vector utilizado para entregarlo y de la fisiología de la célula diana. Por ejemplo, el transporte de moléculas de ADN necesita mecanismos que lo entreguen al núcleo y que

permitan su empaquetamiento a pesar de su tamaño. El ARN no necesita entrar al núcleo para que se exprese, sin embargo, es menos estable que el ADN. Un ejemplo del proceso de selección del sistema de entrega fue el desarrollo de Patsiran, para el cual se probaron alrededor de 300 lípidos ionizables, que permitieran la entrega del siARN (Zu & Gao, 2021)

Macromoléculas cargadas negativamente como el ADN son repelidas por la carga negativa de las membranas celulares. Moléculas como CRISPR Cas9 son aún más difíciles de entregar debido a sus diferentes cargas, es por ello que se necesitan sistemas diseñados para la entrega de estos materiales a la célula (Cheng et al., 2021).

Entre los requerimientos de un vector está el proteger el ácido nucleico de la degradación y prolongar su vida media en circulación, además debe de promover el reconocimiento de células diana y mejorar la captación celular y el escape intracelular (Cheng et al., 2021). Existen dos tipos de vectores: los virales y los no virales (Zu & Gao, 2021).

2.5.1. Vectores no virales

Los vectores no virales utilizan métodos físicos o químicos para introducir el material genético a la célula (Silva, 2022). Estos métodos aparecen como alternativa al uso de vectores virales, ya que el uso de estos ha generado controversia porque aunque no causan daño a los pacientes, si pueden despertar la respuesta inmune del receptor y tienen el riesgo de insertar el transgén de forma errónea. Es por esto que se siguen buscando métodos no virales para su uso en la terapia génica (Zu & Gao, 2021)

Los vectores no virales (ver tabla 4) poseen poca citotoxicidad, inmunogenicidad y mutagénesis, sin embargo, presentan desafíos críticos como la eficiencia en la transferencia génica, especificidad, duración de la expresión génica y seguridad (Zu & Gao, 2021).

2.5.1.1. Métodos químicos

Los métodos químicos utilizan materiales naturales o sintéticos compatibles con el ser humano y con baja respuesta inmune contra ellos. Incluyen moléculas lipídicas, polímeros y nanopartículas (Silva, 2022). Se pueden dividir en materiales orgánicos como liposomas, PEI y sus derivados, polipéptidos catiónicos, dendrímeros y sus derivados, quitosano y sus derivados, poliuretano, así como ciclodextrina y sus derivados; e inorgánicos incluyendo nanopartículas de oro, nanotubos de carbono,

grafeno, puntos cuánticos, nanopartículas convertidas y nanopartículas de sílice (Cheng et al., 2021).

a) Materiales orgánicos

- *Polímeros*

Los polímeros catiónicos han sido muy investigados debido a su estructura química versátil y alta capacidad de transporte, neutralizan las cargas negativas del material genético para formar un complejo con el ADN o ARN que transportan a las células (Zu & Gao, 2021). Algunos los consideran nano transportadores con alta diversidad en su estructura, composición y grupos funcionales, ejemplos de ellos son la polilisina, poly (amino ésteres) y los dendrímeros de poliamina; utilizados en estudios de terapia génica (Cheng et al., 2021).

Los polímeros biodegradables tienen una ventaja en cuanto a su baja citotoxicidad comparativa, pueden ser sintéticos o naturales. Los sintéticos tienen la capacidad de ser versátiles y consistentes de un lote a otro, pero poseen una interacción celular insuficiente. Los polímeros naturales, a diferencia de los sintéticos, poseen una alta biocompatibilidad, pero se han asociado a problemas de un lote a otro debido a las diferencias de origen (Zu & Gao, 2021).

Uno de los polímeros que se ha utilizado es PEI, polímero considerado el estándar de oro de los vectores no virales por su alta capacidad de transfección, sin embargo, es inespecífico y al ser no biodegradable se acumula alrededor de la célula causando citotoxicidad celular. Otro polímero no biodegradable son las polimetacrilatos, polímeros catiónicos sintéticos basados en vinil, menos tóxicos pero con baja habilidad de interaccionar con membranas. El polyvinyl imidazole es otro polímero soluble en agua no biodegradable, no tóxico. Los tres poseen la habilidad de escapar del endosoma por medio de la activación del “efecto esponja de protones”, un efecto osmótico que induce la explosión del endosoma, mejorando el proceso de transfección (Zu & Gao, 2021).

Tabla 4 Vectores no virales utilizados en terapia génica según el método utilizado y el tipo de material utilizado.

Método	Tipo de material	Material de transporte
Químicos	Orgánicos	Lípidos: Liposomas
		Polipéptidos catiónicos
	Inorgánicos	Polímeros de: <ul style="list-style-type: none"> • Poliuretano • Ciclodextrina y sus derivados • Polietilenimina y sus derivados • Dendrímeros y sus derivados • Quitosano y sus derivados • Polimetacrilatos • Poly (vinyl imidazole) • Poliláctida
		<ul style="list-style-type: none"> • Nanopartículas de oro, convertidas o de sílice • Nanotubos de carbono • Grafeno • Puntos cuánticos
Físicos	Señales externas	<ul style="list-style-type: none"> • Estímulos eléctricos • Magnetismo • Ultrasónicos • Gradientes de temperatura • Irradiación de luz
	Señales internas	<ul style="list-style-type: none"> • Cambios en el pH • Potencial redox • Actividad enzimática • ROS • ATP • Hipoxia
	Inyección directa de ADN	<ul style="list-style-type: none"> • Fosfato de calcio • Electroporación • La pistola génica • Fotoporación • Sonoporación

ADN: ácido desoxirribonucleico, ROS: especies reactivas de oxígeno. ATP: trifosfato de adenosina. Elaborado a partir de Cheng et al. (2021); Zu & Gao (2021) y Silva (2022).

El quitosano es un polisacárido lineal, altamente biodegradable, biocompatible y no tóxico, soluble en pH ácido. El uso de quitosano con alto grado de polimerización induce que se abran las uniones estrechas entre las células, este puede además ser modificado con ligandos para mejorar la entrada celular y la especificidad, lo que lo hace ideal para terapia génica. Actualmente se está estudiando el uso de quitosano recubierto de nanopartículas en terapia génica contra cáncer cerebral (Zu & Gao, 2021). Otra línea de polímeros que se están estudiando son los poly β amino ésteres, biodegradables, anfifílicos, con alta capacidad de transfección y una eficiente liberación del endosoma. Estos polímeros han sido modificados por diferentes investigadores para que puedan aceptar cargas catiónicas y aniónicas y mejorar su capacidad de transfección. (Zu & Gao, 2021).

La poliláctida es otro polímero sintético biodegradable, se metaboliza in vivo en forma de glucosa, eliminándose sin efectos adversos. Está siendo investigado como vector en terapia génica. Uno de los vectores en estudio es el uso de aminoglicósidos como vectores catiónicos poliméricos (Zu & Gao, 2021).

- *Lípidos*

El uso de lípidos permite encapsular al transgén, lo protegen de la degradación y lo entregan al interior celular a través de la fusión con la membrana celular. La mayoría de los lípidos constan de grupos de cabeza cargados positivamente que se unen a los grupos fosfato aniónicos de los ácidos nucleicos mediante interacciones electrostáticas para formar lipoplexos. Estos usualmente se presentan como nanopartículas lipídicas sólidas, liposomas o emulsiones lipídicas. Son rápidos de fabricar, eficientes y escalables al material que se desea entregar, además son biodegradables, de baja toxicidad y pueden incorporar tanto sustancias hidrofílicas como hidrofóbicas. Tiene alto potencial en terapia génica (Zu & Gao, 2021; Silva, 2022). En el 2020 se aprobó por la FDA un tratamiento (Inclisiran) para hiperlipidemia en Estados Unidos basada en el uso de lípidos como vectores de un pequeño ARN interferente, vía subcutánea. Otro grupo en estudio son los tensoactivos géminis, los cuales poseen baja tensión superficial y una mayor capacidad de solubilización y menor toxicidad (Zu & Gao, 2021).

Los liposomas son vesículas con una bicapa de fosfolípidos que contienen dos nichos ambientales uno hidrófobo y otro hidrófilo. Por lo tanto, tienen la capacidad de liberar moléculas tanto hidrófobas como hidrófilas. Se utilizan ampliamente para la entrega de ARN y ADN. Los más comunes son liposomas catiónicos, estos son más tóxicos que los liposomas neutros, pero tienen mayor capacidad de carga genética y mayor capacidad de transfección. Su toxicidad puede mejorar mediante la modificación

de su superficie con polímeros biocompatibles como el polietilenglicol (PEG), se utilizan para llevar sistemas CRISPR Cas9 *in vivo* (Cheng et al., 2021).

- *Péptidos*

Son cadenas cortas de 2 a 50 residuos de aminoácidos unidos vía uniones peptídicas, son biocompatibles y biodegradables, además son diseñados para que sirvan como bloques de construcción de estructuras autoensambladas a nanoescala (Zu & Gao, 2021).

El material genético interactúa por medio de uniones electrostáticas o conjugación formando peptiplexos. Moléculas estables que resisten la degradación y son menos lábiles a pH ácidos o básicos y a altas temperaturas (Zu & Gao, 2021).

b) Materiales inorgánicos: nanopartículas

Hoy en día, los portadores inorgánicos más comúnmente reportados incluyen sistemas basados en sílice, como nanopartículas de sílice mesoporosas, nanopartículas de oro, nanopartículas magnéticas, nanotubos de carbono, grafeno, nanopartículas de conversión ascendente y puntos cuánticos (Zu & Gao, 2021).

Las nanopartículas son materiales de 10 a 1000 nm, aquellas con más de 200 nm tienden a acumularse en el hígado. Su permeabilidad y retención mejoradas los hacen ser importantes en las investigaciones en terapia génica (Cheng et al., 2021).

Las nanopartículas de oro pueden acoplarse a polímeros o lípidos y son menos tóxicas, el ADN se adsorbe a la superficie de la nanopartícula positivamente cargada. Los nanotubos de carbono facilitan la penetración génica a través de la membrana celular independiente de la endocitosis celular. Un ejemplo del uso de nanotubos es descrito por Li et al. (2020), en este trabajo acoplan un ARN de interferencia con el fin de lograr un silenciamiento eficiente y específico de la expresión génica de Caspasa 3, para lo que utilizaron un nanotubo unido a este ARN. El estudio destaca la buena solubilidad en agua, la biocompatibilidad y la alta eficiencia de transfección de estas nanomoléculas (82%) en cardiomiocitos, protegiendo de los efectos de la apoptosis de las células del miocardio, remodelación ventricular y disfunción cardíaca en modelos murinos (Li et al., 2020; Zu & Gao, 2021).

Los nano transportadores son sistemas eficientes para cargar y descargar ácidos nucleicos, estos participan en la transfección de ácidos nucleicos respondiendo a diferentes formas de estímulos internos y ambientales. Entre los requerimientos de un

vector está el proteger el ácido nucleico de la degradación y prolongar su vida media en circulación, además debe de promover el reconocimiento de células diana y mejorar la captación celular y el escape intracelular. Entre sus ventajas están el bajo costo, preparación simple, facilidad de producción en masa, seguridad y la capacidad de entregar un gran número de genes exógenos; son fáciles de almacenar y tienen una vida media prolongada (Cheng et al., 2021). Además, poseen relación superficie - volumen más alta, mejor biocompatibilidad, estabilidad aceptable, carga superficial controlada y un mayor tiempo en circulación (Cheng et al., 2021).

Los nanotransportadores utilizan los estímulos ambientales extracelulares para estimular la señalización. Por ejemplo, una nanopartícula puede utilizar aminolípidos sensibles al pH para liberar su transgén. Existen dos categorías según su respuesta tanto a efectos del entorno interno como externo (Cheng et al., 2021).

c) Señales derivadas del entorno interno.

Los estímulos internos conllevan cambios en las condiciones fisiológicas y patológicas de las células y tejidos. Son señales a las que estas moléculas responden. Incluyen cambios en el pH, potencial redox, actividad enzimática, presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), trifosfato de adenosina (ATP) e hipoxia (Cheng et al., 2021).

La variabilidad de pH intracelulares se ha investigado extensivamente en los ensayos de terapia génica, en estudios de tumores malignos e infecciones. Donde se acoplan a las nanopartículas grupos pH sensibles como aminas o ácidos carboxílicos. Por ejemplo, una nanopartícula puede utilizar aminolípidos sensibles al pH para liberar su transgén (Cheng et al., 2021).

En el caso del potencial redox, la adición de enlaces disulfuro hace a la molécula sensible a este potencial. Esta molécula es reducida en condiciones de alto potencial redox produciendo rotura del enlace y la liberación del ADN. Los vectores utilizados con el fin de responder a esta señal son PEI, liposomas y polímeros catiónicos (Cheng et al., 2021).

Otras señales incluyen la activación de una vía enzimática asociada a alta selectividad y especificidad, las ROS en diferentes niveles a nivel tisular, niveles de ATP intra y extracelular; y las reacciones inflamatorias (Cheng et al., 2021).

d) Señales derivadas del entorno externo

Los estímulos externos se refieren a cambios externos inducidos en los sistemas biológicos. Incluyen estímulos eléctricos, magnéticos, ultrasónicos, gradientes de temperatura e irradiación de luz (Cheng et al., 2021).

La temperatura de la región diana produce un estímulo que lleva a la liberación del material génico. Algunos de los vectores sensibles a temperatura son liposomas catiónicos; micelas, hidrogeles y vesículas poliméricas; nanopartículas de oro y otros polímeros. La activación se realiza a través de la introducción de moléculas que se disocian con luz como el azobenceno o el nitrobenzil, las que al contacto con la luz pueden transformar morfológicamente al nano transportador, degradarlo o inducir una rotura en él. Entre los estímulos se puede utilizar luz ultravioleta (potencialmente causa daño al ser mutagénica), luz visible o infrarroja. La luz infrarroja posee mayor penetración a nivel tisular (Cheng et al., 2021).

La entrega de genes vía ultrasonido por perforación o cavitación acústica ha sido ampliamente estudiada en el tratamiento de cáncer y enfermedades neurodegenerativas, tienen alta penetrabilidad a tejidos, posicionamiento certero, seguro y poco invasivo. El uso de magnetismo se asocia a poca interacción física, es un método seguro y eficaz (Cheng et al., 2021).

Existe una gran variedad de estímulos que pueden ser utilizados para la fabricación de estos vectores y que deben ser aún desarrollados con el fin de mejorar y dar mayor seguridad a los tratamientos de terapia génica.

- *Métodos físicos*

Los métodos físicos incluyen inyección directa de ADN, transfección mediada por fosfato de calcio, electroporación y otras (Silva, 2022). Se pueden describir:

- *La electroporación*

Técnica física basada en el uso de pulsos eléctricos para formar poro en la membrana celular, permitiendo la introducción del material genético, se ha estudiado *in vivo* y *ex vivo* (Silva, 2022).

- *La pistola génica*

Se utiliza con el fin de utilizar la fuerza para introducir el material genético, consiste en disparar nanopartículas de oro recubiertas con el transgén a la célula (Silva, 2022).

- *La sonoporación*

Esta técnica utiliza el sonido para hacer el poro (Silva, 2022).

- *La fotoporación*

Esta técnica utiliza la luz para hacer el poro a nivel de la célula diana (Silva, 2022).

2.5.2. Vectores virales:

El vector más común es un virus que ha sido alterado genéticamente para llevar ADN humano normal. Es un modelo ideal para administrar un transgén, debido a que su evolución les ha permitido encapsular y entregar sus genes en células humanas y son altamente eficaces al ingresar a la célula. Esta habilidad ha sido utilizada con el fin de manipular el genoma viral para remover genes que causan patología e insertar genes terapéuticos asociados a los genes virales que los hacen eficientes en cuanto a ingreso celular y otras propiedades específicas (Patil et al., 2018; Silva, 2022). Es posible utilizarlos como un caballo de troya, donde se utiliza su cápside o envoltura importantes en el proceso de infección e introducir el transgén en su interior. Estos son los vectores de mayor uso en la terapia génica (Silva, 2022).

Para determinar el mejor vector a utilizar, se deben tomar en consideración características como la duración de la expresión génica, el tamaño del material genético a administrar, la célula blanco y la inmunogenicidad (Silva, 2022).

