



***CRISPR-Cas Y SU APLICACIÓN SOBRE UN MODELO DE ADENOVIRUS COMO  
ALTERNATIVA TERAPÉUTICA PARA LA RESOLUCIÓN DE LA LMC***

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÀ D.C OCTUBRE DE 2021**



***CRISPR-Cas Y SU APLICACIÓN SOBRE UN MODELO DE ADENOVIRUS COMO  
ALTERNATIVA TERAPÉUTICA PARA LA RESOLUCIÓN DE LA LMC***

**ESTUDIANTE**

**PAULA DANIELA QUINTERO PINEDA**

**ASESORA INTERNA**

**Mg YALILE IBETH LÓPEZ LOPEZ**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO 2**

**TRABAJO DE GRADO**

**BOGOTÀ D.C OCTUBRE DE 2021**



***CRISPR-Cas Y SU APLICACIÓN SOBRE UN MODELO DE ADENOVIRUS COMO  
ALTERNATIVA TERAPÉUTICA PARA LA RESOLUCIÓN DE LA LMC***

**APROBADA** \_\_\_\_\_

**JURADOS** \_\_\_\_\_

**ASESORES** \_\_\_\_\_

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO 3**

**TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÀ D.C 03 DE SEPTIEMBRE DE 2021**

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo de grado primeramente a mi madre que siempre me apoyo en la aventura de vivir sola en una nueva ciudad en busca de mi sueño, quien además me aconsejo, me guio y me fortaleció creando en mi la convicción de que nada es imposible y todo está al alcance de un solo paso: el compromiso por amor a lo que se hace. A mi hermana por estar para mi en los momentos de mayor tensión durante la finalización de este maravilloso trabajo que aún falta por construir y tangibilizar, a mi padre que antes de partir sembró en mí la semilla del servicio y quién espero se sienta orgulloso de este inigualable primer logro de muchos que ansío conseguir en un futuro, a mi docente asesora Yalile Ibeth Lòpez que más que una simple guía fue y seguirá siendo mi ídolo y quien además como tantos docentes y compañeros de la universidad, merece mi profundo respeto y agradecimiento.

Finalmente le dedico este, que es uno de los primeros logros que he alcanzado, a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca quien además de abrirme sus puertas, terminó de forjar con sus docentes a la persona que soy hoy día y el conocimiento que me otorgó para el desarrollo de este tan emotivo y arduo proyecto.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco de antemano a Dios por permitirme vivir tal experiencia, a mi madre por apoyarme incondicionalmente en el trayecto de estos 5 años alejada de ella, a la profesora Yalile por siempre estar en completa disposición y entrega frente a este proyecto que espero, en un futuro no muy lejano contribuya al tratamiento no solo de la leucemia mieloide crónica, sino que también partiendo de ella permita abrir nuevos horizontes que apunten a los demás trastornos neoplásicos responsables de la pérdida de millones de vidas a nivel mundial anualmente.

Agradezco a la profesora Ibeth Romero, quien de manera desinteresada y sin responsabilidad alguna direccionó en sobremanera la edición génica que mejor se acopla al modelo viral descrito aquí. A la profesora Esperanza Trujillo de virología por esclarecer de igual modo sin responsabilidad alguna el posible mecanismo de acción el modelo viral bajo su implementación como terapia viral oncolítica, a la profesora Alejandra Infante quien aun fuera del país que facilitó comunicarme con doctores de la Universidad Nacional y así revisar investigaciones muy próximas a la mía que, dentro de otras cosas me permitió dar respuesta a muchas de las incertidumbres respecto al tema entorno sobre todo, a la inocuidad y la viabilidad de aplicarlo in vivo, a la doctora Gloria Uribe encargada de hematología especial del HOMI quien de su estrecha disponibilidad de tiempo me dio el placer de poder sustentar mi trabajo de grado y establecer su posición y dudas respecto al tema en base a su extensa experiencia en hematología especial.

Finalmente y no menos importante le agradezco a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por el compromiso permanente respecto a la formación de profesionales íntegros, así como por brindarme innumerables oportunidades para desarrollo tanto como persona como profesional; Así, gracias a todos los fueron partícipes de mi proceso de formación, de esfuerzo, sacrificio y dedicación llegó el día en que miraría hacia atrás y reconocería lo importante que fue su presencia en mi vida y carrera profesional, gracias porque con su granito de arena hoy es posible la culminación de mi paso por la universidad.

1. Resumen.	8
Glosario	9
2. Introducción.	12
3. Antecedentes.	14
4. Objetivos.	21
5. Diseño metodológico.	22
6. Marco referencial	23
6.1.1 Beneficios de la tecnología CRISPR-Cas.	24
6.1.2 Tecnología CRISPR-Cas en el siglo de la edición génica.	24
6.2 Adenovirus serotipo 5/52s.	25
6.2.1 Ligandos asociados a la partícula viral.	25
6.2.2 Patogenicidad y su implementación como modelo de terapia viral oncolítica.	26
6.2.3 Beneficios y ventajas de la terapia viral oncolítica.	28
6.2.4 Secuencias Knockout objetivo.	29
6.2.5 Alternativas para reducir la inmunogenicidad contra el modelo viral.	30
6.2.6 Ventajas del modelo Ad5/52s como terapia viral oncolítica sobre las demás alternativas terapéuticas existentes.	31
6.2.7 Otros modelos de terapia viral oncolítica.	31
6.3 Leucemia mieloide crónica	32
6.3.1 Generalidades y mutaciones genéticas implicadas.	33
6.3.2 Ruta diagnóstica.	35
6.3.3 Tratamientos convencionales disponibles.	35
6.3.3.1 Inhibidores de tirosina kinasa (ITK).	36
6.3.3.2 Terapia con interferón.	37
6.3.3.3 Radioterapia.	39
6.3.3.4 Trasplante de médula ósea.	40
6.3.4 Seguimiento al tratamiento en pacientes con LMC.	42
6.3.5 Marcadores conocidos de las células madre de la LMC.	42
6.3.5.1 Objetivos terapéuticos.	43
6.3.5.2 Papel de la proteína de choque térmico Hsp27, ADAR1 y GATA-1 en la supervivencia y proliferación celular.	44
6.3.5.3 Características de las secuencias Knockin para escindir sobre Hsp27, GATA-1 y ADAR1.	45
6.3.5.4 Transferencia de información mediada por exosomas.	47
6.3.5.4.1 Ventajas del uso de exosomas.	48
7. Análisis de la información encontrada.	49
7.1 Compilación y contraste de las alternativas terapéuticas disponibles y el modelo viral descrito.	49
7.2 Knockout génico del vector viral: construcción de la herramienta CRISPR-Cas	50
7.3 Knockin del vector viral: construcción teórica de plásmidos recombinantes.	51
7.4 Modelado del genoma viral resultante de la edición génica por CRISPR-Cas9.	52
7.5 Importancia relativa de las revistas compiladas: clasificación por cuartiles.	53
7.6 Importancia mundial de las	

malignidades hematológicas en el desarrollo investigativo. 53 7.7 Avances científicos orientados a las malignidades hematológicas a lo largo de los años. 55