La mayoría de los vectores utilizados para el transporte génico in vivo son los adenovirus y los virus adeno asociados; los principales vectores utilizados para el transporte génico ex vivo son los lentivirus y los retrovirus. Los virus herpes simplex se han utilizado principalmente en terapias génicas contra el cáncer debido a su capacidad oncolítica intrínseca (Zhao et al., 2021),

En la tabla 5 se observa un cuadro comparativo de los virus más utilizados en terapia génica (Zhao et al., 2021).

Se han aprobado más de una docena de productos de terapia génica viral para tratar el cáncer, enfermedades infecciosas y enfermedades monogénicas, pero las investigaciones clínicas aún están en desarrollo (Zhao et al., 2021).

Tabla 5. Cuadro comparativo de los diferentes vectores virales utilizados en terapia génica.

Características	Lentivirus	Adenovirus	AAV	Retrovirus	Herpes virus
Genoma Viral	ARNbs	ADNdb	ADNbs	ARNbs	ADNdb
Requerimiento de división celular para la célula diana	Fase G1	Sin requerimiento	Sin requerimiento	Si	No
Capacidad de empaque	8 kb	8-30 kb	5 kb	8kb	Más de 30kb
Respuesta inmune al vector	Poca	Alta	Poca	Poca	Alta
Capacidad de Integración al genoma celular	Si	Pobre	Pobre	Si	Pobre
Expresión a largo plazo	Si	No	Si	Si	Si
Ventaja principal	Persistencia del gen transferido	Alta efectividad de transducción de varios tejidos	Asociado a respuesta inmune pobre, no es patogénico.	Transferencia a persistente en células en división	Alta capacidad de empaquetamiento y latencia.
Terapia génica	<i>Ex vivo</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vivo</i>	<i>Ex vivo</i>	

AAV: virus adeno asociados, ADN: ácido desoxirribonucleico, ARN: ácido ribonucleico, Kb: kilobases. Fuente: Modificado a partir de Anguela & High (2019), "Gene Therapy" (2024) y Shirley et al. (2020).

2.6. Células diana de la terapia génica:

Existen una gran variedad de células en las que se está investigando el uso de la terapia génica, algunas de ellas son (Patil et al., 2018):

- Linfocitos
- Células madre hematopoyéticas
- Fibroblastos
- Hepatocitos
- Queratinocitos
- Mioblastos de músculo esquelético
- Células epiteliales de vías respiratorias
- Células del endotelio vascular

- Células tumorales

Uno de los puntos importantes del diseño de las terapias génicas, es la construcción de los vectores analizando cómo estos responderán a su entorno y reconocerán sus ligandos. Es por ello que el estudio de la patogénesis de la enfermedad, y las características patológicas de las células y tejidos enfermos es uno de los puntos clave en el diseño de estas terapias (Li et al., 2023).

La aplicación de la terapia génica en estas células se basa en la inserción del material genético *in vivo* o *ex vivo*, bajo el cual podemos clasificar la terapia génica.

2.6.1. Terapias *in vivo*

La terapia génica *in vivo* implica la administración directa al paciente de un vector que porta un transgén terapéutico (Bulcha et al., 2021). Estas terapias génicas implican la infusión ya sea intravenoso o por inyección en el órgano diana (Zhao et al., 2021).

Para este tipo de terapia se necesita de un vector con el fin de transportar la terapia génica en la célula (Zhao et al., 2021). Usualmente se asocia a vectores como adenovirus, AAV y retrovirus. Las técnicas *in vivo* son atractivas ya que no necesitan de los obstáculos prácticos asociados a la recolección, cultivo, manipulación y trasplante de células. Se han tenido ensayos alentadores asociados a la administración *in vivo* de genes en hígado o a la retina y se están estudiando su uso *in vivo* en tejidos como cerebro o músculo (Dunbar et al., 2018).

2.6.2. Terapias *ex vivo*

La terapia génica *ex vivo* implica la extracción de células de un paciente o de una fuente alogénica, modificación genética mediante un vector que porta un transgén terapéutico, selección y expansión en cultivo e infusión para reintroducir las células diseñadas nuevamente en el paciente (Bulcha et al., 2021).

Los enfoques de terapia génica *ex vivo* para tratar enfermedades genéticas se han dirigido principalmente a las células madre hematopoyéticas (HSC), las células que se renuevan automáticamente y que dan lugar a todos los linajes de células sanguíneas. Debido a las múltiples divisiones celulares que experimentan estas células, ya sea para autorrenovarse o para diferenciarse en un tipo de célula particular, el gen terapéutico debe integrarse de manera estable en el genoma del huésped para estar presente en todas las células hijas que se producen a partir de esta (Anguela & High, 2019).

2.7. Terapias génicas aprobadas actualmente

En la tabla 6 se muestran algunas de las terapias génicas aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos y/o en Europa por la European Medicines Agency (EMA), para el tratamiento de diferentes patologías como Linfoma de células B, mieloma múltiple, beta talasemia, SCID y otras.

Como se observa en la tabla 6 después del 2016, con la aprobación de Strimvelis por EMA para el tratamiento de SCID, se da un aumento acelerado de investigaciones en nuevos tratamientos basados en terapia génica. Algunas de las cuales ya cuentan con la aprobación tanto de FDA como de EMA para el tratamiento de diferentes patologías.

En los últimos 5 años ha aumentado exponencialmente el número de terapias génicas aprobados como tratamientos. Para el año 2022 se aprueba Hemgenix, la primera droga aprobada por EMA y FDA para el tratamiento de hemofilia B. A finales de ese mismo año y principios del 2023 EMA y FDA aprueban para su uso comercial a Roctavian, la primera droga aprobada para el tratamiento de Hemofilia A. Posteriormente FDA aprueba en el 2024 Beqvez también para el tratamiento de hemofilia B la cual aún se encuentra pendiente de aprobación por EMA (EMA, 2024; FDA, 2024).

Tabla 6. Tratamientos aprobados en terapia génica a nivel mundial

Nombre del Producto	Enfermedad Blanco	Farmacéutica Propietaria	Aprobación Comercial	Aprobación
Glybera (alipogene tiparvovec)	Deficiencia de la Lipoproteín lipasa	uniQure biopharma B.V.	EMA	2012
Strimvelis	ADA-SCID	GSK	EMA	2016
Yescarta (axicabtagene ciloleucel)	Linfoma B difuso de células grandes	Kite Pharma Inc.	FDA	2017
Luxturna (voretigene neparvovec-rzyl)	Distrofia retinal	Spark Therapeutics Inc.	FDA, EMA	2017
Kymriah (tisagenlecleucel)	Linfoma no hodgkin de células B	Novartis Pharmaceuticals Corp.	FDA, EMA	2017
Onpatro (Patisirán)	Amiloidosis hereditaria por transtiretina	Alnylam Pharmaceuticals, Inc.	FDA, EMA	2018
Zolgensma (onasemnogene abeparvovec-xioi)	Atrofia muscular espinal	Novartis Gene Therapies, Inc.	FDA, EMA	2019
Tecartus (brexucabtagene autoleucel)	Linfoma de células del manto	Kite Pharmaceuticals, Inc.	FDA, EMA	2020
Abecma (idecabtagene vicleucel)	Mieloma múltiple	Celgene Corp. (Bristol-Mayers Squibb Company)	FDA, EMA	2021
Breyanzi (lisocabtagene maraleuce)	Linfoma de células B	Juno Therapeutics, Inc. (Bristol-Mayers Squibb Company)	FDA/ EMA	2021/2022
Imlygic (talimogene laherparepvec)	Melanoma irresecable metastásico	BioVex Inc. (Amgen Inc.)	EMA / FDA	2015/2021
Zinteglo (betibeglogene autotemcel)	Beta talasemia	Bluebird bio, Inc.	FDA, EMA	2022
Adstiladrin (nadofaragene firadenovec-vcng)	Cáncer de vejiga y riesgo de <i>Bacillus Calmette- Guerin</i>	Ferring Pharmaceuticals A/S	FDA	2022
Hemgenix	Hemofilia B	CSL Behring	FDA, EMA	2022
Roctavian	Hemofilia A	Biomarin	EMA, FDA	2022/2023

(valoctocogene roxaparvovec-rvo)				
Upstaza	Deficiencia de AADC ¹	PTC Therapeutics	EMA	2022
Carvykti (ciltacabtagene autoleucl)	Mieloma Múltiple	Janssen Biotech, Inc.	FDA, EMA	2022
Elevidys (delandistrogene moxeparvovec-rokl)	Distrofia muscular de Duchenne	Sarepta Therapeutics	FDA	2022
Vyjuvek	Tratamiento tópico de heridas en epidermólisis bullosa distrófica con mutaciones de colágeno VII α 1	Krystal Biotech, In	FDA	2023
Casgevy (exagamglogene autotemcel)	Beta talasemia Drepanocitosis	Vertex Pharmaceuticals Inc.	FDA/EMA	2023
Lyfgenia (lovotibeglogene autotemcel)	Drepanocitosis	Bluebird bio, Inc.	FDA	2023
Amtagvi (lifileucl)	Melanoma	lovance Biotherapeutics, Inc.	FDA	2024
Beqvez (fidanacogene elaparvovec-dzkt)	Hemofilia B	Pfizer, Inc.	FDA ²	2024
Lenmeldy (atidarsagene autotemcel)	Leucodistrofia metacromática	Orchard Therapeutics (Europe) Limited	FDA	2024

¹AADC: aminoácido aromático descarboxilasa. ²Actualmente Beqvez está en revisión por EMA. Fuente: Modificado a partir de Bulcha et al. (2021); EMA (2024), FDA (2024); Liñan-Torres et al. (2023); Rao et al. (2024) y Silva (2022).

2.8. Factores que afectan el desempeño de la terapia génica

Se debe de considerar la importancia de que el ADN que se introduce en las células diana debe permanecer funcional y las células en las que se introduce este deben ser estables y de larga vida (Patil et al., 2018).

Uno de los principales problemas que se deben contrarrestar son las dificultades en entregar el ADN a células que poseen una rápida división celular, evitando que se

consigan beneficios a largo tiempo. Esto lleva a múltiples rondas de terapia génica. Otro problema importante es la respuesta inmune que puede desencadenarse contra el vector y que disminuye la efectividad de la terapia génica (Patil et al., 2018).

Un problema del uso de virus como vectores son las respuestas inmunes, su toxicidad y la respuesta inflamatoria contra estos. Así como la posibilidad de que el virus pueda recobrar sus características patogénicas. Uno de los limitantes de la terapia génica es que no puede ser utilizada como tratamiento contra enfermedades multigénicas o multifactoriales (Patil et al., 2018).

Como con cualquier tratamiento, existen riesgos asociados con la terapia génica. El riesgo depende del tipo de terapia génica, el tipo de vector utilizado para administrar la terapia y el método de administración utilizado (Silva, 2022). Entre las complicaciones que se pueden dar por el uso de terapia génica se encuentran:

- El silenciamiento génico debido a la represión de un promotor. Este problema puede ser mitigado con el uso de promotores endógenos y evitando las secuencias regulatorias derivadas de los virus (Anguela & High, 2019).
- La genotoxicidad es asociada a la mutagénesis insercional, esta se puede dar por la activación ectópica de protooncogenes cercanos, desactivación de genes supresores de tumores o la perturbación del “splicing” normal. Con el fin de evitar que ocurra se pueden realizar medidas como el uso de vectores con un perfil de integración más seguro como los lentivirus que se auto inactivan (Dunbar et al., 2018; Anguela & High, 2019).
- La fenotoxicidad producida como una complicación producto de la sobreexpresión o una expresión aberrante del transgén. Con el fin de aminorar este efecto es importante: controlar la expresión espacial del transgén, por ejemplo, al utilizar promotores específicos de tejido; y controlar la expresión temporal, al tener un interruptor para prenderlo o apagarlo (Anguela & High, 2019).
- La inmunotoxicidad se da como producto de una respuesta inmune dañina contra el vector o el transgén; en estos casos es importante monitorear la reactividad de las células T contra el vector y el transgén para iniciar una supresión de la respuesta inmune si se necesita (Anguela & High, 2019). Una reacción inmune al sistema de administración de la terapia génica o la proteína terapéutica podría hacer que la terapia sea menos eficiente y el desarrollo de anticuerpos podrían afectar el uso de una segunda dosis (Silva, 2022).

- El riesgo de transmisión horizontal se presenta por la posible liberación de vectores infecciosos al medio ambiente. Se debe tratar de controlar con el monitoreo de la eliminación del vector en modelos preclínicos (Anguela & High, 2019).
- El riesgo de transmisión a través de línea germinal del ADN donado. Para evitarlo se pueden utilizar como barreras métodos anticonceptivos hasta que se dé una completa eliminación del vector, esta es de baja probabilidad (Anguela & High, 2019).

Capítulo 3. Terapia génica: nuevos avances en hemofilia

El principal objetivo de desarrollar la terapia génica en hemofilia, es el obtener por tiempo prolongado altos niveles de expresión de los factores deficientes de la coagulación y corregir la enfermedad de sangrado (Von Drygalski et al., 2019).

Los diferentes ensayos clínicos en hemofilia muestran la combinación de diferentes dosis, diferentes cápsides de AAV, distintos promotores hepato-específicos y distintos casetes génicos (Miesbach et al., 2023). El diseño óptimo de un casete de expresión del FVIII o FIX, la entrega de este en las células diana adecuadas, de forma segura y eficiente es esencial para obtener la cura para la hemofilia (Von Drygalski et al., 2019).

Estos ensayos se realizan principalmente en adultos con hemofilia severa o moderada que fueron tratados previamente con concentrados de factores de la coagulación, que no posean manifestación de enfermedad hepática, ni presencia de anticuerpos contra AAV ni contra factores de la coagulación (Miesbach et al., 2023).

3.1. Órgano diana

La terapia génica en hemofilia se puede dar desde 2 acercamientos. El primero consiste en entregar el gen del factor deficiente (FVIII o FIX) a células post mitóticas de larga vida como los hepatocitos o células del músculo esquelético, donde los genes se integran al genoma o persisten como ADN episomal. El segundo acercamiento se basa en la entrega de los genes del FVIII o FIX en células madre hematopoyéticas (HSC) por medio del uso de vectores (virales o no virales) que integren el material genético, con el fin de obtener una expresión duradera (Von Drygalski et al., 2019).

El principal órgano diana que se consideró para la terapia génica en hemofilia es el hígado, debido a que es el principal sitio de síntesis y liberación del FVIII y FIX (Famà et al., 2020; CSL Behring, 2024). La principal célula encargada de la producción del FVIII son las células endoteliales sinusoidales del hígado (Famà et al., 2020). Mientras que la principal célula implicada en la síntesis del FIX son los hepatocitos (CSL Behring, 2024).

El hígado no sólo es la diana de la terapia génica en hemofilia, sino que es el principal órgano diana de muchas de las terapias génicas que se están desarrollando. Esto debido a que es un órgano esencial que es responsable de diversas funciones, es

importante en regulación de la digestión, metabolismo y aclaramiento de toxinas. Además, este cuenta con importancia inmunológica y los demás sistemas del cuerpo dependen de su buen funcionamiento (CSL Behring, 2024). En general la terapia génica dirigida al hígado puede ser utilizada para tratar numerosas patologías hereditarias metabólicas y desordenes adquiridos (Aravalli et al., 2015).

Con las nuevas terapias aprobadas dirigidas a hígado es sumamente importante la salud de este órgano en los pacientes que deseen recibir terapia génica, para la obtención de mejores resultados. Ya que algún daño en este tiene el potencial de evitar la transducción eficiente de los vectores y tener un impacto negativo en la expresión transgénica (CSL Behring, 2024).

3.2. Vectores virales Utilizados

Existen dos tipos de vectores que se han utilizado principalmente en las estrategias de terapia génica en hemofilia (Pipe et al., 2022).