8. Conclusiones 55 9. Discusión. 60

7

## Índice de ilustraciones

**Pág**

Ilustración 1. Distribución de la mortalidad por cáncer en Colombia. 98 Ilustración 2. Evolución de la mortalidad por cáncer estandarizada por edades. 98 Ilustración 3. Gen diana knockeado, GFP bajo el promotor del gen nativo. 99 Ilustración 4. Proteínas de unión al RNA involucradas en la leumogénesis. 100 Ilustración 5. ligandos asociados a la partícula Adenoviral. 100 Ilustración 6. Expresión del receptor de Cocksakievirus y Adenovirus (CAR) en líneas celulares de leucemia. 101 Ilustración 7. Esquema del genoma del Adenovirus del serotipo 5 de tipo salvaje. 101 Ilustración 8. Frecuencia de hipotiroidismo reportado con diferentes ITK. 102 Ilustración 9. Curvas de concentraciones plasmáticas de IFN $\alpha$  clásico. 102 Ilustración 10. Construcción de la endonucleasa SpCas9 para el knockout del gen E1B. 103 Ilustración 11. Construcción de la endonucleasa VQRSpCas9 para el knockout del gen E3. 103 Ilustración 12. Construcción de la endonucleasa xCas9-3.7 para el knockout del gen E4. 104 Ilustración 13. Construcción teórica del plásmido para el knockin del gen LY303511. 105 Ilustración 14. Construcción teórica del plásmido para el knockin del gen p300. 105 Ilustración 15. Modelado

del genoma viral resultante de la edición génica por CRISPR-Cas9. 106 Ilustración 16. Distribución porcentual de la literatura investigada: clasificación por cuartiles.106 Ilustración 17. Distribución porcentual de la literatura consultada: clasificación por revistas. 107 Ilustración 18. Distribución geográfica de la literatura consultada: cartograma. 107 Ilustración 19. Distribución geográfica de la literatura consultada: gráfico de barras. 108 Ilustración 20. Distribución porcentual de la literatura investigada de acuerdo a delimitación geográfica. 108 Ilustración 21. Análisis absoluto y porcentual de la literatura investigada: clasificación cronológica. 109

8

## **Índice de tablas**

**Pág**

Tabla 1. Mecanismos de resistencia a los ITK independientes de BCR/ABL. 110 Tabla 2. Mutaciones más comunes de Bcr-Abl y su sensibilidad relativa a los ITK (in vitro). 111 Tabla 3. Alteraciones citogenéticas clonales y su valor pronóstico. 111 Tabla 4. Criterio de respuesta citogenética al tratamiento y su interpretación. 112 Tabla 5. Criterio de respuesta molecular al tratamiento y su interpretación. 112 Tabla 6. Pequeños inhibidores moleculares de las proteínas de unión al RNA. 113 Tabla 7. Comparación de características citomorfológicas de los procesos de muerte celular: apoptosis y necrosis. 113 Tabla 8. Modificaciones de proteínas de la cápside viral. 114 Tabla 9. Actividades terapéuticas comprobadas de los interferones. 115 Tabla 10. Principales indicaciones de trasplante de progenitores hematopoyéticos y tipo de trasplante más indicado en cada situación. 116 Tabla 11. Listado parcial del polimorfismo existente. 117 Tabla 12. Ventajas del modelo descrito (Ad5/52s) frente a la terapia farmacológica y otros modelos de terapia viral oncolítica para la resolución de la LMC. 120 Tabla 13. Ventajas del modelo descrito (Ad5/52s) frente a las alternativas terapéuticas clásicas para la resolución de la LMC. 121 Tabla 14. Evaluación de los vectores virales dirigidos a la resolución de



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

***CRISPR-Cas Y SU APLICACIÓN SOBRE UN MODELO DE ADENOVIRUS COMO  
ALTERNATIVA TERAPÉUTICA PARA LA RESOLUCIÓN DE LA LMC***

**1. Resumen.**

La tecnología CRISPR-Cas fué descubierta por primera vez en *S. pyogenes* y corresponde a un sistema de defensa que poseen las bacterias contra los fagos y plásmidos; recientes investigaciones apuntan diferentes miras y alcances que posee esta herramienta en materia de edición génica. Sumado a esto, en revisiones actuales se ha demostrado que la terapia viral oncolítica juega cada vez más un rol importante en la resolución tanto de tumores sólidos como de malignidades hematológicas como lo es la leucemia mieloide crónica (LMC). Es por ello, que esta revisión busca definir como alternativa terapéutica a los casos de frecuente recaída, la implementación de un modelo de *Adenovirus* genéticamente modificado por la tecnología

CRISPR-Cas como posible alternativa terapéutica para la resolución de la LMC dentro del marco del análisis documental.

**Palabras claves:** CRISPR-Cas, terapia viral oncolítica, leucemia mieloide crónica, *Adenovirus*.

### **Abstract.**

CRISPR-Cas technology was discovered for the first time in *S. pyogenes* and is a defense system that bacteria have against phages and plasmids; Recent research points to different perspectives and scope of this tool in terms of gene editing. In addition to this, current reviews have shown

10  
that oncolytic viral therapy plays an increasingly important role in the resolution of both solid tumors and hematological malignancies such as chronic myeloid leukemia (CML). For this reason, this review seeks to define as a therapeutic alternative to cases of relapse frequency, the implementation of a genetically modified Adenovirus model by CRISPR-Cas technology as a possible therapeutic alternative for the resolution of CML within the framework of the documentary analysis.

**Key words:** CRISPR-Cas, oncolytic viral therapy, chronic myeloid leukemia, *Adenovirus*.

### **Glosario**

ADAR1: Adenosina deaminasa, enzima involucrada en la edición del RNAs en el humano, codificada en el gen ADAR y actualmente implicada con la leucomogénesis desregulada en la LMC.

ADN: Ácido desoxirribonucleico, molécula que contiene la totalidad de la información genética de un individuo y que se expresa fenotípicamente.

Ad5/52s: Adenovirus serotipo 5, modificado quimericamente para expresar el fiber corto del Adenovirus 52s.

ARNcr/ARNsg: En conjunto corresponden al material génico que carga la endonucleasa de la herramienta CRISPR-Cas que es complementario a la porción genética sobre la cual se desea generar la delección en cualquier célula diana.

BCR-ABL: Oncogen responsable del desarrollo de la LMC en pacientes filadelfia positivos.

CAR: Receptor de Coxsackievirus y Adenovirus.

11

CD: Cluster de diferenciación celular, corresponde al perfil molecular que permite la diferenciación de los linajes celulares presentes en el cuerpo humano y animal.

CRISPR-Cas: Herramienta de edición génica extraída por primera vez de *S. pyogenes* capaz de generar acción nucleasa a partir de la complementariedad de bases mediante un RNA guía y un PAM.

FMEV: Vector retroviral implementado como terapia viral oncolítica para la resolución de eventos neoplásicos diferentes a la leucemia.

FSP: Frotis de sangre periférica, examen de rutina implementado en el área de hematología para el diagnóstico de síndromes y enfermedades que le competen al área de disciplina.

GATA-1: Proteína y factor de transcripción que en condiciones normales se involucra con la regulación de la proliferación celular y en condiciones patológicas con el desarrollo oncológico.

GTOVT: Terapia viral oncolítica dirigida a genes.

HDR: Reparación por homología libre de errores presente en la edición génica por la tecnología CRISPR-Cas.

HLA: Antígenos leucocitarios humanos.

Hsp27: Proteína de choque térmico 27.

INF (ALFA): Interferón alfa, actualmente una de las vías terapéuticas en busca de la remisión de la LMC.

12

ITK: Inhibidores de tirosina kinasa, fármacos de primera línea administrados en pacientes con LMC.

LDH: Lactato deshidrogenasa, enzima distribuida en diferentes tejidos del cuerpo, incluida la sangre; marcador de hemólisis.

LLA: Leucemia linfocítica aguda, trastorno que suele cursar con blastos >25%, anemia, trombocitopenia y neutropenia con o sin leucocitosis. Linaje celular predominante de origen linfocítico.

LMA: Leucemia mieloide aguda, trastorno que suele cursar con blastos >25%, anemia, trombocitopenia y neutropenia con o sin leucocitosis. Linaje celular predominante de origen mieloide.

LMC: Leucemia mieloide crónica, trastorno que suele cursar con leucocitosis y trombocitosis marcada, blastos <10%, corresponde a un síndrome mieloproliferativo producto de la

yuxtaposición de del protooncogén ABL, procedente del cromosoma 9, a la región M-bcr del cromosoma 22.

MOI: Multiplicidad de infección, cociente que relaciona la carga de un agente, generalmente viral para incidir sobre una línea celular objetivo.

MPEV: Virus de Manhattan, cuyo material genético está compuesto de ARN y ha sido implementado como terapia viral oncolítica en busca de la resolución de eventos neoplásicos diferentes a la LMC.

PAM: Motivo adyacente de protoespaciador, secuencia génica de 3 o más nucleótidos que conforman una señal para la endonucleasa ubique el punto de edición génica.

13

PD-1: Proteína de muerte celular programada 1.

Ph (+): cromosoma filadelfia positivo, producto de la translocación de la porción ABL del cromosoma 9 a la región m-bcr del cromosoma 22.

P53: Es una proteína supresora de tumores. En la especie humana, el gen p53 o TP53, también llamado el “guardián del genoma”, se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 y codifica un factor de transcripción nuclear de 43.7 KDa.

P300: Acetiltransferasa involucrada con la sobreexpresión de GATA-1.

RAS / RAF / MEK / ERK, GDP/GTP, Vías STAT, Vía PI3K/AKT/mTOR: Vías de señalización involucradas con la supervivencia y proliferación celular en pacientes con LMC.

RMGT: virus retroviral implementado como terapia viral oncolítica para la resolución de enfermedades diferentes a las leucemias.

SMD: Síndrome mielodisplásico.

TRAIL: Ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF.

VHS-1: Virus del herpes tipo 1.

## **2. Introducción.**

CRISPR traduce repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas y corresponde al sistema inmune que poseen las bacterias contra fagos y plásmidos. Recientes investigaciones apuntan una nueva mira de este sistema en pro de la edición génica para lo cual

14  
solo es necesaria la endonucleasa, un motivo adyacente de protoespaciador (PAM) en la célula diana y un ARN guía. Así, esta herramienta ha demostrado ser altamente específica y estable a nivel celular en la medida en la que la endonucleasa expone a lo largo de la literatura sólo ejercer su acción sobre aquellas porciones de PAM que además conserve complementariedad de bases con el ARN guía, criterios que al no frecuentar en un mismo genoma reduce las posibilidades de delección accidental<sup>41</sup>.

Por otro lado, la terapia viral oncolítica consiste en la implementación de modelos virales modificados genéticamente con el fin de usarlos como vectores de antioncogenes que permitan la resolución tanto de tumores sólidos como de malignidades hematológicas como lo es la leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B) y la leucemia mieloide crónica (LMC). Ésta alternativa para muchas patologías resulta ser benéfica en contraste con las terapias farmacológicas en la medida en que los vectores reportados por la literatura no han descrito interferencias

farmacológicas ni generación de sustancias intermedias tóxicas, en suma, han demostrado tropismo únicamente por el linaje celular anómalo, baja toxicidad contra células sanas, baja inmunogenicidad y buena tasa de transfección celular<sup>71</sup>. En particular, las investigaciones con vectores virales basados en *Adenovirus* han venido en aumento debido a que (adicional a lo mencionado anteriormente) han demostrado la mejor tasa de transfección<sup>71</sup>, una buena y rápida concentración de partículas virales y alta flexibilidad en materia de edición génica permitiendo una inserción de material genético de hasta 38Kb, aspecto que permite entre otras cosas modificar el tropismo de la partícula viral. Es por ello que este modelo viral es el escogido y descrito en este trabajo de grado como alternativa terapéutica para la posible resolución de la LMC, siendo esta el trastorno mieloproliferativo más común representando entre un 15-20% de todos los casos de leucemia<sup>11</sup>.