Los vectores LV son los que se han utilizado principalmente para las transferencias *ex vivo* en HSC y los AAV que se utilizan principalmente en células postmitóticas. Debido a las dificultades que los LV tuvieron con respecto a su manufactura, los ensayos clínicos en hemofilia que los utilizan apenas se encuentran en fase I (Pipe et al., 2022; NIH, 2024d). La manufactura a gran escala de estos vectores se asocia a pasos intrincados de producción, purificación y de evaluación de la calidad. Para su producción es necesario la transfección de plásmidos del vector en líneas celulares que producirán sus partículas. Con el fin de evitar la recombinación, se dividen los plásmidos en tres o cuatro unidades de transcripción separadas, cada unidad equivale a secuencias necesarias para el empaquetamiento y producción viral; se dejan de lado secuencias que codifican por proteínas innecesarias. Se introducen diferentes plásmidos en la misma célula para poder expresar todas las secuencias virales requeridas en altos niveles. Posteriormente se necesita expandir la población celular para producir un gran número de partículas virales, seguido de procesos de purificación y filtración. El desarrollo de una línea de cultivo celular estable es importante para la producción de lentivirus a gran escala, pero se debe tomar en cuenta que algunas de las proteínas virales pueden ser tóxicas para diferentes líneas celulares, las técnicas utilizadas consumen mucho tiempo, son costosas y tediosas; y se buscan células que tengan la capacidad de lograr producir todos los plásmidos necesarios para la manufactura del LV. Ha sido todo un reto encontrar un método de administración para integrar los genes que codifican los plásmidos y reducir al mismo tiempo la citotoxicidad. En el 2003 se

encuentra la primera línea celular llamada células STAR que era capaz de expresar todos los componentes de LV con estabilidad hasta por meses, a partir de ese año se han utilizado otras líneas celulares como la HEK293 (riñón de embrión humano) que permite alta eficiencia y producción del vector a gran escala (Martínez-Molina et al., 2020).

El desarrollo de la terapia génica se ha enfocado principalmente en el uso de vectores AAV recombinantes para la transferencia. Estos se caracterizan por no ser patogénicos, tener una alta especificidad por el hígado y tienen la capacidad de permanecer en forma circular predominantemente episomal, con muy bajas tasas de integración en el ADN genómico (Pipe et al., 2022; Baas et al., 2023; Miesbach et al., 2023).

La inmunidad humoral preexistente contra la cápside viral de los AAV es una limitante para el éxito de la transducción. La infección de los virus adeno asociados usualmente ocurre durante la infancia, aquellos pacientes que presentan estos anticuerpos han sido excluidos de los ensayos clínicos. Se ha observado una seroprevalencia geográficamente variable y una reacción cruzada entre los diferentes serotipos AAV. Estudios en el Reino Unido reportan anticuerpos neutralizantes contra AAV5 en el 25% de los pacientes con hemofilia y contra AAV8 en el 28%. Debido a la pérdida potencial de la expresión transgénica con el tiempo, es importante que se busquen estrategias para modular la respuesta inmune al inicio del tratamiento que evite la disminución de la expresión transgénica asociada a la inmunotoxicidad, o utilizar estrategias si se desea dar una segunda dosis con el fin de evitar una reacción cruzada entre los vectores (Batty & Lillicrap, 2019; Bulcha et al., 2021). Entre las estrategias destacan el uso de cápsides de virus con menor prevalencia en la población o asociados a menor producción de anticuerpos neutralizantes, usar la plasmáféresis para eliminar los anticuerpos anti AAV de la sangre o el uso de endopeptidasas que cortan los anticuerpos tipo IgG, como tratamiento previo a la terapia (Bulcha et al., 2021).

Los ensayos clínicos iniciales en hemofilia utilizaban los serotipos AAV de primera generación; AAV2 es el serotipo más estudiado y mejor caracterizado. Posteriormente se realizaron estudios en otros serotipos como AAV5, AAV8 y AAVrh10. En el caso de AAV8 se ha visto que es eficiente en la transducción de genes al hígado y promueve una alta expresión génica, incluso al ser inyectado intravenoso. El serotipo AAV5 es el más distinto filogenéticamente en términos de la estructura de su cápside, mientras que los otros serotipos poseen un 80% de homología entre ellos (Pipe et al., 2022). Actualmente existen más de 100 serotipos de AAV con tropismos diferentes y

propiedades inmunológicas diferentes. Además se han desarrollado cápsides sintéticas con capacidad de tener un tropismo selectivo, mayor potencia y mayor capacidad de empaquetamiento (Nathwani, 2022).

La baja capacidad de empaquetamiento de los AAV, (aproximadamente 4,7kb), fue el delimitante que llevó a que la mayoría de los estudios iniciales se dirigieran al tratamiento de la hemofilia B donde el tamaño del ADNc de *F9* mide 1,6kb por lo que es más pequeño que el de *F8* (Doshi & Arruda, 2020; Pipe et al., 2022). Para la hemofilia A los estudios similares se retrasaron, debido a que el transgén del *F8* es de aproximadamente 7kb y posee un perfil de expresión pobre (Pipe et al., 2022).

3.3. Complicaciones del desarrollo del casete génico de

FVIII

Con el fin de mejorar ambos aspectos asociados a la terapia génica en hemofilia A, se ha desarrollado un mejor acercamiento a la transferencia génica basada en AAV por medio de la disminución del tamaño del gen *F8*. La estrategia utilizada es la remoción del dominio B del FVIII. Con esto se logró reducir el tamaño del casete de expresión génica de este factor (Pipe et al., 2022).

El dominio B que equivale al 38% de la secuencia total, es prescindible para la actividad coagulante; por lo que un FVIII en el que se eliminó el dominio B (BDD) y se reemplazó por una secuencia de unión de 14 aminoácidos (SQ), produciendo un FVIII recombinante (Ward et al., 2011).

La baja expresión del FVIII se debe principalmente a que posee un ARNm ineficiente, además una proporción de la proteína se pliega de forma incorrecta por lo que es degradada intracelularmente, y hay un traslado ineficiente del producto desde el retículo endoplasmático al aparato de golgi. Esto lleva a que los niveles de expresión del FVIII sean de 2 a 3 ordenes de magnitud menores que otras proteínas de tamaño comparable. (Ward et al., 2011).

La búsqueda de un mejor perfil de expresión del FVIII ha llevado a la optimización del codón, con el fin de mejorar hasta 10 veces la expresión génica y la traducción proteica (Pipe et al., 2022). La delección del dominio B lleva a un incremento de 17 veces del ARNm y del producto traducido. Se sugiere que con esto ocurre una disminución del tiempo en el transporte desde el retículo endoplasmático al aparato de golgi. (Ward et al., 2011).

3.4. FIX Padua y su uso en terapia génica

Algunos de los primeros estudios en terapia génica de hemofilia B consiguieron obtener porcentajes de actividad de FIX en el rango de 2% al 5%, los cuales no llegaban a prevenir de forma adecuada los sangrados. Al aumentar las dosis del vector se producía inflamación hepática y hepatotoxicidad que requería de corticosteroides. Obtener altos niveles del factor con un mínimo riesgo de inflamación hepática se logró con la utilización de un FIX transgénico modificado que codifica por una proteína de FIX mutante que poseía una única mutación puntual (R338L) (VandenDriessche & Chuah, 2018).

Esta mutación fue llamada como FIX-R338L-Padua y fue identificada inicialmente en pacientes trombofílicos que expresaban un FIX con una actividad 8 veces la del FIX WT. La incorporación del FIX Padua en la terapia génica para hemofilia B aumenta su eficacia a través del uso de dosis más seguras. El primer ensayo clínico que utilizó esta variante (NCT 01687608) mostró una actividad sostenida de FIX del 20% a 25% en los 12 meses post infusión. Los resultados en su uso han mostrado que no ha sido un desencadenante de trombosis en los pacientes, ni ha inducido la formación de anticuerpos contra el FIX mutado (VandenDriessche & Chuah, 2018).

Dos estudios de fase II, AMT-060 y AMT-061 de CSL Behring, evaluaron el uso del FIX WT y del FIX Padua respectivamente. Ambos estudios utilizaron el mismo casete génico con la variación del transgén utilizado, y el mismo vector AAV. Se aplicaron en pacientes hemofílicos severos (<1% de actividad de FIX) o moderadamente severos (<2% de actividad de FIX). En AMT-060 se obtuvo que los niveles de FIX aumentaron a una media de 4,4 UI/dL en el cohorte de dosis baja, donde se aplicó 5×10^{12} genomas del vector/kg de peso (vg/kg) y de 6,9 UI/dL a alta dosis (2×10^{13} vg/kg) a las 26 semanas. El seguimiento a 5 años mostró niveles medios de FIX de 5,2 UI/dL para el cohorte 1 y de 7,2 UI/dL en el cohorte 2. En AMT-061 utilizando el FIX Padua a una sola dosis de 2×10^{13} vg/kg, los resultados muestran que a las 26 semanas se tenían valores de 47 UI/dL de actividad de FIX y para el seguimiento de 3 años la actividad media del factor fue de 36,9 UI/dL. Ambos ensayos muestran las diferencias en la expresión transgénica al usar FIX WT y FIX Padua (Sekayan et al., 2023).

3.5. Ensayos clínicos en hemofilia A

El desarrollo de la terapia génica en hemofilia ha progresado más lentamente al compararla con la hemofilia B. Esto se da por la complejidad de la síntesis del FVIII, el

tamaño de la proteína del factor VIII (2351 aminoácidos) y sus altas propiedades inmunogénicas. Se considera que el 25% de los pacientes desarrollan anticuerpos neutralizantes contra el FVIII exógeno administrado a estos pacientes (Famà et al., 2020). Con la terapia génica lo que se busca es proveer una terapia de una única dosis que sea efectiva y ofrezca una cura duradera con una actividad de FVIII sostenida en los pacientes hemofílicos A (Famà et al., 2020).

En la tabla 7 se observan los ensayos clínicos en fase III para hemofilia A que se encuentran actualmente en proceso. Estos buscan evaluar la eficacia y seguridad de 3 productos utilizados para el tratamiento de la terapia génica en pacientes hemofílicos A severos: Giroctocogene fitelparvovec de Pfizer, Valoctocogene roxaparvovec de BioMarin Pharmaceutical y Dirloctocogene samoparvovec de Spark Therapeutics Inc. (NIH, 2024d).

Actualmente hay 4 ensayos en fase III de Valoctocogene roxaparvovec; de estos NCT06224907 es un ensayo que lo evalúa específicamente en pacientes japoneses con hemofilia severa. Y NCT04323098 es otro ensayo que busca evaluar su efectividad y seguridad en combinación con corticosteroides como profilaxis (NIH, 2024d).

Actualmente como se observa en la tabla 7, hay 6 ensayos que se encuentran en fase II. De estos dos corresponden a Bio Marin, NCT04684940 es un ensayo clínico en fase I/II que busca evaluar la seguridad, tolerabilidad y eficacia de Valoctocogene roxaparvovec en pacientes hemofílicos A con inhibidores de FVIII; y NCT03520712 que busca evaluar estos aspectos en pacientes hemofílicos A severos (<1% de actividad del factor) y que poseen anticuerpos preexistentes contra AAV5 (NIH, 2024d).

En este momento se encuentran en desarrollo 5 ensayos clínicos en fase I. De los cuales 4 utilizan vectores lentivirales con el fin de incorporar un transgén del FVIII humano en HSC CD34+ *in vivo* (NIH, 2024d). Ejemplos de ellos incluyen los estudios en fase I: NCT04418414, NCT03217032, NCT05265767 y NCT03818763 que, a diferencia de los estudios anteriores, se realiza en pacientes hemofílicos A con presencia de inhibidores en título mayor o igual a 0,6 UB (NIH, 2024d).

Tabla 7. Ensayos clínicos de terapia génica en hemofilia A.

Ensayo	Producto	Fase	Patrocinador	Vector	Período
NCT04370054 NCT05568719	Giroctocogene fitelparvovec	III	Pfizer	rAAV2/6- hFVIII	2020-2028 2022-2038
NCT06297486	Dirloctocogene samoparvovec (SPK 8011)	III	Spark Therapeutics Inc.	AAV- BDDhFVII	2024-2035
NCT03392974 NCT03370913 NCT06224907 NCT04323098	Valocticogene roxaparvovec	III	BioMarin Pharmaceutical	AAV5- BDDhFVIII-SQ	2018-2023 2017-2024 2023-2029 2020-2027
NCT04684940 NCT03520712	Valocticogene roxaparvovec	I/II			2020-2029 2018-2024
NCT03001830	GO-8	I/II	University College, London	AAV2/8- FVIII- V3 ¹	2017-2029
NCT04676048	ASC618	I/II	ASC Therapeutics	AAV- BDDhFVIII	2022-2026
NCT06111638	BBM-H803	I/II	Shanghai Belief- Delivery BioMed Co., Ltd	AAV-hFVIII	2023-2030
NCT03588299	BAY 2599023 (DTX201)	I/II	Bayer	AAVhu37- BDDhFVIII	2018-2026
NCT03061201	SB-525	I/II	Pfizer	rAAV2/6 - BDDhFVIII	2017-2024
NCT04418414	ET3-201	I	Expression Therapeutics, LLC	LV CD68-ET3 -FVIII	2024-2039
NCT03217032	GIMI-IRB-17007	I	Shenzhen Geno- Immune Medical Institute	LV- BDDhFVII	2020-2022
NCT05265767	CSCR- CMC/FVIII LVGT/2018	I	Christian Medical College, Vellore, India	CD68-ET3 LV- hFVIII	2022-2039
NCT03818763	Pleightlet (MUT6)	I	Medical College of Wisconsin	LV-BDDhFVIII	2020-2033
NCT05454774	BBM 002	I	Institute of		2022-2027
NCT04728841	GS001	NA	Hematology & Blood Diseases Hospital, China	AAV-hFVIII	2021-2028
NCT05523128	ZS802	NAs			2022-2024

Nota. AAV: virus adeno asociado; BDDhFVIII: factor VIII humano con delección del dominio B; rAAV: Virus adeno asociado recombinante; hFVIII: factor VIII humano. LV: lentivirus; NA: no aplicable; NAs: no asignable, SQ: secuencia del dominio B de ¹V3: el F8 posee un péptido V3 en lugar del dominio B. Fuente: Elaborado a partir de Nathwani (2022) y NIH (2024d)

3.5.1. Giroctocogene fitelparvovec.

Giroctocogene fitelparvovec (PF-07055480) de Pfizer y Sangamo Therapeutics, es la primera terapia génica para hemofilia A que utiliza un vector recombinante AAV (rAAV) serotipo 6, conteniendo el ADNc que codifica por el gen *F8* humano con DDB. Este serotipo fue elegido debido a que se demostró que posee un alto tropismo hepático y pruebas que sugerían su capacidad de uso clínico *in vivo* (Leavitt et al., 2023).

El transgén codifica por la misma secuencia de aminoácidos que el moroctocog α (factor VIII recombinante de tercera generación), seguido de una cola de poli(A) bajo el control de un promotor hepato-específico que utiliza módulos reguladores que actúan en *cis* para promover la expresión a nivel hepático (Choraria et al., 2022; Leavitt et al., 2023). El casete génico se encuentra flanqueado por ITRs del AAV2. El promotor hepático utilizado fue diseñado por bioingeniería y es derivado del promotor mínimo de transtiretina (Leavitt et al., 2023).

El ensayo en fase I/II se inició en junio del 2017 y los primeros resultados se obtuvieron en el 2021. Participaron 11 candidatos con hemofilia A severa (<1% de actividad del FVIII). El estudio consistió en 4 cohortes a diferentes dosis. Entre los resultados obtenidos se determinó que una única dosis de Giroctocogene fitelparvovec fue bien tolerada durante 2 años post infusión, sin efectos adversos sostenidos. Los resultados muestran para el cohorte 4 (mayor dosis), una actividad media de FVIII a la semana 52 en 42,6% y a la semana 104 de 25,4% utilizando ensayos cromogénicos (FVIII:C), con la técnica de un paso se obtuvo una media de 66,4% y 38,9% para esas semanas respectivamente (Leavitt et al., 2023).

Para el cohorte de mayor dosis los participantes pasaron de una tasa media anualizada de sangrados de 8,8 en el año previo a la infusión a 0,7 posterior (Leavitt et al., 2023).

Este estudio demostró que el rAAV6 puede entregar de forma efectiva el transgén al hígado, resultando en niveles importantes de FVIII. Entre los efectos adversos observados se encontraba el aumento de la aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT) que resolvieron con el uso de corticosteroides, un participante tuvo hipotensión y pirexia a las 6h post infusión, que resolvió a las 24h. No se detectaron masas, inhibidores de FVIII ni eventos trombóticos en los participantes. Actualmente se encuentra en fase III (Leavitt et al., 2023).

3.5.2. *Dirloctocogene samoparvovec (SPK-8011).*

SPK-8011 es un vector AAV recombinante que consiste en una cápside sintética desarrollada a partir de un AAV3 (AAV-LK03) (George et al., 2021; Spark Therapeutics, 2022). Posee un promotor y potenciador de transtiretina truncada hepato-específica, una secuencia intrónica sintética y un codón optimizado de ADNc del *F8* que codifica

por FVIII-SQ (una forma del FVIII con DDB). Fue desarrollado en células de riñón embrionario humano (HEK293) (George et al., 2021).