Así, para el diagnóstico se cuentan con variadas técnicas que van desde un análisis de FSP apoyado con citometría de flujo, realización de cariotipo humano a partir de las células mieloides, hasta hibridación de fluorescencia in situ (FISH) y derivados<sup>47</sup>. En cuanto a esta última, Tansatit M afirma que FISH “no requiere cultivo celular y se puede aplicar directamente sobre tejidos frescos”<sup>51</sup>.

15

Los hallazgos hematológicos más destacables de la LMC en el frotis de sangre periférica corresponden a la alteración en la neutropoyesis, eosinonofilopoyesis, basofilopoyesis, monocitopoyesis y la megacariopoyesis en razón a la prevalente desviación a la izquierda y a la proliferación desregulada de cada una de esas líneas. Según la investigación realizada por García, este trastorno puede o no presentar cromosoma filadelfia positivo, siendo los pacientes cromosoma filadelfia negativo quienes peor pronóstico desarrollan<sup>21</sup>. Sin embargo, en este trabajo de grado se documenta la bibliografía que aborde la enfermedad con su presentación clásica: LMC cromosoma filadelfia positivo, por lo que la terapia alternativa descrita en este documento tiene como objetivos terapéuticos proteínas y/o secuencias genéticas propias de esta condición.

En materia de objetivos terapéuticos, ante el hallazgo del papel de proliferación celular que tiene

la tirosina quinasa (proteína producto del oncogén de fusión BCR-ABL) se desarrollaron lo que hoy se conocen como inhibidores de tirosina quinasa de primera y segunda línea. Sin embargo, recientes investigaciones como la liderada por Lee M han demostrado que estos inhibidores tienen un efecto citotóxico significativo en linfocitos T CD8 debido al alza de PD-1 (muerte celular programada) seguida de la administración de algunos TKI<sup>82</sup>. Además, a menudo se presentan casos de recaída en aumento; esto fue materia de estudio en la investigación realizada por Lompardía en la que menciona que parte significativa del número de pacientes con recaída era debido a que una parte del linaje celular anómalo estaría secuestrado en fase G0 por lo que el uso de 4-metilumbeliferona e imatinib en conjunto no tendrían efecto sobre las células en dicha fase<sup>45</sup>.

Teniendo en cuenta que la fase G0 implica un estadio celular maduro, metabólicamente activo, pero no proliferativo es primordial que las próximas terapias alternativas estén dirigidas al reconocimiento de marcadores celulares que permitan diferenciar clones neoplásicos, de células madre productoras de LMC y a su vez, éstas de células sanas. Por lo que a lo largo del desarrollo de este trabajo de grado se abordan los marcadores celulares disponibles en la bibliografía desde 2010 hasta la actualidad, el modelo viral a implementar como terapia oncolítica y la edición

16

génica publicada por la literatura que demuestra la unión ligando-receptor, reconocimiento, ingreso y apoptosis de las células que están asociadas con las recaídas terapéuticas y mortalidad, así como también de los clones neoplásicos.

### **3. Antecedentes.**

Un primer estudio, esta vez liderado por Peltola M y colaboradores titulado “Adenovirus-mediated gene transfer results in decreased lysosomal storage in brain and total correction in liver of aspartylglucosaminuria (AGU) mouse” y publicado en mayo de 1998 mediante la caracterización molecular y estructural de AGA (una enzima que en condiciones normales se encuentra presente en el hígado) se estableció un total de 13 embriones de ratón inicialmente sanos para realizar la mutación asociada a AGU en humanos caracterizada por una

deficiente producción de AGA. Una vez obtenidos los modelos murinos para la enfermedad, el modelo viral (Ad-AGA) fue sometido a ensayos in vitro y murinos con 293 fibroblastos y 13 embriones de ratón respectivamente.

De estos ensayos se demostró que el modelo basado en *Adenovirus* transfectó positivamente tanto en el ensayo in vitro como murino, sin embargo, en este último caso el vector consiguió una corrección parcial de la aspartilglucosaminuria, una enfermedad de almacenamiento lisosomal autosómica recesiva de alta incidencia en la población mundial. No obstante, este estudio demuestra que, bajo la modificación del tropismo viral y demás estrategias moleculares, este es un candidato apto como terapia viral oncolítica al demostrar además de su exitosa transfección, una integridad intacta aún tras administrar el vector por vía intravenosa, parámetro indispensable para su aplicación en este trabajo de grado.

Un segundo estudio, liderado por Marini F y colaboradores titulado “Adenovirus as a gene therapy vector for hematopoietic cells” y publicado en octubre de 1999 mediante la revisión bibliográfica de 73 publicaciones de los últimos años logran recopilar las diferentes perspectivas con respecto a la implementación de los modelos Adenovirales para la resolución de malignidades hematológicas en la medida en que algunos autores afirman su incapacidad de

17

transfectar linaje hematopoyético debido a la dependencia de CAR mientras que otros a partir de estrategias como incubación prolongada, MOI alto, aplicación de citoquinas y más recientemente la modificación genética del modelo, afirman una transfección satisfactoria en cualquiera de las líneas celulares a estudiar.

Este estudio concluyó que, los datos sugieren que si bien en modelo viral basado en *Adenovirus* dependiente de CAR logra (deficientemente) la transfección en células madre hematopoyéticas esto puede ser debido a una internalización inespecífica de la partícula viral, evento que puede ser evitado a partir de la modificación genética del vector. No obstante, esta internalización al no ser mediada por CAR, estos vectores son inviables para la resolución completa de malignidades hematopoyéticas.