Los ensayos de fase I/II no aleatorizados, con escala de dosis permitieron evaluar SPK-8011 para Hemofilia A, el seguimiento fue de 4 años iniciando en enero del 2017 con punto de corte en mayo del 2021. Los participantes fueron 18 hombres mayores de 18 años con hemofilia A grave (<1% de actividad de FVIII). Se les dio seguimiento por 36,5 meses. De los participantes, 9 poseían historial de infección con hepatitis C y fibrosis hepática en estadio 0 a 2; 3 eran portadores de HIV (George et al., 2021).

Entre los efectos adversos que se presentaron en los ensayos en Fase II se incluye una reacción aguda a la infusión con vómito, mialgia, dolor de espalda y pirexia 12h post infusión que resolvió a las 72h con tratamiento antipirético. 7 participantes tuvieron niveles de transaminasas elevados, uno de ellos fue hospitalizado por tener valores de 3 a 4,9 veces el valor normal alto (grado 2) de ALT; se trató con metilprednisolona. Las elevaciones de transaminasas resolvieron con glucocorticoides. Ninguno desarrolló anticuerpos anti FVIII (George et al., 2021).

Los resultados mostraron que todos los pacientes obtuvieron expresión de FVIII, sin embargo, dos participantes la perdieron por la respuesta inmune celular contra el vector. La actividad media de FVIII a más de 52 semanas post infusión, por el método de una etapa (FVIII:Coag) fue de 11,0% y de 6,9% para el FVIII:C. El pico inicial de FVIII se dio entre la semana 6 a la 12 post infusión. El seguimiento por 2 años mostró niveles sostenidos de FVIII. La tasa de sangrados espontáneos disminuyó a menos de 1 evento al año en aquellos pacientes con más de 10% de factor. Por lo que SPK-8011 fue exitoso en reducir la tasa de sangrados y demostró que el uso de este vector para la expresión del FVIII en hepatocitos es viable y estable por 2 años (George et al., 2021).

Para el seguimiento de 5 años en octubre del 2022 los resultados muestran una disminución en la tasa de sangrado de 92% con una tasa anual media de 0,98 post infusión comparada con 11,62 pre infusión (Spark Therapeutics, 2022). Actualmente se encuentra en fase III.

3.5.3. *Valoctocogene roxaparvovec*

En el 2023 la FDA aprueba Roctavian (Valoctocogene roxaparvovec), previamente aprobada por EMA en el 2022. Una terapia génica basada en el uso de vectores virales adeno asociados para el tratamiento de hemofilia A severa en adultos que no presentan

anticuerpos contra factor VIII ni anticuerpos preexistentes contra el serotipo 5 del AAV (FDA, 2023).

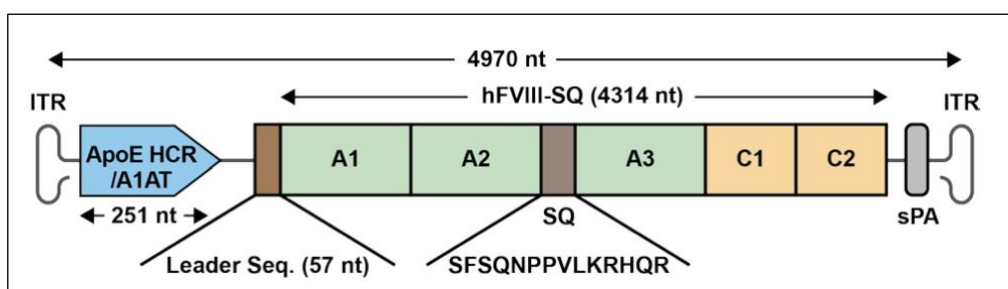
En el 2017, Rangarajan et al. publican los resultados clínicos de su ensayo de Fase I/II (NCT0257679) auspiciado por BioMarin Pharmaceutical (Rangarajan et al., 2017). Ellos desarrollaron AAV5-hFVIII-SQ (Valoctocogene roxaparvovec), el cual consiste en un vector viral adeno asociado serotipo 5 (Rangarajan et al., 2017).

El casete génico (ver figura 11) se encuentra formado por secuencias ITR de doble cadena provenientes de un AAV2 en los extremos 3' y 5'. Además, posee una secuencia de ADN de cadena sencilla que codifica por un promotor híbrido específico del hígado humano. Este promotor posee secuencias de la región de control hepático (HCR) de la apolipoproteína E (ApoE) truncada y un promotor de α -1-antitripsina (A1AT) (Rangarajan et al., 2017). A esta secuencia le continúa una secuencia líder de 57 nts y los dominios A2 y A3 del factor VIII. Posteriormente una secuencia SQ los une al dominio A3. Esta secuencia SQ de 14 aminoácidos es lo que quedó del dominio B eliminado (Rangarajan et al., 2017).

La importancia de SQ es que contiene un sitio de corte de furina (Rangarajan et al., 2017). Durante el procesamiento de la molécula de FVIII humano se realiza una proteólisis en múltiples sitios de esta, uno de los sitios más importante de corte se encuentra en el dominio B. Donde un motivo de reconocimiento de furina (R-X-X-R) en el extremo carboxilo terminal es el sitio de corte para la formación del heterodímero de FVIII. Debido a que el dominio B no es necesario para la actividad biológica de la proteína, una versión sin este dominio del FVIII y que únicamente contiene el sitio de corte de la furina se ha desarrollado para su uso en la clínica (Nguyen et al., 2017).

Después de esta secuencia SQ, el casete incluye las secuencias correspondientes a los dominios A3, C1 y C2 del FVIII seguidos por una cola de poliadenilación sintética (sPA) (Rangarajan et al., 2017).

Figura 11. Casete génico de *Valoctocogene roxaparvovec*



El casete posee secuencias ITR de AAV2 en los extremos 3' y 5'; y una secuencia de ADN de cadena sencilla que codifica por un promotor híbrido formado por ApoE HCR y A1AT, seguido por una secuencia de ADN complementario del gen *F8* con una delección en su dominio B que mantiene su secuencia SQ de 14 aminoácidos y una cola sintética de poliadenilación. ITR: repeticiones terminales invertidas doble hebra de AAV2; ApoE HCR: región de control hepático de la apolipoproteína E truncada. A1AT: promotor de la α -1-antitripsina; dominios del FVIII: A1, A2, A3, C1 y C2. SQ: secuencia de unión de 14 aminoácidos. sPA: señal de poliadenilación sintética. Tomado de Rangarajan et al. (2017).

Para los ensayos clínicos de fase I/II se utilizó una sola dosis de este vector AAV5-BDDhFVIII-SQ en 9 hombres con hemofilia A severa. Estos pacientes fueron enrolados en 3 cohortes: el de baja dosis donde se les infundió 6×10^{12} vectores genómicos (vg) por kilogramo (kg) de peso (1 participante), el de dosis media de 2×10^{13} vg/kg (1 participante) y el de dosis alta de 6×10^{13} vg/kg (7 participantes). A estos se les dio seguimiento por 52 semanas. Entre los criterios de inclusión está la exposición a terapia con concentrado de factor VIII por 150 días previo al ensayo y una tasa de sangrados mínima de 12 eventos en el último año (Rangarajan et al., 2017).

Los resultados muestran que en baja dosis, el participante mantuvo niveles de FVIII por debajo de 1 UI/dL a la semana 54. En la cohorte de dosis media el participante mantuvo de 1 a 3 UI/dL de FVIII a la semana 54. Para la cohorte con alta dosis a la semana 52 la actividad media de los participantes fue de 93 UI/dL por el método coagulométrico. (Rangarajan et al., 2017). La mediana de FVIII obtenida para los años 1,2,3,4 y 5 post infusión por método cromogénico fue de 60,3 UI/dL, 26,2 UI/dL, 19,9 UI/dL, 16,4 UI/dL y 8,2 UI/dL respectivamente (Ozelo et al., 2022). Para estos pacientes la tasa media de sangrado pasó de 16 al año previo al estudio, a 1 por año. Los efectos adversos reportados incluyen incrementos de los niveles de ALT y AST, artralgias, dolor de espalda, fatiga y tos productiva. El efecto adverso más serio reportado fue la progresión a artropatía crónica de un participante en un sitio donde no tenía sangrado previo. No se reportó trombosis (Rangarajan et al., 2017).

En el 2022 Ozelo et al. publican los resultados de su estudio multicéntrico en fase III, donde se evalúa la eficacia y seguridad de valoctocogene roxaparovec en 134 hombres mayores de 18 años con hemofilia A severa que no posean anticuerpos contra AAV5 o historial de inhibidores anti FVIII, sin HIV, ni alteración hepática, que recibieron previamente profilaxis con concentrados de FVIII (Ozelo et al., 2022).

Los resultados mostraron una actividad media de FVIII de 42,9 (134 participantes) a las semanas 49 a 52; y de 24,4 (17 participantes) a la semana 104. Las tasas anualizadas del uso de FVIII y del tratamiento de sangrados disminuyó en 98,6% y 83,8% respectivamente post infusión; pasando de una tasa de sangrado media de 4,8 por año a 0,8. (Ozelo et al., 2022).

Todos los participantes presentaron al menos un efecto adverso y 22 reportaron efectos adversos serios. Los más comunes incluyen: 80,6% de los participantes con aumentos de ALT, náuseas en el 23,1% y aumentos de AST en el 29,1% de los participantes. De los efectos adversos severos, 3,7% se asociaron al tratamiento. Todos los efectos resolvieron y no hubo desarrollo de inhibidores, trombosis ni muertes. Los aumentos de ALT se trataron con inmunosupresores. Un 9,7% (13 participantes) de los participantes incrementaron la tasa de sangrado, de los que 6 participantes tuvieron sangrado por 30 días posterior a la detención de la profilaxis, 3 por traumas y 4 participantes con sangrados espontáneos o traumáticos, 1 de ellos con actividad de factor VIII bajo. Otros factores adversos que presentaron fueron reacciones de hipersensibilidad sistémica y reacciones a la infusión como rash, síncope, reacciones anafilácticas y de hipersensibilidad (Ozelo et al., 2022).

3.6. Ensayos clínicos en Hemofilia B

Los ensayos clínicos en hemofilia B se pueden observar en la tabla 8. Actualmente hay 3 terapias génicas que se encuentran en fase III: Fidanacogene elaparovec de Pfizer, Etranacogene dezaparovec de CSL Behring y BBM-H901 de Shanghai Belief-Delivery BioMed Co. (National Library of Medicine [NIH], 2024e).

Actualmente hay 8 ensayos clínicos activos en fase II. Uno de ellos es NCT06379789 de Regeneron Pharmaceuticals, iniciado en el 2024, que busca insertar *F9* de la coagulación utilizando CRISPR Cas9. Este estudio inicialmente busca determinar en adultos mayores de 18 años la mejor dosis para la aplicación del tratamiento. Posteriormente se comprobará dicha dosis en tres poblaciones: adultos mayores de 18 años, adolescentes de 12 a 18 años y niños de 2 a 12 años (NIH, 2024e).

Actualmente hay 4 ensayos en fase I que se encuentran activos, de ellos NCT03961243 utiliza un vector lentiviral con el fin de introducir una copia del FIX en HSC CD34+ (NIH, 2024e). NCT05709288 es otro ensayo en fase I del Instituto Hospital de Enfermedades de Hematología y la Sangre, de China. Este se está realizando en población de 12 a 18 años de pacientes con hemofilia B severa, con el fin de evaluar la seguridad, tolerabilidad y eficacia de una sola dosis del vector BBM-H90 en este grupo etario (NIH, 2024e).

Otro ensayo en fase I que se basa en edición génica es NCT02695160 de Sangamo Therapeutics, este utiliza tecnología de nucleasas con dedos de zinc para insertar una copia del FIX en el ADN de pacientes con hemofilia B, dentro del locus de la albúmina en los hepatocitos, en adultos con hemofilia B severa (NIH, 2024c).

Actualmente además de los ensayos clínicos mostrados en la tabla 8, se están realizando estudios observacionales, como el NCT05932914, de St. Jude Children's Research Hospital y NCT04817462 de University College, London; ambos para buscar analizar biopsias de hígado de pacientes tratados con terapia génica para hemofilia A y B; 6 meses post infusión. Otros estudios observacionales son NCT02971969 de Ultragenyx Pharmaceutical Inc, NCT00515710 de Spark Therapeutics y NCT04628871 de Sangamo Therapeutics con el fin de dar seguimiento para los sujetos participantes en los ensayos clínicos correspondientes (NIH, 2024c).

NCT06008938 es un estudio en fase IV de CSL Behring que busca dar seguimiento por 20 años (del año 2023 al 2043) a los pacientes con hemofilia B que recibieron como tratamiento Hemgenix® (Etranacogene Dezaparvovec) con el fin de ver efectividad y seguridad del producto (NIH, 2024c).

Tabla 8. *Ensayos clínicos de terapia génica para hemofilia B.*

Ensayo	Producto	Fase	Patrocinador	Vector	Período
NCT03861273 NCT05568719	Fidanacogene elaparvovec (PF-06838435)	III	Pfizer	rAAV-Spark100-hFIX-Padua	2019-2030 2022-2038
NCT05203679	BBM-H901	III	Shanghai Belief-Delivery BioMed Co.	AAV843 (Cápside sintética) - hFIX-Padua	2021-2028
NCT06003387 NCT03569891	Hemgenix etranacogene dezaparvovec (AMT- 061)	III	CSL Behring	AAV5-hFIXco-Padua	2024-2028 2018-2021
NCT03489291	Etranacogene dezaparvovec (AMT- 061)	I/IIb		AAV5-hFIXco-Padua	2018-2023
NCT02396342	AMT-060	I/II		AAV5-hFIX	2015-2021
NCT03307980	PF 06838435	I/II	Pfizer	rAAV-Spark100-hFIX-Padua	2017-2029
NCT02618915	DTX101	I/II	Ultragenyx Pharmaceuti-cal Inc	AAVrh10-hFIX	2015-2017
NCT03369444	FLT180a	I/II	University College, London	AAV-S3 (cápside sintética)- FIX-Padua	2017-2020
NCT03641703 NCT05164471	FLT180a	I/II	Freeline Therapeutics	AAV-S3 (cápside sintética)- FIX-Padua	2018-2023 2021-2023
NCT01687608	AskBio009	I/II	Baxalta now part of Shire	AAV8-hFIX	2013-2030
NCT04394286	SHP648	I/II		AAV8-hFIX-R338L	2020-2021
NCT05441553	VGB-R04	I/II	Shanghai Vitalgen BioPharma Co., Ltd.	AAV-hFIXv	2021-2023
NCT02484092	SPK-9001	I/II	Spark Therapeutics, Inc.; Pfizer	AAV-Spark100-hFIX-Padua	2015-2029
NCT06379789	REGV131-LNP1265	I/II	Regeneron Pharmaceuticals	CRISPR/Cas9-FIX	2024-2032
NCT05641610 NCT05630651	ZS801	I/II	Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, China	AAV-hFIX	2023-2028 2022-2024
NCT04135300	BBM-H901 (GT2019001)	I		AAV-hFIXv	2019-2039
NCT05152732	VGB-R04	I		AAV-hFIXv	2021-2025
NCT05709288	BBM-H90	I		AVV-hFIX	2023-2035

NCT01620801	AAV8-hFIX19	I	Spark Therapeutics, Inc.	AAV8-hFIX19	2012-2016
NCT03961243	YUVA-GT-F901	I	Shenzhen Geno-Immune Medical Institute	LV-NHP/TYF-FIX	2020-2022
NCT02695160	SB-FIX	I	Sangamo Therapeutics	AAV6-ZFN-FIX	2016-2021

AAV: virus adeno asociado; hFIX: factor IX humano; LV: lentivirus; ZFN; nucleasas de dedos de Zinc, CRISPR/Cas9: repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas y la proteína 9 asociada; hFIX-R338L: variante Padua del factor IX humano. hFIXv: variante del FIX humano. Fuente: Elaborado a partir de Nathwani (2022) y NIH (2024c).

3.6.1. **BBM-H901**

BBM-H901 es una droga desarrollada por Belief BioMed's, la cual consiste en un vector AAV843 de cápside sintética con un promotor específico de hígado y el ADNc del FIX Padua (Nathwani, 2022).

Se realizó un ensayo en fase I con 10 pacientes con hemofilia severa o moderadamente severa ($\text{FIX} \leq 2\%$ actividad), adultos mayores de 18 años, que tuvieran un título de anticuerpos ≤ 4 contra la cápside del vector pero sin inhibidores del FIX de la coagulación. Se les infundió una dosis de 5×10^{12} vg/Kg de BBM-H901 (Nathwani, 2022).

Estos pacientes recibieron prednisona de forma profiláctica. El seguimiento fue de 58 semanas donde los resultados obtenidos muestran una actividad de FIX de 36,9% al año de la infusión, dos de los participantes sufrieron de elevaciones de ALT y AST con una disminución en la actividad del FIX (Nathwani, 2022). No se observaron eventos adversos severos. Un sujeto desarrolló pirexia y elevación de la AST, 2 participantes cursaron con elevaciones de ALT y AST con una disminución de la actividad del FIX en 7 UI/dL para un paciente y 11,8 UI/dL para el otro (Xue et al., 2022). Este estudio en el 2022 se encontraba en transición a Pfizer. Actualmente se están realizando los ensayos en fase III (Nathwani, 2022).

3.6.2. **Fidanacogene elaparvovec (BEQVEZTM).**

Fidanacogene elaparvovec es un vector AAV para terapia génica que fue desarrollado por Spark Therapeutics y Pfizer para el tratamiento de Hemofilia B. Fue aprobado por FDA en diciembre del 2023 para su uso en adultos mayores de 18 años con hemofilia B severa o moderadamente severa ($\text{FIX} \leq 2\%$ de actividad) que son

negativos por anticuerpos contra la variante de AAV serotipo Rh74 (AAVRh74var). Actualmente se encuentra pendiente de aprobación por EMA. La cápside viral recombinante de AAVRh74 contiene el transgén del FIX Padua (FIX-R338L) (Dhillon, 2024; EMA, 2024).

Los ensayos en fase I/II se realizaron en 15 pacientes hemofílicos a los que se les administró fidanacogene elaparvovec con una dosis de 5×10^{11} vg/kg y un seguimiento inicial de 52 semanas. Solo 3 pacientes necesitaron corticosteroides en los primeros 6 meses y se reportaron efectos adversos en el seguimiento por largo tiempo en 3 de los pacientes, los cuales no presentaron inhibidores o sufrieron de eventos trombóticos. No se reportaron masas hepáticas o elevaciones de alfa feto proteína (AFP). Sólo un paciente presentó esteatosis hepática. A un año del ensayo la actividad de FIX media, por ensayo coagulométrico, se mantuvo en 22,8%; 25,4% para el segundo año; 22,9% para el tercer año; 24,9% para el cuarto año y 19,8% para el quinto año (Samelson-Jones et al., 2021b). La tasa media de sangrado anual pasó de 5,44 a 0,81 al año post infusión (Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health [CADTH], 2024).

Para los ensayos en fase III se enrolaron 45 participantes a los que se les suministró una dosis de 5×10^{11} vg/kg de fidanacogene elaparvovec. Los resultados mostraron una actividad media a los 6 meses de FIX de 27,7%, al año de 25,5% y a los 2 años de 25% FIX (Klamroth et al., 2024).

De los 45 participantes, 6 sufrieron una disminución en la actividad del FIX, posterior a tener valores altos de este; no se encontró presencia de inhibidores, pero tuvieron que retornar a profilaxis, 1 de ellos por la frecuencia de sangrado (Frenzel et al., 2023; Klamroth et al., 2024). Entre los efectos adversos, el 62,2% recibieron glucocorticoides por elevaciones en la ALT. No se reportan muertes, eventos trombóticos, reacciones a la infusión severas ni inhibidores de FIX (Klamroth et al., 2024).

3.6.3. Etranacogene dezaparvovec (Hemgenix®).

Hemgenix® (Etranacogene dezaparvovec) es una droga de CSL Behring aprobada por FDA y EMA en el 2022. Es la primera terapia génica aprobada para el tratamiento de hemofilia B en adultos (FDA, 2024; EMA, 2024). En el 2023 Pipe et al. publican los resultados obtenidos del ensayo en fase 3 (Pipe et al., 2023).

Uno de los ensayos clínicos de fase I/II de CSL Behring que sentaron las bases para el desarrollo de Etranacogene dezaparvovec es AMT-060. En este ensayo se demostró que se podía obtener la expresión de un vector AAV5 expresando el gen del FIX humano

salvaje en su casete génico, en pacientes con anticuerpos neutralizantes o sin ellos. Por lo que para el ensayo AMT-061 no se tomó en cuenta la presencia de estos anticuerpos contra el AAV5 como una condición excluyente (Majowicz et al., 2019).

A partir de AMT-060 se desarrolla AMT-061 (Etranacogene dezaparovec) con la única variación de que en lugar de utilizar un ADNc del F9 WT se utiliza una variante de este, la variante FIX Padua (Von Drygalski et al., 2019; Pipe et al., 2023).

AMT-061 posee un casete génico (Ver figura 12) que consiste en un promotor LP1 hepato-específico, un codón optimizado que codifica por el ADNc de la variante de FIX Padua encapsulado en un vector AAV serotipo 5. Este vector se ha asociado a una baja seroprevalencia de anticuerpos preexistentes neutralizantes. Posterior a la infusión Etranacogene dezaparovec se dirige al hígado donde el vector de ADN residirá en forma episomal (Sekayan et al., 2023).

En el ensayo en fase IIb (NCT03489291) con AMT-061, se introdujo Etranacogene dezaparovec en 3 pacientes con hemofilia B moderada a severa (actividad de factor menor o igual a 2%), en pacientes que hubieran sido tratados con concentrados de factor, y que tuvieran 4 o más episodios de sangrado o artropatía crónica (Drygalski et al., 2019). Los resultados a 2 años post infusión muestran que se mantuvo una actividad de FIX de 44,2%, que no se vio afectada con la presencia o ausencia de anticuerpos anti AAV5 neutralizantes (Pipe et al., 2023). Este estudio demostró que se tuvo un incremento en la actividad de FIX en pacientes severos o moderadamente severos con hemofilia B por más de 6 meses y eliminó el sangrado y la necesidad de terapia de reemplazo en pacientes con anticuerpos neutralizantes contra AAV5. En este ensayo no se observaron aumentos considerables de las enzimas hepáticas (Von Drygalski et al., 2019).

El ensayo en fase III de Etranacogene dezaparovec, fue realizado en 33 sitios de Estados Unidos, la Unión Europea y el Reino Unido; para el cual se reclutaron 54 hombres de más de 18 años con hemofilia B severa (<1% de actividad de factor IX) o con severidad moderada (1%-2% de actividad de FIX). Se excluyeron aquellos con fibrosis hepática o que tuvieran infección con HIV (Pipe et al., 2023).

Figura 12. Representación esquemática del casete génico de Etranacogene dezaparvovec



ITR: repeticiones terminales Invertidas, LP-1: promotor hepato-específico; polyA: señal de poliadenilación. Intron: SV40. Tomado de Thornburg (2021).

Después de recibir una sola dosis de Etranacogene dezaparvovec, se les dio un seguimiento inicial de 18 meses y uno posterior de 5 años, esto con el fin de determinar su eficacia y seguridad. La actividad del FIX se incrementó desde la semana 3 post tratamiento con una media de 39,0% a los 6 meses que se mantuvo en el tiempo; 41,6% al año y de 37,1% a los 18 meses utilizando el ensayo coagulométrico. Con la técnica FVIII:C la media de actividad del FIX para los 6,12 y 18 meses fue de 16,5%, 17,9% y 19,7%, más baja que con la FVIII:Coag. Los resultados muestran una disminución en la tasa de sangrado anual que pasó de 4,19 episodios a 1,51. Los sangrados espontáneos se redujeron en un 71% y los sangrados articulares en 78% (Pipe et al., 2023).

No se encontró evidencia de eliminación de la expresión transgénica por inmunidad directa al hepatocito. De los participantes 38,9% poseían anticuerpos contra AAV5, aquellos que poseían títulos de anti AAV5 ≥ 678 se mantuvo la expresión del transgén de forma indiferente. La media de actividad de FIX para los que no poseían anticuerpos era de 39,9% y los que poseían en 31,1%. El 96% de los participantes dejaron la profilaxis a los 18 meses, los dos participantes que no la dejaron, uno poseía un título de anti AAV5 de 3212 y otro solo recibió el 10% de la dosis debido a que sufrió una reacción de hipersensibilidad. Entre los efectos adversos se observó elevación de ALT en 17%, que se trató con glucocorticoides; dolor de cabeza en el 15% y síntomas tipo influenza en el 13% de los participantes (Pipe et al., 2023).

3.7. Terapia génica en niños y nuevas terapias en edición génica

Los transgenes de FVIII o FIX que son administrados en vectores AAV se mantienen predominantemente de forma episomal. La lenta renovación del hepatocito en pacientes adultos causa una consecuente dilución del transgén no integrado en el genoma, debido a la división celular del hepatocito. El panorama para los recién nacidos y niños es diferente, debido a que disminuye la expresión del transgén por la rápida división del

hepatocito en este grupo etario. Actualmente las terapias génicas basadas en AAV excluyen a los pacientes pediátricos. (De Wolf et al., 2023).

Una de las estrategias es el uso de vectores que integran el transgén asegurando una expresión del factor deficiente por largo tiempo, aún en el contexto de una rápida proliferación de los hepatocitos, estas investigaciones se están utilizando principalmente con vectores lentivirales (De Wolf et al., 2023). Estos se han asociado a obtener una integración genómica estable por lo que se están considerando como una alternativa al AAV ya sea para la terapia génica dirigida al hígado (en adultos o pacientes pediátricos) o para la ingeniería *ex vivo* en CMH (De Wolf et al., 2023).

Otro enfoque que se está investigando es el uso de edición genética para corregir mutaciones endógenas de *F9* o insertar *F9* en un locus definido como el locus de albúmina o en los sitios llamados “puerto seguro” (Perrin et al., 2019). Estos son locus específicos en el genoma humano que apoyan la expresión transgénica estable y eficiente, sin alterar perjudicialmente las funciones celulares. Permiten la integración precisa de los nuevos transgenes terapéuticos funcionales mejorando la seguridad y eficacia, sin causar otros cambios no deseados en el genoma que podrían representar un riesgo para los pacientes (Aznauryan et al., 2022).

Actualmente hay 2 ensayos en fase I/II y fase I que están utilizando edición génica con el fin de insertar un transgén *F9* sin promotor, por medio de un AAV a través del uso de CRISPR Cas9 (NCT06379789, Regeneron Pharmaceuticals) y nucleasas de dedos de zinc (NCT02695160, Sangamo Therapeutics) respectivamente (Rodríguez-Merchán et al., 2021; NIH, 2024e). Otro ensayo (NCT04628871) de Sangamo Therapeutics consiste en la inserción del gen del FIX en un locus seguro de la albúmina utilizando ZFN. Este estudio utilizó solo un participante, los resultados mostraron únicamente la expresión de un 1,1% de actividad de FIX y no se observaron efectos adversos, actualmente se encuentra en estudio observacional de seguimiento por 10 años (Soroka et al., 2023; NIH, 2024e).

3.8. Limitantes y riesgos de la terapia génica en hemofilia

El uso de vectores AAV presenta un riesgo de toxicidad hepática, acompañada de la pérdida o reducción de la expresión transgénica. El aumento de las transaminasas se da independientemente del uso de cualquier cápside, de la configuración del genoma del AAV, del promotor del transgénico o el método de manufactura. Este se considera un fenómeno autolimitante que se ha logrado controlar con corticosteroides solos o

combinados con otros agentes inmunosupresores y que no se presenta posterior a los 2 años de la infusión (Nathwani, 2022). Además estos vectores al guardarse como episomas en la célula, tienen una desventaja para el uso en células de rápida división como los hepatocitos de niños (De Wolf et al., 2023).

Una de las complicaciones en la terapia génica es el que los vectores virales se desarrollan a partir de un virus que por sí solo tienen la capacidad de desencadenar una respuesta inmune de memoria al ser expuesto al sistema del paciente, aunque este no tenga la capacidad de replicarse en el hospedero. Es por ello que la mayoría de los estudios delimita la participación a pacientes sin anticuerpos contra AAV o con bajo título de ellos (High, 2012).

Todos los estudios reportan el desarrollo de anticuerpos contra la cápside del virus posterior al tratamiento con AAV que se mantiene por años en estos pacientes. Estos equivalen a un riesgo que puede llevar a la pérdida de expresión transgénica, por lo que se deben buscar estrategias para modular la respuesta inmune en estos pacientes o evitar la reacción cruzada entre los vectores al repetir el tratamiento. El uso de varias dosis podría tener implicaciones de toxicidad que aún son desconocidas (Batty & Lillicrap, 2019).

Aún no se han reportado inhibidores contra FVIII o FIX en los ensayos clínicos de terapia génica en hemofilia, sin embargo, en los ensayos se han incluido pacientes con bajo riesgo de desarrollarlos. Se desconoce si estos se podrían desarrollar en pacientes que reciban terapia génica sin el uso previo de concentrados de factor. En modelos caninos tratados con AAV para hemofilia A, se ha observado el desarrollo de inhibidores transitorios (Batty & Lillicrap, 2019).

Uno de los principales delimitantes de la terapia génica en hemofilia como tratamiento curativo para los pacientes que sufren esta, es el alto costo de estas terapias, asociado a su complejidad. Este limita su aplicabilidad y levanta dudas sobre la relación entre el costo y su efectividad, así como su administración equitativa en los pacientes. Un estudio dirigido por Machin et al. (2018) muestran la terapia de reemplazo en los Estados Unidos tiene un costo de 300 000 USD por paciente al año. Mientras que el costo por paciente para la terapia génica es de 1 millón de USD y de 8,44 QALYs (calidad ajustada a los años de vida) el cual mide la carga de enfermedad, la calidad de vida y el número de años vividos, evaluando la eficiencia económica de las intervenciones médicas. El costo de la profilaxis por su parte es de 1,7 millones de USD y 6,62 QALYs. Los mejores costos y la mayor efectividad de la terapia génica lo colocan

como económicamente más eficiente para los pacientes con HA severa. Sin embargo, estos estudios no incluyen los costos asociados al manejo de los efectos adversos de estas nuevas terapias (Machin et al., 2018; Rodríguez-Merchán et al., 2021).

3.9. Registro mundial de la federación mundial de hemofilia (FMH)

Desde mayo del 2021, la FMH ha trabajado en el Registro Mundial de Terapia Génica, el cual intenta crear una base de datos de pacientes con hemofilia que recibieron terapia génica. Esto con el fin de comprender mejor las condiciones bajo las cuales se administra la terapia génica, los posibles aspectos de seguridad inesperados o desconocidos y la duración de la eficacia de la terapia en el tiempo. Este monitoreo se realizará por 15 años y cualquier evento ocurrido desde la administración del fármaco será registrado a los 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses iniciales; posteriormente será una vez al año. Además, se llevará un registro de los niveles de factor y los episodios de sangrado para cada participante (Rodríguez-Merchán et al., 2021).

Otro aspecto importante es obtener un consenso en el uso de un acercamiento multidisciplinario en estos pacientes, el cual incluya a especialistas en el área médica, de biología molecular, farmacología clínica y virología. Es importante que estos pacientes reciban consulta con hepatología y gastroenterología con el fin de evaluar la función hepática durante los primeros meses de tratamiento. Deben recibir seguimiento con fisioterapia para revisión de la condición articular de los pacientes, así como ultrasonidos musculoesqueléticos (Rodríguez-Merchán et al., 2021).

Cada uno de los ensayos clínicos en terapia génica necesita un seguimiento de años con el fin de observar una posible presencia de genotoxicidad (Pipe et al., 2023).

Conclusiones

- La hemofilia es una enfermedad que limita la movilidad de quienes la padecen y que puede llevarlos a la muerte, de ahí la importancia de realizar nuevas investigaciones y del desarrollo e implementación de mejores tratamientos para estos pacientes.
- Actualmente los tratamientos de los pacientes hemofílicos se basan en controlar el sangrado y activar la hemostasia por otros medios o a través de otras vías de la coagulación. La presencia de aloanticuerpos contra los concentrados de factor plasmático y recombinante son una complicación adicional para el tratamiento de estos pacientes. Es por ello que se sigue buscando una cura que elimine el riesgo de sangrado y mejore su calidad de vida.
- Es sumamente importante que los países como Costa Rica busquen la forma de mejorar los tratamientos en los pacientes con hemofilia. Estamos en un punto de desarrollo de nuevas terapias que va en ascenso, y es necesario que aquellos pacientes que padecen de cuadros severos tengan una mejor calidad de vida y mejores accesos a nuevas terapias.
- El fin de la terapia génica es tratar una gran variedad de enfermedades asociadas a genes defectuosos a través de la edición génica, la adición de un gen funcional que sustituya al gen dañado o la supresión de genes afuncionales. Así mismo se están realizando gran variedad de estudios donde se quiere aplicar esta terapia para el tratamiento de enfermedades como el cáncer.
- La terapia génica revolucionó el mundo de la medicina y de la investigación tecnológica. Sin embargo, los costos de este tipo de terapias son un limitante para su aplicación por igual a la población. Es necesario trabajar en mejorar las condiciones con el fin de que sean de acceso para cualquier persona que las necesite.
- Desde la aprobación de los primeros tratamientos en terapia génica en el 2012 y hasta la fecha, el crecimiento de esta técnica ha sido exponencial. Esto se

complementa con el desarrollo de nuevas técnicas de edición, silenciamiento y adición génica; así como la manufactura de nuevos vectores y casetes génicos.