El próximo estudio de importancia para el desarrollo de este trabajo de grado fue el de Qian W y colaboradores titulado “Enhanced antitumor activity by a selective conditionally replicating adenovirus combining with MDA-7/interleukin-24 for B-lymphoblastic leukemia via induction of apoptosis” y publicado en noviembre del 2007 en el que, mediante la obtención de aspirados de médula ósea de pacientes con infiltrado neoplásico mayor al 85% y la implementación de líneas celulares leucémicas sometieron a un modelo Adenoviral asociado a IL-4 y dependiente de CAR a transducción génica.

En esta investigación demuestran por primera vez que el receptor CAR se expresa tanto en la línea celular K562 (utilizada para ensayos in vitro de la LMC) como en células aisladas de pacientes con la enfermedad. No obstante, la expresión de dicho receptor por citometría de flujo fue mayor en el primero de ellos, mientras que en el ensayo in vivo la expresión fue menor del 33%. Además, se concluye que los adenovirus oncolíticos representan un nuevo enfoque prometedor para tratar algunos tipos de leucemia debido a su expresión de CAR, y que MDA-7 / IL-24 tiene una actividad antileucemia mejorada por inducción de apoptosis a través de múltiples vías de señalización.

18  
La próxima investigación es la liderada por Xu C y colaboradores titulada “BCR-ABL/GATA1/miR-138 mini circuitry contributes to the leukemogenesis of chronic myeloid leukemia.” y publicada en diciembre del 2012 en la que mediante la obtención de células mononucleares a partir de aspirados de médula ósea de pacientes diagnosticados con LMC y el cultivo in vitro con líneas celulares K562, Ku812, HL-60, Kasumi-1, THP1, Jurkat, Molt-4 y NB4 en RPMI-1640 logró transfectarlas con miR-138 y así, realizar ensayos de proliferación celular.

En esta investigación se demostró por primera vez que la expresión celular de BCR/ABL regula negativamente a GATA-1 y miR-138 ambas involucradas con efectos antiproliferativos. Además,

tras transfectar tanto en ensayos in vitro como en los in vivo con el miR-138 se logró potenciar la expresión de GATA-1 proteína asociada con la senescencia evidenciada en la investigación.

Un año después, Velásquez J y colaboradores publican su revisión bibliográfica titulada “Diagnóstico citogenético y seguimiento molecular en la leucemia mieloide crónica” en la que mediante la revisión bibliográfica de 29 publicaciones recientes determinan el origen, las vías de señalización, el diagnóstico y el tratamiento de la LMC.

En esta revisión bibliográfica se declara que la leucemia mieloide crónica (LMC) es un trastorno mieloproliferativo producto de la translocación recíproca entre la porción ABL del cromosoma 9 y el segmento M-bcr del cromosoma 22. Además, se concluye por el polimorfismo de la asociación de ambas regiones, que la porción ABL aporta el principio transformante mientras que el segmento BCR al que va unido determina el fenotipo de la enfermedad.

Para el siguiente año (2013), Mellier G y colaboradores en su investigación titulada “Small molecule sensitization to TRAIL is mediated via nuclear localization, phosphorylation and inhibition of chaperone activity of Hsp27” publicada en octubre, mediante la transfección de la línea celular de cáncer de cuello uterino humano HeLa con un plásmido el cual contenía altas

19

concentraciones de Hsp27 lograron evaluar el efecto del clorhidrato (LY303511) post-incubación a partir de ensayos de viabilidad celular y crecimiento clonogénico.

La investigación probó por primera vez que la administración de LY303511 (un clorhidrato) reduce la concentración intracelular Hsp27 a la vez que potencia la apoptosis extracelular mediada por TRAIL debido a que la evidencia apunta a que esté, al fosforilar mantenidamente la serina 82 induce una disociación de los oligómeros de la proteína y posterior internalización y degradación a nivel nuclear llevando a la célula a una predisposición de apoptosis extracelular. Lo anterior apuntando a que la proteína de choque térmico Hsp27 no solo es un objetivo

terapéutico tentador sino que también se demostró que es la molécula apropiada para incidir negativamente sobre este, lo que finalmente condujo a la obtención de la secuencia del clorhidrato en la plataforma Genbank<sup>30</sup>.

Dos años después (2015), García M en su tesis doctoral titulada “GENERACIÓN DE UN ADENOVIRUS QUIMÉRICO AD5/52s PSEUDOTIPADO CON LA PROTEÍNA FIBER CORTA DEL Ad52 PARA SU CARACTERIZACIÓN IN VITRO E IN VIVO COMO VECTOR DE TERAPIA GÉNICA ” y publicada en noviembre, mediante el análisis y captación de 473 publicaciones de dominio público y la aplicación de microscopía de fluorescencia, PCR, plásmidos y ensayos in vitro logra exponer con amplitud los receptores de los diferentes tipos de Adenovirus así como también abarca temas como la biodistribución de la partícula viral, efecto del sistema inmune frente a vectores virales, evasión de la respuesta inmune, y lo referente a la construcción del modelo quimérico Ad5/52s así como sus ventajas por sobre otros modelos usados en la terapia viral oncolítica. Así, durante el desarrollo de esta tesis doctoral se demostró que el fiber corto del Ad52 reconoce como receptor al ácido siálico, molécula que al estar presente en los leucocitos facilita la internacionalización de la partícula viral. Así como también, entre otras cosas se concluye que, si bien esta partícula quimérica no posee tanta capacidad replicativa como el Ad5, esta no representa un riesgo para la salud en la medida en que no aumenta las concentraciones fisiológicas de trombina y no se ve secuestrado por el hígado, deficiencias observadas en la cepa salvaje (Ad5).

20

En lo que respecta con las conclusiones llegadas en esta tesis doctoral fueron pilares fundamentales para la orientación del vector postulado aquí en la medida en que no solo es menos patógeno que la cepa salvaje, sino que también demuestra por microscopía de fluorescencia un tropismo absoluto por las células de la LMC, característica fundamental para llevar a cabo la terapia viral oncolítica<sup>38</sup>.

Para julio del año siguiente (2016), la empresa de biotecnología en España Abyntek en su artículo titulado “INTRODUCCIÓN A LA TECNOLOGÍA CRISPR-CAS 9.” define las

aplicaciones, así como también los pasos a seguir para implementar correctamente esta herramienta de edición génica. Este artículo concluye que, CRISPR-Cas permite generar Knockouts, Knocking, activar o inhibir genes diana de forma selectiva, purificar regiones específicas del DNA, así como visualizar el DNA celular por microscopía de fluorescencia con la inserción de reporteros fluorescentes.

Teniendo en cuenta que el modelo aquí descrito requiere de una edición génica, y que esta herramienta es actualmente la más sencilla de implementar, este artículo fue de gran aporte en la medida en que expone los pasos a seguir de forma simple y clara<sup>41</sup>.

Un año después (2017), Larripa J y colaboradores en su revisión bibliográfica “Leucemia mieloide crónica” a partir del compendio y articulación de 15 publicaciones actualizadas define los criterios de seguimiento tanto citogenético como molecular de los pacientes con LMC tratados, los mecanismos de resistencia a los ITK y la toxicidad farmacológica asociados a los mismos. De esta revisión bibliográfica se concluyó que, los mecanismos de resistencia asociados a los ITK son tanto dependientes como independientes de BCR-ABL, razón por la cual cada vez más se presenta mayor cantidad de casos con recaída y por lo que nuevos grupos de investigación buscan medidas alternativas a la administración de estos fármacos.

21

Un año después (2018), Guerrero R en su tesis doctoral “Caracterización del potencial oncolítico del aislamiento rotaviral Wt1-5 en cultivos primarios de leucemia linfoblástica aguda de precursores B”, mediante el seguimiento de la infección de las células de la leucemia linfoblástica aguda de precursores B y las células Reh por parte del modelo viral rotavirus Wt1-5 y análisis por citometría de flujo, logró determinar que para este vector, se preserva una citotoxicidad dirigida únicamente a la población neoplásica. Es así, como además de los ensayos experimentales, la recopilación de bibliografía le permitió concluir que cualquier vector oncolítico ejerce su toxicidad únicamente en las células neoplásicas debido a que son las que le

brindan el andamio físico que posibilita tu replicación. Debido a las conclusiones obtenidas en esta tesis doctoral es que se posibilita aún más la implementación de la terapia viral oncolítica basada en *Adenovirus* (5/52s) en la medida en que no solo posee el tropismo para la internación viral, sino que también, los advenimientos de estas nuevas terapias dirigidas a genes garantizan y demuestran una citotoxicidad baja a las células sanas por lo que es altamente específica y segura en ensayos *in vivo*<sup>60</sup>. Este autor, es el único de todos los investigadores consultados que se encuentra dentro del marco de la resolución de malignidades hematológicas mediante terapia viral oncolítica nacido en Colombia y formado puntualmente en la Universidad Nacional de Colombia, quien además en otras revisiones ha implementado diferentes vectores como el virus del herpes genéticamente modificado para el tratamiento del glioblastoma y el Adenovirus serotipo 5 para la resolución del mieloma múltiple.

Un año después (2019), Pickar A y colaboradores en su artículo “The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications.”, mediante la recopilación de casi 250 publicaciones de los últimos 10 años consiguieron establecer los avances en la edición génica, los mecanismos utilizados para la edición de genes, los diferentes tipos de reparación celular llevados a cabo tras la delección génica. Así como también describen los diferentes enfoques asignados a esta herramienta de edición génica no sin antes proporcionar generosamente 17 variantes de la endonucleasa cas9 y sus respectivos motivos adyacentes de protoespaciador (PAM). En esta revisión bibliográfica se concluyó que una de las pocas desventajas que posee esta tecnología radica en la construcción del RNA guía, así como la selección de la endonucleasa

22  
por cada secuencia que se desee editar ello debido a que se fundamenta en la complementariedad de bases. De este modo, esta revisión bibliográfica fue de gran valor para la construcción de la herramienta de edición génica en la medida en que proporcionó como ninguna otra publicación, los PAM reconocidos por cada variante de la endonucleasa 9, facilitando la búsqueda de estas cortas secuencias de material genético en el genoma del modelo viral aquí detallado, lo que hizo posible entre otras cosas la delección de los genes causantes de la virulencia asociada a *Adenovirus*. Además, se relaciona fuertemente con el trabajo de grado debido a que comparten el

enfoque de la edición génica como herramienta constructora de nuevos tratamientos<sup>69</sup>.

Para noviembre de este mismo año (2019), Abudoureyimu M y colaboradores en su revisión bibliográfica “Oncolytic Adenovirus—A Nova for Gene-Targeted Oncolytic Viral Therapy in HCC”, mediante la recopilación de más de 100 publicaciones de los últimos 10 años, consigue condensar 11 ensayos clínicos en los que usaron como vector viral al Adenovirus modificado genéticamente así como las fases experimentales que alcanzó cada vector; además de explicar a cabalidad los efectos que tendría sobre el modelo viral la delección de cada uno de los genes tempranos que lo componen (E1-4). En suma, ofrece un mapa genético del genoma viral y diferentes estrategias para la evasión de la respuesta inmune en caso de usar este vector. En esta revisión bibliográfica se demostró que la delección del gen E1B-55 KDa suprime la capacidad de transformación celular por parte del modelo viral, la del gen E2 genera un vector de baja tasa de replicación celular, mientras que la delección del gen E3 y E4 genera un vector viral con alta capacidad de evasión de la respuesta inmune. Además, de concluir que la terapia viral oncolítica ahora es un área completamente nueva en el tratamiento del cáncer que brinda la posibilidad de dirigirse a todos los tipos de neoplasias mediante el diseño de vectores virales.

Un año después, McCarty N y colaboradores en su revisión bibliográfica “Multiplexed CRISPR technologies for gene editing and transcriptional regulation.” mediante la compilación y análisis de 142 publicaciones prestigiosas, consiguió establecer estrategias implementadas en la actualidad con esta herramienta de edición génica como lo son la edición multiplexada, los circuitos genéticos y mapeo combinatorio además de exponer otros tipos de endonucleasa, su

afinidad, PAM y tipo de corte al realizar knockouts (romo o escalonado). En esta revisión se concluyó concretamente que la tecnología CRISPR-Cas es la herramienta de edición génica más sencilla de implementar además de poseer alta estabilidad a nivel intracelular y desencadenar cambios genéticos permanentemente. Así, la conclusión de esta revisión bibliográfica fue pilar para la escogencia de la herramienta de edición génica a implementar sobre el modelo de Ad5/52s<sup>77</sup>.