- La terapia génica viene a mostrar una luz de esperanza a aquellas personas que padecen enfermedades que hasta la fecha se creían incurables o intratables. Un ejemplo de ello es la terapia génica en hemofilia, que ha logrado obtener niveles de factor sostenidos en el tiempo, con una disminución en la tasa de sangrado y con mínimos efectos adversos a corto plazo para los pacientes tratados.
- Los diferentes ensayos clínicos de los tratamientos actualmente aprobados para terapia génica en hemofilia han mostrado excelentes resultados, sin embargo, aún hay muchas incógnitas que dilucidar. Aún no se ha desarrollado un tratamiento seguro y eficiente para los pacientes pediátricos, no se han realizado ensayos en pacientes que no se hayan expuesto previamente a concentrados de factor, por lo que no se sabe si podrían desarrollar anticuerpos contra el fármaco o contra el producto de expresión de este. Aún se desconoce si estos tratamientos nos mostrarán efectos genotóxicos a futuro o si la concentración del factor se mantendrá estable por años. Se desconoce si personas con alguna patología hepática de importancia podrían recibir este tratamiento. Debido a esto es importante continuar las investigaciones en este campo y hacer el adecuado seguimiento a los participantes ya tratados.
- Los nuevos ensayos clínicos que se están desarrollando en fase I vienen a solventar muchas de las dudas que aún se mantienen en términos de terapia génica en hemofilia. Es importante que se siga trabajando en el uso de edición génica dirigida específicamente, con el fin de buscar un tratamiento para los niños que padecen esta patología.
- Es necesario un seguimiento completo y multidisciplinario de los pacientes hemofílicos que recibieron terapia génica, donde se evalúe no sólo su salud física o la aparición de posibles efectos adversos al tratamiento, sino que se les dé un apoyo integral a través de la incorporación de un grupo de especialistas en diferentes ramas.
- La terapia génica en hemofilia viene a darle esperanza a muchas personas que creían que nunca podrían vivir sin su dosis de factor 3 veces por semana, y que no podían salir a hacer ejercicio sin preocuparse por una hemorragia. Ahí radica

la importancia de buscar nuevas terapias y de seguir haciendo investigación en esta y otras enfermedades.

Referencias bibliográficas

- Anguela, X. M., & High, K. A. (2019). Entering the modern era of gene therapy. *Annual Review of Medicine*, 70(1), 273–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-012017-043332>
- Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., Chen, P. J., Wilson, C. G., Newby, G. A., Raguram, A., & Liu, D. R. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576(7785), 149–157. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
- Aravalli, R. N., Belcher, J. D., & Steer, C. J. (2015). Liver-targeted gene therapy: Approaches and challenges. *Liver Transplantation*, 21(6), 718-737. <https://doi.org/10.1002/lt.24122>
- Argirò, A., Ding, J., & Adler, E. (2023). Terapia génica para la insuficiencia cardiaca y las miocardiopatías. *Revista Española De Cardiología/Revista Española De Cardiología*, 76(12), 1042–1054. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2023.06.016>
- Arruda, V. R., & Doshi, B. S. (2020). Guest Editor: G. Castaman. Gene therapy for hemophilia: facts and quandaries in the 21st century. *Mediterranean Journal Of Hematology And Infectious Diseases*, 12(1).1-17. <https://doi.org/10.4084/mjihid.2020.069>
- Aznauryan, E., Yermanos, A., Kinzina, E., Devaux, A., Kapetanovic, E., Milanova, D., Church, G. M., & Reddy, S. T. (2022). Discovery and validation of human genomic safe harbor sites for gene and cell therapies. *Cell Reports. Methods*, 2(1), 100154. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2021.100154>
- Baas, L., Van Der Graaf, R., Van Hoorn, E. S., Bredenoord, A. L., & Meijer, K. (2023). The ethics of gene therapy for hemophilia: a narrative review. *Journal Of Thrombosis And Haemostasis*, 21(3), 413-420. <https://doi.org/10.1016/j.jtha.2022.12.027>
- Batty, P., & Lillicrap, D. (2019). Advances and challenges for hemophilia gene therapy. *Human Molecular Genetics Online/Human Molecular Genetics*, 28(R1), R95-R101. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz157>
- Baute, R. A. G., Alfonso, T. G., Salabert, L. D., Águila, J. D. F., & Zamora, M. C. (2011). Teoría celular de la coagulación: de las cascadas a las membranas celulares. *DOAJ (DOAJ:*

- Becker, S., & Boch, J. (2021). TALE and TALEN genome editing technologies. *Gene And Genome Editing*, 2, 100007. <https://doi.org/10.1016/j.ggedit.2021.100007>
- Benjamin, R., Jain, N., Maus, M. V., Boissel, N., Graham, C., Jóźwik, A., Yallop, D., Konopleva, M., Frigault, M. J., Teshima, T., Kato, K., Boucaud, F., Balandraud, S., Gianella-Borradori, A., Binlich, F., Marchiq, I., Dupouy, S., Almena-Carrasco, M., Pannaux, M., Kato, K. (2022). UCART19, a first-in-class allogeneic anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for adults with relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukaemia (CALM): a phase 1, dose-escalation trial. *The Lancet Haematology*, 9(11), e833–e843. [https://doi.org/10.1016/s2352-3026\(22\)00245-9](https://doi.org/10.1016/s2352-3026(22)00245-9)
- Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., Greenblatt, J. J., Rosenberg, S. A., Klein, H., Berger, M., Mullen, C. A., Ramsey, W. J., Muul, L., Morgan, R. A., & Anderson, W. F. (1995). T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA⁻ SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science*, 270(5235), 475-480. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.475>
- Bowen, D. J. (2002). Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Journal Of Clinical Pathology-molecular Pathology*, 55(1), 1-18. <https://doi.org/10.1136/mp.55.1.1>
- Bulcha, J., Wang, Y., Ma, H., Tai, P. W. L., & Gao, G. (2021). Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00487-6>
- Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health [CADTH]. (2024). *Fidanacogene Elaparvovec (Beqvez)*. NCBI Bookshelf. Recuperado 7 de junio de 2024, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK602912/>
- Castaman, G., & Matino, D. (2019). Hemophilia A and B: molecular and clinical similarities and differences. *Haematologica*, 104(9), 1702-1709. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.221093>

- Carcao, M., & Goudeman, J. (2018). Los Inhibidores de la Hemofilia: Información Básica. *FMH*, 7(5). <https://www1.wfh.org/publications/files/pdf-1123.pdf>
- Carrasco, I. D., Rasco, A. G., & Ordoñez, A. (2016). ¿Qué son los micro-RNA? ¿Para qué sirven? ¿Qué potenciales beneficios podrían tener en el contexto asistencial? *CardiCore*, 51(4), 161-166. <https://doi.org/10.1016/j.carcor.2015.02.002>
- Center For Biologics Evaluation And Research [CBER]. (2018, July). *What is gene therapy?* U.S. Food And Drug Administration. Retrieved May 1, 2024, from <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/what-gene-therapy>
- Center for Biologics Evaluation and Research [CBER]. (2024, April 25). *YESCARTA*. U.S. Food And Drug Administration. Retrieved May 5, 2024, from <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/yescarta>
- CDC. (2023, 13 julio). Hemofilia: Tratamiento. *Centro Para el Control y la Prevención de Enfermedades*. <https://www.cdc.gov/ncbddd/spanish/hemophilia/treatment.html#:~:text=La%20mejor%20forma%20de%20tratar,de%20la%20coagulaci%C3%B3n%20fabricados%20comercialmente>.
- Chávez-Jacobo, V. M. (2018). El sistema de edición genética CRISPR/CAS y su uso como antimicrobiano específico. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 21(2), 116–123. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.2.5>
- Cheng, Y., Li, L., Hu, P., Yang, Y., Wei, W., Deng, X., Wang, L., Tay, F. R., & Ma, J. (2021). Recent advances in Stimulus-Responsive nanocarriers for gene therapy. *Advanced Science*, 8(14). <https://doi.org/10.1002/advs.202100540>
- Choi, J., Yu, N., Baek, G., Bakes, J., Seo, D., Nam, H. J., Baek, S. H., Lim, C., Lee, Y., & Kaang, B. (2014). Optimization of AAV expression cassettes to improve packaging capacity and transgene expression in neurons. *Molecular Brain*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1756-6606-7-17>
- Choraria, N., Rangarajan, S., John, M. J., Apte, S., Gupta, P., Pai, S., Chand, R., Parvatini, S., Ramakanth, G. S. H., Rupon, J., Chhabra, A., Muley, H. B., & Simoneau, D. (2022).

- Moroctocog Alfa (AF-CC) for Prophylaxis and Treatment of Bleeding Episodes in Previously Treated Patients with Hemophilia A in India. *Indian Journal Of Hematology And Blood Transfusion/Indian Journal Of Hematology And Blood Transfusion*, 39(4), 624-629. <https://doi.org/10.1007/s12288-022-01587-1>
- Cota-Coronado, J., Sandoval-Ávila, S., Gaytan-Dávila, Y., Díaz, N. F., Vega-Ruiz, B., Padilla-Camberos, E., & Díaz-Martínez, N. (2020). Nuevos modelos transgénicos para el estudio de la enfermedad de Parkinson basados en sistemas de edición con nucleasas. *Neurología*, 35(7), 486–499. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2017.08.009>
- Correa, M. F., Adjounian, H., & Adjounian, S. H. (2008). Silenciamiento de genes mediante RNA interferencia. Consideraciones sobre el mecanismo y diseño de los sistemas efectores. *Archivos Venezolanos De Farmacología Y Terapéutica*, 27(1), 22–25. <https://biblat.unam.mx/es/revista/archivos-venezolanos-de-farmacologia-y-terapeutica/articulo/silenciamiento-de-genes-mediante-rna-interferencia-consideraciones-sobre-el-mecanismo-y-diseno-de-los-sistemas-efectores>
- Coutts, M. C. (1994). Human Gene Therapy. *Kennedy Institute of Ethics Journal*, 4(1), 63-83. <https://doi.org/10.1353/ken.0.0148>
- Cox, D. B. T., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Franklin, B., Kellner, M. J., Joung, J., & Zhang, F. (2017). RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*, 358(6366), 1019-1027. <https://doi.org/10.1126/science.aag0180>
- Crudele, J. M., & Chamberlain, J. S. (2018). Cas9 immunity creates challenges for CRISPR gene editing therapies. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05843-9>
- CSL Behring. (2024). *The importance of liver health in haemophilia*. https://www.cslobehringevents.com/-/media/csl-behring-events/hematology/WFH2024/documents/ESP-OTH-0044_WFH-2024_Liver_Health_and_Hemophilia_Primer.PDF
- Dąbrowski, M., Bukowy-Bieryń, Z., & Ziętkiewicz, E. (2015). Translational readthrough potential of natural termination codons in eucaryotes – The impact of RNA sequence. *RNA Biology*, 12(9), 950- 958. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1068497>

- De Wolf, D., Singh, K., Chuah, M. K., & VandenDriessche, T. (2023). Hemophilia Gene Therapy: The End of the Beginning? *Human Gene Therapy*, 34(17-18), 782-792. <https://doi.org/10.1089/hum.2023.112>
- Dhillon, S. (2024). Fidanacogene elaparvovec: First approval. *Drugs*. <https://doi.org/10.1007/s40265-024-02017-4>
- Doncel, S. S. S., Mosquera, G. a. D., Cortes, J. M., Doncel, S. S., Cadavid, F. J. M., & Sánchez, R. G. P. (2023). Haemophilia A: A review of clinical manifestations, treatment, mutations, and the development of inhibitors. *Hematology Reviews*, 15(1), 130-150. <https://doi.org/10.3390/hematolrep15010014>
- Doshi, B. S., & Arruda, V. R. (2018). Gene therapy for hemophilia: what does the future hold? *Therapeutic Advances In Hematology*, 9(9), 273-293. <https://doi.org/10.1177/2040620718791933>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213). <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Dunbar, C. E., High, K. A., Joung, J., Kohn, D. B., Ozawa, K., & Sadelain, M. (2018). Gene therapy comes of age. *Science*, 359(6372). <https://doi.org/10.1126/science.aan4672>
- Edelstein, M., Abedi, M. R., Wixon, J., & Edelstein, R. M. (2004). Gene therapy clinical trials worldwide 1989–2004—an overview. *Journal of Gene Medicine*, 6(6), 597–602. <https://doi.org/10.1002/jgm.619>
- European Medicines Agency [EMA]. (2024). *Medicines*. European Medicines Agency. Recuperado 23 de mayo de 2024, de <https://www.ema.europa.eu/en/medicines>
- Famà, N. R., Borroni, N. E., Merlin, N. S., Airoidi, N. C., Pignani, N. S., Cucci, N. A., Corà, N. D., Bruscajgin, N. V., Scardellato, N. S., Faletti, N. S., Pelicci, N. G., Pinotti, N. M., Walker, N. G. E., & Follenzi, N. A. (2020). Deciphering the Ets-1/2-mediated transcriptional regulation of F8 gene identifies a minimal F8 promoter for hemophilia A gene therapy. *Haematologica*, 106(6), 1624-1635. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.239202>

- Flumian, C., Levy, G., Bravo, G., Gatto, C., Gómez, M., Góngora, A., & Baldi, A. (2011). SIARN y SHARN: aspectos básicos y aplicados. Su uso como agentes terapéuticos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 45(4), 599–719. https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/14774/CONICET_Digital_Nro.17032-XX.pdf?sequence=3&isAllowed=y
- FMH. (2012). La desmopresina (DDAVP) en el tratamiento de los trastornos de la coagulación. *Federación Mundial de Hemofilia*. <https://www1.wfh.org/publications/files/pdf-1132.pdf>
- Frangoul, H., Altshuler, D., Cappellini, M. D., Chen, Y.-S., Domm, J., Eustace, B. K., Foell, J., De La Fuente, J., Grupp, S., Handgretinger, R., Ho, T. W., Kattamis, A., Kernytsky, A., Lekstrom-Himes, J., Li, A. M., Locatelli, F., Mapara, M. Y., De Montalembert, M., Rondelli, D., ... Corbacioglu, S. (2021). CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *New England Journal of Medicine*, 384(3), 252-260. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031054>
- Frenzel, L., Kavakli, K., Klamroth, R., Chiou, S., Shapiro, A. D., Sun, P., Fuiman, J., McKay, J., Fang, A. F., Biondo, F., Plonski, F., & Rupon, J. (2023). Characterizing a Cohort of Patients with Hemophilia B Treated with Fidanacogene Elaparvovec from the Phase 3 Benegene-2 Study Who Returned to Factor IX Prophylaxis. *Blood*, 142(Supplement 1), 2257. <https://doi.org/10.1182/blood-2023-181223>
- Gamero, M. A., Toloza-Moreno, D. L., Belaich, M. N., & Cubillos, G. P. B. (2022). ARN de interferencia (ARNi): una herramienta eficaz en agrobiotecnología. *Revista Colombiana De Biotecnología/Revista Colombiana De Biotecnología*, 24(2), 59–67. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v24n2.99397>
- García-Chávez, J., & Majluf-Cruz, A. (2013). Hemofilia. *Gaceta Médica de México*, 149, 308-321. <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2013/gm133i.pdf>
- García-Chávez, J., & Majluf-Cruz, A. (2019). Hemofilia adquirida. *Gaceta Médica de México*, 156(1). <https://doi.org/10.24875/gmm.19005469>
- Gene therapy. (2024). In CSL Behring (Ed.), *A Primer*. CSL Behring LLC. ESP-OTH-0043. <https://www.cslobehringevents.com/-/media/csl-behring->