Finalmente en abril del año siguiente (2020) Bajaj J y colaboradores en su investigación “An in vivo genome-wide CRISPR screen identifies the RNA-binding protein Staufen2 as a key regulator of myeloid leukemia” mediante el método estadístico y el uso de CRISPR para el knockout de proteínas de unión al RNA involucradas con la leumogénesis tanto en modelos murinos como en las líneas celulares HEK293T y K562, microscopía de fluorescencia y la recopilación de 65 investigaciones desde 1996 hasta la actualidad, consiguieron no solo interpretar los efectos de knockeo de las proteínas asociadas a la leumogenesis tanto en modelos animales como en los ensayos in vitro sino que también establecer el papel sobre todo de la proteína Staufen2 y ADAR1 en la fisiopatología de la LMC. En esta investigación se demostró por primera vez el papel de ADAR1 como una enzima involucrada con la proliferación celular de las células madre hematopoyéticas, la reducción de la supervivencia en los pacientes con LMC y el salto de la fase crónica a la fase blástica <sup>78</sup>.

#### **4. Objetivos.**

##### **Objetivo general**

- Exponer la importancia de la implementación de la tecnología CRISPR-Cas sobre un modelo de *Adenovirus* teniendo como ejemplo referente la alternativa terapéutica para la posible resolución de la LMC todo en el marco de una revisión bibliográfica.

24

##### **Objetivos específicos**

- Explicar la importancia de la implementación de la tecnología CRISPR-Cas - Dar a conocer la importancia de su aplicación en un modelo de *Adenovirus* teniendo como ejemplo referente la alternativa terapéutica para la resolución de la LMC.
- Establecer las ventajas y desventajas que conlleva la edición genética por tecnología

CRISPR-Cas.

## **5. Diseño metodológico.**

El presente trabajo es una investigación de tipo documental, descriptiva, puesto que fue necesario un proceso sistemático de indagación, organización y análisis de información de artículos científicos, documentos web, entre otros estudios y descriptiva debido a que se centra en la definición de las características principales de un fenómeno.

Se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión para el material documental:

1. El material de apoyo debía estar publicado por lo menos en un 85% en revistas de alto impacto (Q1 y Q2) como Nature, Science, Oncotarget, entre otros.
2. Las publicaciones debían ser a partir del año 2010 y posteriores (a menos que el artículo y/o investigación fuera fundamental para el desarrollo del trabajo de grado).
3. Bajo el esquema de pertinencia, la literatura consultada debía contener temas relacionados con tecnología CRISPR-Cas, generalidades, genoma y edición del Adenovirus y marcadores celulares de las células madre de la LMC.

Como criterios de exclusión no se tuvieron en cuenta para la redacción de este trabajo de grado todos aquellos artículos que:

1. Que fueron publicados en el año 2010 y anteriores (a menos que el artículo y/o investigación hubiera sido fundamental para el desarrollo del trabajo de grado).
2. Artículos que no abordaran temas inherentes a los objetivos del trabajo de grado tecnología CRISPR-Cas, generalidades, genoma y edición del Adenovirus y marcadores celulares de las células madre de la LMC.

## 6. Marco referencial

A continuación, se compartirá la información encontrada con respecto a la tecnología CRISPR-Cas como herramienta de edición génica y el respectivo modelo viral implementado como vector de anti-oncogenes, teniendo como ejemplo referente la alternativa terapéutica para la posible resolución de la LMC.

### 6.1 Tecnología CRISPR-Cas.

La sigla CRISPR-cas traduce repeticiones palindrómicas cortas agrupadas, regularmente interespaciadas y corresponden a secuencias repetidas dentro de un material genético, separadas por secuencias únicas denominadas espaciadores, gran parte de estas últimas (espaciadores) coinciden con material genético viral proveniente de fagos por lo que diferentes estudios asocian al sistema CRISPR como un sistema inmunológico adaptativo que tienen las bacterias y que además puede ser transferido de una generación bacteriana a otra<sup>32</sup>.

Sin embargo, recientes investigaciones y publicaciones han demostrado que este sistema no solo está involucrado con la inmunidad bacteriana sino que, también juega un rol importante en la evasión de la respuesta inmune contra la bacteria lo que se traduce en el aumento de la patogenicidad y la muerte celular programada en caso de que el propio sistema CRISPR detecte infección vírica que pueda amenazar la comunidad bacteriana en sí, por lo que en resumen corresponde a un sistema que juega en pro de la supervivencia celular.

La bacteria de la cual se aisló la primera endonucleasa proveniente de CRISPR corresponde a *Streptococcus pyogenes* y fue a partir de este aislamiento que se determinó por primera vez el mecanismo por el cual CRISPR permite una memoria inmunológica contra fagos y plásmidos y

26

su relación con la aparición de secuencias virales en los espaciadores, de lo que se teorizó que el

sistema CRISPR estaría ejecutando edición génica de tipo Knock out sobre el material genético de los fagos para así introducir esa “huella génica viral” en el propio material genético bacteriano, de lo que resultaría la formación de RNAs guías, cuya función es vigilar que no haya una reinfección con el mismo agente viral, dado ese caso, los RNAs guías al reconocer por complementariedad de bases la secuencia del fago que infectó a esa misma bacteria en el pasado o a un antecesor, procedería a la degradación de dicho material genético viral. Es así, que la revelación de este hallazgo condujo a diferentes grupos de investigación a buscar el modo de aislar diferentes clases de CRISPR para así aprovechar su capacidad de edición génica que, además de ser altamente eficaz, es la herramienta de edición génica más sencilla hasta la actualidad<sup>39</sup>.

De los tipos de CRISPR conocidos (tipo I y tipo II) el más estudiado es el tipo II, éste utiliza la endonucleasa Cas9, secuencias PAMPS y dos ARN: tracrRNA y crRNA con el fin de guiar a la endonucleasa al objetivo<sup>32</sup>.

Diferente a lo que se pensaba en un inicio de lo que era esta herramienta; una cantidad significativa de publicaciones exhibe que esta no sólo permite hacer knockouts sino también knockin<sup>41</sup>(véase la ilustración 3 ubicada en el anexo 5.3) edición genética que según Ross Cloney “ha permitido una fácil selección y manipulación de secuencias genómicas precisas en bacterias, plantas, hongos y mamíferos, incluidos los humanos” lo que da como resultado una manipulación controlada de la transcripción y por ende también en la síntesis de proteínas<sup>72</sup>.