[events/hematology/WFH2024/documents/ESP-OTH-0043_WFH-2024_Gene_Therapy_Primer.PDF?fbclid=IwZXh0bqNhZW0CMTAAAR0LZY_eBSz64oVGfBqOb7bbrarATkl69BIM4IKePyWypqB-avw_K-NsUUI_aem_AV0dZAvehdMxyly4MZXXoZi0_9GERqIUxYHfOMz65jQHqQCh5DjeFvUUK5VkAr33UWbmgbTtNaKICdJdnyPy-Zwo](https://www.fda.gov/oc/ohrt/2024/hematology/WFH2024/documents/ESP-OTH-0043_WFH-2024_Gene_Therapy_Primer.PDF?fbclid=IwZXh0bqNhZW0CMTAAAR0LZY_eBSz64oVGfBqOb7bbrarATkl69BIM4IKePyWypqB-avw_K-NsUUI_aem_AV0dZAvehdMxyly4MZXXoZi0_9GERqIUxYHfOMz65jQHqQCh5DjeFvUUK5VkAr33UWbmgbTtNaKICdJdnyPy-Zwo)

- George, L. A., Monahan, P. E., Eyster, M. E., Sullivan, S. K., Ragni, M. V., Croteau, S. E., Rasko, J. E., Recht, M., Samelson-Jones, B. J., MacDougall, A., Jaworski, K., Noble, R., Curran, M., Kuranda, K., Mingozzi, F., Chang, T., Reape, K. Z., Anguela, X. M., & High, K. A. (2021). Multiyear Factor VIII Expression after AAV Gene Transfer for Hemophilia A. *New England Journal Of Medicine/The New England Journal Of Medicine*, 385(21), 1961-1973. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2104205>
- Giner, M., Montoya, M., Vázquez, M., Miranda, C., Miranda, M., & Pérez-Cano, R. (2016). ¿Qué son los microARNs?: posibles biomarcadores y dianas terapéuticas en la enfermedad osteoporótica. *Rev Osteoporos Metab Miner*, 8(1), 40-44. Recuperado 13 de junio de 2024, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1889-836X2016000100007&lng=es&tlng=es.
- Giono, L. (2017). CRISPR/Cas9 y la terapia génica. *Medicina*, 77(5), ISSN 1669-9106. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802017000500009&lng=es&tlng=es.
- Goswami, R., Subramanian, G., Silayeva, L., Newkirk, I., Doctor, D., Chawla, K., Chattopadhyay, S., Chandra, D., Chilukuri, N., & Betapudi, V. (2019). Gene Therapy Leaves a Vicious Cycle. *Frontiers In Oncology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00297>
- Gouw, S. C., Van Den Berg, H. M., Oldenburg, J., Astermark, J., De Groot, P. G., Margaglione, M., Thompson, A. R., Van Heerde, W. L., Boekhorst, J. C., Miller, C. H., Cessie, S. L., & Van Der Bom, J. G. (2012). F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood*, 119(12), 2922-2934. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-379453>
- Gunasekera, D., Vir, P., Karim, A. F., Ragni, M. V., & Pratt, K. P. (2023). Hemophilia A subjects with an intron-22 gene inversion mutation show CD4+ T-effector responses to multiple

epitopes in FVIII. *Frontiers In Immunology*, 14.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1128641>

Harmatz, P., Prada, C. E., Burton, B. K., Lau, H., Kessler, C. M., Cao, L., Falaleeva, M., Villegas, A. G., Zeitler, J., Meyer, K., Miller, W. P., Foo, C. W. P., Vaidya, S. A., Swenson, W., Shiue, L. H., Rouy, D., & Muenzer, J. (2022). First-in-human in vivo genome editing via AAV-zinc-finger nucleases for mucopolysaccharidosis I/II and hemophilia B. *Molecular Therapy*, 30(12), 3587–3600. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.10.010>

High, K. A. (2012). The gene therapy journey for hemophilia: are we there yet? *Blood*, 120(23), 4482-4487. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-423210>

Howard, H., Van El, C. G., Forzano, F., Radojković, D., Rial-Sebbag, E., De Wert, G., Borry, P., & Cornel, M. C. (2017). One small edit for humans, one giant edit for humankind? Points and questions to consider for a responsible way forward for gene editing in humans. *European Journal of Human Genetics*, 26(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41431-017-0024-z>

Huynh, N., Depner, N., Larson, R., & King-Jones, K. (2020). A versatile toolkit for CRISPR-Cas13-based RNA manipulation in *Drosophila*. *Genome Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02193-y>

Jo, B. S., & Choi, S. S. (2015). Introns: The functional benefits of introns in genomes. *Genomics & Informatics/Genomics & Informatics*, 13(4), 112. <https://doi.org/10.5808/gi.2015.13.4.112>

Jogalekar, M. P., Rajendran, R. L., Khan, F., Dmello, C., Gangadaran, P., & Ahn, B. (2022). CAR T-Cell-Based gene therapy for cancers: new perspectives, challenges, and clinical developments. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.925985>

Khalil, A. M. (2020). The genome editing revolution: review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology /Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00078-y>

Klamroth, R., Cuker, A., Alzahrani, H., Astermark, J., Frenzel, L., Katsarou, O., Kavakli, K., Matino, D., Shapiro, A., Wang, J., Fuiman, J., McKay, J., Sun, P., & Rupon, J. (2024).

- Efficacy and Safety of Fidanacogene Elaparvovec in Adults with Moderately Severe or Severe Hemophilia B: Results from the Phase 3 BENEGENE-2 Gene Therapy Trial. *Hämostaseologie*. <https://doi.org/10.1055/s-0044-1779185>
- Konkle, B. A. y Nakaya, S. (2023, 9 febrero). *Hemophilia B*. GeneReviews® - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1495/>
- Kumar, S. R., Markusic, D. M., Biswas, M., High, K. A., & Herzog, R. W. (2016). Clinical development of gene therapy: Results and lessons from recent successes. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 3, 16034. <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.34>
- Lacroix-Desmazes, S., Voorberg, J., Lillicrap, D., Scott, D. W., & Pratt, K. P. (2020). Tolerating Factor VIII: recent progress. *Frontiers In Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02991>
- Leavitt, A. D., Konkle, B. A., Stine, K. C., Visweshwar, N., Harrington, T., Arkin, S., Fang, A., Plonski, F., Yver, A., Ganne, F., Agathon, D., De los Angeles Resa, M., Tseng, L., Di Russo, G., Cockroft, B. M., Cao, L., & Rupon, J. (2023). Giroctocogene fitelparvovec gene therapy for severe hemophilia A: 104-week analysis of the Phase 1/2 Alta study. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.2022018971>
- Leonova, E. I., & Gainetdinov, R. R. (2020). CRISPR/Cas9 Technology in Translational Biomedicine. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 54(3), 354-370. <https://doi.org/10.33594/000000224>
- Li, T., Yang, Y., Qi, H., Cui, W., Zhang, L., Fu, X., He, X., Liu, M., Li, P., & Yu, T. (2023). CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Signal Transduction And Targeted Therapy*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01309-7>
- Li, Y., Yu, H., Zhao, L., Zhu, Y., Bai, R., Jin, Z., Fu, Z., Zhang, X., Su, J., Liu, H., Shi, X., Han, D., & Chen, Y. (2020). Effects of carbon nanotube-mediated Caspase3 gene silencing on cardiomyocyte apoptosis and cardiac function during early acute myocardial infarction. *Nanoscale*, 12(42), 21599–21604. <https://doi.org/10.1039/d0nr05032f>

- Liesner, R. J., Abraham, A., Altisent, C., Belletrutti, M. J., Carcao, M., Carvalho, M., Chambost, H., Chan, A. K. C., Dubey, L., Ducore, J., Gattens, M., Gresele, P., Gruel, Y., Guillet, B., Jimenez-Yuste, V., Kitanovski, L., Klukowska, A., Lohade, S., Mancuso, M. E., ... Neufeld, E. J. (2021). Simoctocog Alfa (Nuwiq) in Previously Untreated Patients with Severe Haemophilia A: Final Results of the NuProtect Study. *Thrombosis and Haemostasis*, 121(11), 1400-1408. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1722623>
- Liñan-Torres, A., García-Torres, R. C., & Palomares, L. A. (2023). Virus adeno-asociado y su uso en virotecnología. *BioTecnología*, 27(5), 53–66. <https://smbb.mx/wp-content/uploads/2023/12/Linan-Torres-et-al-2023.pdf>
- López-Arroyo, J. L., Pérez-Zúñiga, J. M., Merino-Pasaye, L. E., Saavedra-González, A., Alcivar-Cedeño, L. M., Álvarez-Vera, J. L., Anaya-Cuéllar, I., Arana-Luna, L. L., Ávila-Castro, D., Bates-Martín, R. A., Cesarman-Maus, G., Chávez-Aguilar, L. A., De la Peña-Celaya, J. A., Espitia-Ríos, M. E., Estrada-Domínguez, P., Fermín-Caminero, D., Flores-Patricio, W., Chávez, J. G., García-Lee, M. T., . . . Ibarra, M. A. (2023). Consenso de hemofilia en México. *Gaceta Médica de Mexico*, 157(91). <https://doi.org/10.24875/gmm.m20000451>
- López-Santiago, N. (2016). Pruebas de coagulación. *Acta Pediátrica Mexicana*, 374(4), 241-245. <https://www.scielo.org.mx/pdf/apm/v37n4/2395-8235-apm-37-04-00241.pdf>
- Machin, N., Ragni, M. V., & Smith, K. J. (2018). Gene therapy in hemophilia A: a cost-effectiveness analysis. *Blood Advances*, 2(14), 1792–1798. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018021345>
- Maeder, M. L., & Gersbach, C. A. (2016). Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Molecular Therapy*, 24(3), 430-446. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.10>
- Majowicz, A., Nijmeijer, B., Lampen, M. H., Spronck, L., De Haan, M., Petry, H., Van Deventer, S. J., Meyer, C., Tangelder, M., & Ferreira, V. (2019). Therapeutic hFIX Activity Achieved after Single AAV5-hFIX Treatment in Hemophilia B Patients and NHPs with Pre-existing Anti-AAV5 NABs. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 14, 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.05.009>

- Majumder, R. (2022). Phosphatidylserine Regulation of Coagulation Proteins Factor IXa and Factor VIIIa. *The Journal Of Membrane Biology*, 255(6), 733-737. <https://doi.org/10.1007/s00232-022-00265-7>
- Mannucci, P. M. (2023). Hemophilia treatment innovation: 50 years of progress and more to come. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 21(3), 403-412. <https://doi.org/10.1016/j.jth.2022.12.029>
- Manta, A., Gogoi, G., & Khakhlari, N. M. (2023). Utility of Mixing Studies for Screening Haemophilia in a Resource Limited Hospital Setting. *Methodology*, 13(3). <https://scope-journal.com/assets/uploads/doc/694e1-1117-1120.202317491.pdf>
- Mao, Z., Bozzella, M. J., Seluanov, A., & Gorbunova, V. (2008). DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle*, 7(18), 2902–2906. <https://doi.org/10.4161/cc.7.18.6679>
- Marchesini, E., Morfini, M., & Valentino, L. A. (2021). Recent Advances in the Treatment of Hemophilia: A review. *Biologics: Targets & Therapy, Volume 15*, 221–235. <https://doi.org/10.2147/btt.s252580>
- Martínez-Frías, M. (2010). Estructura y función del ADN y de los genes. I Tipos de alteraciones de la función del gen por mutaciones. *SEMERGEN. Sociedad Española De Medicina Rural Y Generalista*, 36(5), 273–277. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2009.12.014>
- Martínez-Molina, E., Chocarro-Wrona, C., Martínez-Moreno, D., Marchal, J. A., & Boulaiz, H. (2020). Large-Scale production of lentiviral vectors: Current perspectives and challenges. *Pharmaceutics*, 12(11), 1051. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111051>
- Miesbach, W., Foster, G. R., & Peyvandi, F. (2023). Liver-related aspects of gene therapy for haemophilia: Call to action for collaboration between haematologists and hepatologists. *Journal Of Hepatology*, 78(3), 467-470. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.11.014>
- Miller, C. H. (2021). The Clinical Genetics of Hemophilia B (Factor IX Deficiency). *The Application Of Clinical Genetics, Volume 14*, 445-454. <https://doi.org/10.2147/tacg.s288256>

Mosimann, C., & Zon, L. I. (2011). Advanced Zebrafish Transgenesis with Tol2 and Application for Cre/lox Recombination Experiments. In *Methods in cell biology* (pp. 173–194). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374814-0.00010-0>

Nathwani, A. C. (2022). Gene therapy for hemophilia. *Hematology*, 2022(1), 569-578. <https://doi.org/10.1182/hematology.2022000388>

National Bleeding Disorders Foundation [NBDF] (4 de febrero del 2024). Bleeding disorders history. <https://www.hemophilia.org/bleeding-disorders-a-z/overview/history>

National Library of Medicine [NIH], U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, & National Center for Biotechnology Information. (2022, October). *CAR T cells: Engineering patients immune cells to treat their cancers*. National Cancer Institute. Retrieved May 1, 2024, from <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells>

National Library of Medicine [NIH], U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, & National Center for Biotechnology Information. (2024a). *Clinical trials: Concizumab*. ClinicalTrials.gov. Recuperado 13 de junio de 2024, de <https://clinicaltrials.gov/search?intr=Concizumab>

National Library of Medicine [NIH], U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, & National Center for Biotechnology Information. (2024b, March). *Clinical Trials: CRISPR Cas9*. ClinicalTrials. <https://clinicaltrials.gov/search?intr=CRISPR%2FCas9&page=2>

National Library of Medicine [NIH], U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, & National Center for Biotechnology Information. (2024c). *Clinical trials: Fitusiran*. ClinicalTrials.gov. Recuperado 13 de junio de 2024, de <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03549871?intr=fitusiran&rank=6>

National Library of Medicine [NIH], U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, & National Center for Biotechnology Information. (2024d). *Clinical trials: Hemophilia A gene therapy*. ClinicalTrials.gov. Recuperado 21 de mayo de 2024, de

<https://www.clinicaltrials.gov/search?cond=Hemophilia%20A,%20Severe&intr=gene%20therapy>

National Library of Medicine [NIH], U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, & National Center for Biotechnology Information. (2024e). *Clinical trials: Hemophilia B gene therapy*. ClinicalTrials.gov. Recuperado 23 de mayo de 2024, de

<https://www.clinicaltrials.gov/search?cond=Hemophilia%20B&intr=gene%20therapy&page=1>

Nguyen, G., George, L., Siner, J., Davidson, R., Zander, C., Zheng, X., Arruda, V., Camire, R., & Sabatino, D. (2017). Novel factor VIII variants with a modified furin cleavage site improve the efficacy of gene therapy for hemophilia A. *Journal Of Thrombosis And Haemostasis*, 15(1), 110-121. <https://doi.org/10.1111/jth.13543>

O'Hanlon, K. (2023, November 1). *News: Clinical Trial Update: Positive Clinical Data for First Ever CRISPR Therapy for HIV - CRISPR Medicine*. CRISPR Medicine. <https://crisprmedicineneeds.com/news/clinical-trial-update-positive-clinical-data-for-first-ever-crispr-therapy-for-hiv/>

Ozelo, M. C., Mahlangu, J., Pasi, K. J., Giermasz, A., Leavitt, A. D., Laffan, M., Symington, E., Quon, D. V., Wang, J., Peerlinck, K., Pipe, S. W., Madan, B., Key, N. S., Pierce, G. F., O'Mahony, B., Kaczmarek, R., Henshaw, J., Lawal, A., Jayaram, K., Kim, B. (2022). Valoctocogene Roxaparvovec Gene Therapy for Hemophilia A. *New England Journal Of Medicine/The New England Journal Of Medicine*, 386(11), 1013-1025. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2113708>

Pan, X., Yue, Y., Boftsi, M., Wasala, L. P., Tran, N. T. L., Zhang, K., Pintel, D. J., Tai, P. W. L., & Duan, D. (2021). Rational engineering of a functional CpG-free ITR for AAV gene therapy. *Gene Therapy*, 29(6), 333–345. <https://doi.org/10.1038/s41434-021-00296-0>

Papadakis, E. D., Nicklin, S. A., Baker, A. H., & White, S. J. (2004). Promoters and Control Elements: Designing Expression Cassettes for Gene Therapy. *Current Gene Therapy*, 4(1), 89-113. <https://doi.org/10.2174/1566523044578077>

- Pascual, S. I. P. (2012). Tratamiento con oligonucleótidos antisentido en la enfermedad de Duchenne. *Revista De Neurología/Revista De Neurología Electrónica*, 54(S03), 31. <https://doi.org/10.33588/rn.54s03.2012245>
- Patil, S. R., Al-Zoubi, I. A., Raghuram, P. H., Misra, N., Yadav, N., & Alam, M. K. (2018). Gene therapy: A comprehensive review. *Int Med J*, 25(6), 361-4. https://www.researchgate.net/profile/Mohammad-Alam-91/publication/329250849_Gene_therapy_A_comprehensive_review/links/5e08fa6ea6fdcc28374855a4/Gene-therapy-A-comprehensive-review.pdf
- Perrin, G. Q., Herzog, R. W., & Markusic, D. M. (2019). Update on clinical gene therapy for hemophilia. *Blood*, 133(5), 407-414. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-07-820720>
- Pezeshkpoor, B., Oldenburg, J., & Pavlova, A. (2022). Insights into the Molecular Genetic of Hemophilia A and Hemophilia B: The Relevance of Genetic Testing in Routine Clinical Practice. *Hämostaseologie*, 42(06), 390–399. <https://doi.org/10.1055/a-1945-9429>
- Physicians World Europe GmbH. (2024, mayo). *Pruebas de detección de inhibidores. Coagulation Assays*. Recuperado 11 de junio de 2024, de https://www.coagulationassays.com/es_es/home/laboratory-assays/inhibitor-assays.html
- Piamo, A., J., & Rojas, M., A. (2018). Uso de ácido tranexámico en las hemorragias. *Revista Cubana Cirugía*, 57(4), ISSN 0034-7493. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74932018000400008#:~:text=El%20ácido%20tranexámico%20es%20un,complejo%20activador%20del%20plasminógeno%2Dplasmina.
- Pipe, S. W., Gonen-Yaacovi, G., & Segurado, O. G. (2022). Hemophilia A gene therapy: current and next-generation approaches. *Expert Opinion On Biological Therapy*, 22(9), 1099-1115. <https://doi.org/10.1080/14712598.2022.2002842>
- Pipe, S. W., Leebeek, F. W., Recht, M., Key, N. S., Castaman, G., Miesbach, W., Lattimore, S., Peerlinck, K., Van Der Valk, P., Coppens, M., Kampmann, P., Meijer, K., O'Connell, N., Pasi, K. J., Hart, D. P., Kazmi, R., Astermark, J., Hermans, C. R., Klamroth, R., . . . Monahan, P. E. (2023). Gene Therapy with Etranacogene Dezaparvovec for Hemophilia

- B. *New England Journal Of Medicine/ The New England Journal Of Medicine*, 388(8), 706-718. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2211644>
- Poletti, V., & Mavilio, F. (2021). Designing lentiviral vectors for gene therapy of genetic diseases. *Viruses*, 13(8), 1526. <https://doi.org/10.3390/v13081526>
- Powell, S., Rivera-Soto, R., & Gray, S. J. (2015). Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy. *Carolina Digital Repository (University of North Carolina at Chapel Hill)*. <https://doi.org/10.17615/2x9m-k248>
- Qasim, W., Zhan, H., Samarasinghe, S., Adams, S., Amrolia, P., Stafford, S., Butler, K., Rivat, C., Wright, G., Somana, K., Ghorashian, S., Pinner, D., Ahsan, G., Gilmour, K., Lucchini, G., Inglott, S., Mifsud, W., Chiesa, R., Peggs, K. S., . . . Veys, P. (2017). Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Science Translational Medicine*, 9(374). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaj2013>
- Qin, S., Tang, X., Chen, Y., Chen, K., Fan, N., Xiao, W., Zheng, Q., Li, G., Teng, Y., Wu, M., & Song, X. (2022). mRNA-based therapeutics: powerful and versatile tools to combat diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01007-w>
- Rao, S., Yao, Y., Huo, W., Cao, Y., & Budde, L. E. (2024). Revolutionizing genetic disease treatment: The case of Exagamglogene autotemcel. *The Innovation*, 100619. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2024.100619>
- Rangarajan, S., Walsh, L., Lester, W., Perry, D., Madan, B., Laffan, M., Yu, H., Vettermann, C., Pierce, G. F., Wong, W. Y., & Pasi, K. J. (2017). AAV5–Factor VIII Gene Transfer in Severe Hemophilia A. *New England Journal Of Medicine/ The New England Journal Of Medicine*, 377(26), 2519-2530. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1708483>
- Redman, M., King, A., Watson, C. J., & King, D. C. (2016). What is CRISPR/Cas9? *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition/Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition.*, 101(4), 213–215. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-310459>

- Roberts, T. C., Langer, R., & Wood, M. J. A. (2020). Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nature Reviews. Drug Discovery/Nature Reviews. Drug Discovery*, 19(10), 673-694. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0075-7>
- Roche. (2024). Hemlibra: Emicizumab. En *assets.roche* (DI-2024-2599). Recuperado 13 de junio del 2024, de https://assets.roche.com/f/173824/x/ae00e48a28/prospecto_hemlibra_com_prof.pdf
- Rodríguez-Merchán, E. C., De Pablo-Moreno, J. A., & Liras, A. (2021). Gene Therapy in Hemophilia: Recent Advances. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(14), 7647. <https://doi.org/10.3390/ijms22147647>
- Ruiz-Sáez, A. (2021). Tratamiento moderno de la hemofilia y el desarrollo de terapias innovadoras. *Investigación Clínica*, 62(1), 73-95. <https://doi.org/10.22209/ic.v62n1a07>
- Ruiz, M., & Sangro, B. (2005). Terapia génica: ¿Qué es y para qué sirve? *Anales Sis San Navarra*, 28(1), ISSN1137-6627. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000100002&lng=es&tlng=es.
- Santos, C., Malheiro, S., Correia, M., & Damásio, J. (2023). Gene suppression therapies in Hereditary cerebellar ataxias: A Systematic Review of animal studies. *Cells*, 12(7), 1037. <https://doi.org/10.3390/cells12071037>
- Samelson-Jones, B., Finn, J. D., Raffini, L., Merricks, E. P., Camire, R. M., Nichols, T. C., & Arruda, V. R. (2021a). Evolutionary insights into coagulation factor IX Padua and other high-specific-activity variants. *Blood Advances*, 5(5), 1324-1332. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000405>
- Samelson-Jones, B. J., Sullivan, S. K., Rasko, J. E., Giermasz, A., George, L. A., Ducore, J. M., Teitel, J. M., McGuinn, C. E., O'Brien, A., Winburn, I., Smith, L. M., Chhabra, A., & Rupon, J. (2021b). Follow-up of More Than 5 Years in a Cohort of Patients with Hemophilia B Treated with Fidanacogene Elaparvovec Adeno-Associated Virus Gene Therapy. *Blood*, 138(Supplement 1), 3975. <https://doi.org/10.1182/blood-2021-150541>
- Sekayan, T., Simmons, D. H., & Von Drygalski, A. (2023). Etranacogene dezaparvovec-drlb gene therapy for patients with hemophilia B (congenital factor IX deficiency). *Expert*

Opinion On Biological Therapy, 23(12), 1173-1184.
<https://doi.org/10.1080/14712598.2023.2282138>

Shah, J., Kim, H., Sivamurthy, K., Monahan, P. E., & Fries, M. (2022). Comprehensive analysis and prediction of long-term durability of factor IX activity following etranacogene dezaparvovec gene therapy in the treatment of hemophilia B. *Current Medical Research And Opinion*, 39(2), 227-237. <https://doi.org/10.1080/03007995.2022.2133492>

Shahryari, A., Nazari, Z., Jazi, M. S., Hashemi-Shahraki, F., Wißmiller, K., Xu, W., Burtscher, I., & Lickert, H. (2022). Gene therapy. In *Elsevier eBooks* (pp. 326–368). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820472-6.00213-9>

Shirley, J. L., De Jong, Y. P., Terhorst, C., & Herzog, R. W. (2020). Immune responses to viral gene therapy vectors. *Molecular Therapy*, 28(3), 709–722. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.01.001>

Sidonio, R. F., Hoffman, M., Kenet, G., & Dargaud, Y. (2023). Thrombin generation and implications for hemophilia therapies: A narrative review. *Research And Practice In Thrombosis And Haemostasis*, 7(1), 100018. <https://doi.org/10.1016/j.rpth.2022.100018>

Simioni, P., Tormene, D., Tognin, G., Gavasso, S., Bulato, C., Iacobelli, N. P., Finn, J. D., Spiezia, L., Radu, C., & Arruda, V. R. (2009). X-Linked Thrombophilia with a Mutant Factor IX (Factor IX Padua). *New England Journal Of Medicine/ The New England Journal Of Medicine*, 361(17), 1671-1675. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0904377>

Silva, G. E. (2022). Avances en terapia génica en humanos: Algunos conceptos básicos y un recorrido histórico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 33(2), 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2022.03.001>

Soroka, A. B., Feoktistova, S. G., Mityaeva, O. N., & Volchkov, P. Y. (2023). Gene Therapy Approaches for the Treatment of Hemophilia B. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24(13), 10766. <https://doi.org/10.3390/ijms241310766>

Soucie, J. M., Miller, C. H., Dupervil, B., Le, B., & Buckner, T. W. (2020). Occurrence rates of haemophilia among males in the United States based on surveillance conducted in specialized haemophilia treatment centres. *Haemophilia*, 26(3), 487-493. <https://doi.org/10.1111/hae.13998>

- Spark Therapeutics. (2022, 12 diciembre). *Spark Therapeutics Announces Updated Phase 1/2 Study Results Supporting the Durability of Investigational Gene Therapy SPK-8011 in Patients With Hemophilia A*. Recuperado 7 de junio de 2024, de https://sparktx.com/press_releases/spark-therapeutics-announces-updated-phase-1-2-study-results-supporting-the-durability-of-investigational-gene-therapy-spk-8011-in-patients-with-hemophilia-a/
- Sueldo, E., Duboscq, C., & Arias, M. (2020). Validación del ensayo FVIII:C cromogénico en una plataforma automatizada. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 54(2), 135-143. <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v54n2/v54n2a04.pdf>
- Srivastava, A., Santagostino, E., Dougall, A., Kitchen, S., Sutherland, M. L., Pipe, S. W., Carção, M., Mahlangu, J., Ragni, M. V., Windyga, J., Llinás, A., Goddard, N. J., Mohan, R., Poonnoose, P. M., Feldman, B. M., Lewis, S. Z., Van Den Berg, H. M., & Pierce, G. F. (2020). WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia*, 26(S6), 1-158. <https://doi.org/10.1111/hae.14046>
- Tebas, P., Stein, D., Tang, W. W., Frank, I., Wang, S. Q., Lee, G., Spratt, S. K., Surosky, R., Giedlin, M., Nichol, G., Holmes, M. C., Gregory, P. D., Ando, D., Kalos, M., Collman, R. G., Binder-Scholl, G., Plesa, G., Hwang, W., Levine, B. L., & June, C. H. (2014). Gene Editing of CCR5 in Autologous CD4 T Cells of Persons Infected with HIV. *The New England Journal of Medicine*, 370(10), 901–910. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1300662>
- Tiede, A., Collins, P. W., Knoebl, P., Teitel, J., Kessler, C. M., Shima, M., Di Minno, G., D'Oiron, R., Salaj, P., Jiménez-Yuste, V., Huth-Kühne, A., & Giangrande, P. (2020). International recommendations on the diagnosis and treatment of acquired hemophilia A. *Haematologica*, 105(7), 1791-1801. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.230771>
- Tong, A. W., & Nemunaitis, J. (2008). Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy? *Cancer Gene Therapy*, 15(6), 341–355. <https://doi.org/10.1038/cgt.2008.8>
- Thornburg, C. D. (2021). Etranacogene dezaparvovec for hemophilia B gene therapy. *Therapeutic Advances In Rare Disease*, 2, 263300402110588. <https://doi.org/10.1177/26330040211058896>

- Urits, I., Swanson, D. R., Swett, M. C., Patel, A., Berardino, K., Amgalan, A., Berger, A. A., Kassem, H., Kaye, A. D., & Viswanath, O. (2020). A Review of Patisiran (ONPATTRO®) for the Treatment of Polyneuropathy in People with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *Neurology And Therapy*, 9(2), 301-315. <https://doi.org/10.1007/s40120-020-00208-1>
- U.S. Food and Drug Administration [FDA]. (2023, junio 29). La FDA aprueba la primera terapia génica para adultos que padecen hemofilia A severa [Press announcements]. *FDA News Release*. [https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/la-fda-aprueba-la-primera-terapia-genica-para-adultos-que-padecen-hemofilia-severa#:~:text=\(FDA%2C%20por%20sus%20siglas%20en,prueba%20aprobada%20por%20la%20FDA.](https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/la-fda-aprueba-la-primera-terapia-genica-para-adultos-que-padecen-hemofilia-severa#:~:text=(FDA%2C%20por%20sus%20siglas%20en,prueba%20aprobada%20por%20la%20FDA.)
- U.S. Food and Drug Administration [FDA]. (2024, April 26). *Approved cellular and gene therapy products*. fda.gov. Retrieved May 11, 2024, from <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products>
- Úsuga, X., & Rugeles, M. T. (2006). Ribonucleasas: su potencial terapéutico en infecciones virales. *DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals)*. <https://doaj.org/article/0a161f1778ec42bcad782fb83a624f59>
- VandenDriessche, T., & Chuah, M. (2018). Hyperactive Factor IX Padua: A Game-Changer for Hemophilia Gene Therapy. *Molecular Therapy*, 26(1), 14-16. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.12.007>
- Viesca-Contreras, V., Amatón-Tabares, R., & Duque-Rodríguez, J. (2017). Hemofilia adquirida tipo A: Reporte de caso. *Revista Médica MD*, 3, 113-118. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2017/md173i.pdf>
- Von Drygalski, A., Giermasz, A., Castaman, G., Key, N. S., Lattimore, S., Leebeek, F. W. G., Miesbach, W., Recht, M., Long, A., Gut, R., Sawyer, E. K., & Pipe, S. W. (2019). Etranacogene dezaparvovec (AMT-061 phase 2b): normal/near normal FIX activity and bleed cessation in hemophilia B. *Blood Advances*, 3(21), 3241-3247. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000811>

- Ward, N. J., Buckley, S. M. K., Waddington, S. N., VandenDriessche, T., Chuah, M. K. L., Nathwani, A. C., McIntosh, J., Tuddenham, E. G. D., Kinnon, C., Thrasher, A. J., & McVey, J. H. (2011). Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high-level expression. *Blood*, *117*(3), 798-807. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-282707>
- Wirth, T., Parker, N. R., & Ylä-Herttuala, S. (2013). History of gene therapy. *Gene*, *525*(2), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.137>
- World Federation of Hemophilia [WFH] (2023). World Federation of Hemophilia report on the annual global survey 2022. <https://www1.wfh.org/publications/files/pdf-2399.pdf>
- Xu, Y., & Li, Z. (2020). CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *18*, 2401–2415. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.08.031>
- Xue, F., Li, H., Wu, X., Liu, W., Zhang, F., Tang, D., Chen, Y., Wang, W., Chi, Y., Zheng, J., Du, Z., Jiang, W., Zhong, C., Wei, J., Zhu, P., Fu, R., Liu, X., Chen, L., Pei, X., . . . Zhang, L. (2022). Safety and activity of an engineered, liver-tropic adeno-associated virus vector expressing a hyperactive Padua factor IX administered with prophylactic glucocorticoids in patients with haemophilia B: a single-centre, single-arm, phase 1, pilot trial. *The Lancet. Haematology*, *9*(7), e504-e513. [https://doi.org/10.1016/s2352-3026\(22\)00113-2](https://doi.org/10.1016/s2352-3026(22)00113-2)
- Zhang, H., Rigo, F., & Martinson, H. G. (2015). Poly(A) Signal-Dependent Transcription Termination Occurs through a Conformational Change Mechanism that Does Not Require Cleavage at the Poly(A) Site. *Molecular Cell*, *59*(3), 437–448. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.008>
- Zhao, Z., Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2021). Viral VECTOR-BASED gene therapies in the clinic. *Bioengineering & Translational Medicine*, *7*(1). <https://doi.org/10.1002/btm2.10258>
- Zu, H., & Gao, D. (2021). Non-viral vectors in gene therapy: recent development, challenges, and prospects. *The AAPS Journal*, *23*(4). <https://doi.org/10.1208/s12248-021-00608-7>