### ***6.1.1 Beneficios de la tecnología CRISPR-Cas.***

Según la investigación realizada por McCarty N una ventaja importante de esta nueva herramienta es la adaptación para la escisión de varios locus mediante la tecnología CRISPR-Cas multiplexada. Además, que, a comparación de otras técnicas de edición genética, CRISPR representa la forma más sencilla, y estable intracelularmente por la cual se da la edición genómica.

Así mismo Yoshimi K en su revisión sustenta que “esta nueva herramienta de edición genética permite crear modelos animales de enfermedades humanas y aporta en el campo de la terapia

génica”<sup>33</sup>. Este último aspecto es explicado en la revisión realizada por Doudna J cuando afirma que CRISPR permite inactivar y corregir genes involucrados con enfermedades genéticas aspecto particularmente relevante para el desarrollo de este trabajo de grado<sup>75</sup>(en los resultados se evidencia la construcción del modelo viral mediante la edición genética por CRISPR-Cas).

### ***6.1.2 Tecnología CRISPR-Cas en el siglo de la edición génica.***

Este tipo de tecnología a diferencia de otras, tiene la ventaja de ser fácilmente moldeable lo que permite que tenga mayor eficiencia en la activación de la transcripción de genes, así lo describe Chen Y. cuando menciona que esto puede llevarse a cabo si “...se alarga el crARN de la endonucleasa.”, modificación posible mediante la inserción de más pares de bases provenientes de un genoma bacteriano cualquiera<sup>82</sup>. En la actualidad se han llegado a conocer más aplicaciones de las que ya se mencionaron en el apartado anterior, entre ellas, según Oliver es bien conocido el bloqueo de genes, la edición de base única, la vigilancia génica, la activación e inhibición de genes y la regulación de los mismos mediante la inserción de cofactores a la endonucleasa<sup>69</sup>. Además, otros estudios demuestran que esta herramienta puede ser utilizada como grabador celular, para la generación de circuitos genéticos, biosensores, perturbaciones genéticas combinatorias, ingeniería del genoma a gran escala y recableado de vías metabólicas lo que ha “facilitado poderosas aplicaciones de ingeniería biológica, mejorando enormemente el alcance y la eficiencia de la edición genética y la regulación transcripcional”<sup>77</sup>.

## **6.2 Adenovirus serotipo 5/52s.**

El *Adenovirus* serotipo 5/52s corresponde a un virus quimérico que tiene como base la estructura del *Adenovirus* serotipo 5 junto con la proteína fiber del *Adenovirus* 52 siendo así una partícula viral cuyo tropismo es doble al contener los ligandos que reportados por la literatura son afines con los receptores celulares presentes en los pacientes con LMC, lo que permite entre otras cosas el ingreso de la partícula viral a las células de interés. Además, entre otros ensayos si bien se ha demostrado que esta partícula quimérica viral no es tan estable en administración intravenosa como el Ad5 una de las ventajas es que este no se ve secuestrado por el hígado, posee afinidad específica por los leucocitos e inducirá la apoptosis solo en los clones neoplásicos.

### ***6.2.1 Ligandos asociados a la partícula viral.***

Los ligandos asociados a la partícula viral del *Adenovirus* quimérico Ad5/52s se encuentran tanto al interior como en el exterior de la partícula<sup>1</sup> y son estos los que finalmente determinan el tropismo viral (véase la ilustración 5 ubicada en el anexo 5.5). Así fue como, García M en su tesis afirma que un grupo actualmente descubrió que el fiber corto del *Adenovirus* 5/52s quimérico utiliza como receptor para su ingreso el ácido siálico<sup>38</sup>, azúcar que, según el estudio liderado por Vergara C está presente en los glicolípidos y glicoproteínas leucocitarias<sup>3</sup>. Así, la ventaja que tiene la generación de *Adenovirus* pseudotipados radica en que combinan la seguridad y fácil producción del Ad5 con el tropismo asociado al fiber que se introduzca, por esto éste modelo quimérico resulta el más sencillo y eficaz para la infección activa en las células neoplásicas de la LMC, pues si bien el ciclo celular es moderadamente retrasado con respecto al Ad5 tiene afinidad por los leucocitos, requisito indispensable para la generación de la terapia génica. García enfatiza en que “Se han utilizado vectores quiméricos con *fibers* de *Adenovirus* de las especies B, D o F para aumentar la transducción en células que tienen una baja expresión de CAR o se encuentra inaccesible como las células hematopoyéticas”. Afirmación además apoyada por Qian W en su investigación cuando menciona que cerca de un tercio de la población neoplásica de la LMC si expresa el receptor in vitro, expresión reducida notablemente en los ensayos in vivo mediante citometría de flujo, esto favorece en la medida en que las células neoplásicas que no expresan CAR logran ser infectadas por el fiber corto del Ad5/52s lo que hace a este modelo viral mas específico para la resolución de esta enfermedad. En la ilustración 5 se evidencian los ligandos asociados al *Adenovirus*. En la ilustración 6 (ubicada en el anexo 5.6) se evidencia la expresión de receptor CAR en diferentes líneas celulares mediante ensayos in vitro.

***6.2.2 Patogenicidad y su implementación como modelo de terapia viral oncolítica.*** Antes de ahondar con respecto a los marcadores celulares, es premisa conocer en primera medida el modelo viral estudiado aquí (*Adenovirus* serotipo 5/52s) en razón a su material genético, su

grupo Baltimore, genoma, patogenicidad, efectividad en materia de transmisión de genes, su uso en la terapia viral oncolítica dirigida a genes y porción genómica editable. Así, el *Adenovirus* es un virus de ADN bicatenario sin envoltura que pertenece a la familia *Adenoviridae*, grupo Baltimore I. En cuanto a su patogenicidad Bernaola G describe que, se conocen 3 principales vías de transmisión, la vía fecal-oral quien es responsable de la sintomatología gastrointestinal, inhalación responsable de la sintomatología respiratoria y una última; por contacto directo. En lo que respecta con interacción con la célula se conocen igualmente 3:

la infección lítica, latente y la transformación oncogénica en la que, no se generan viriones, en cambio se transcriben genes que inhiben los antioncogenes. De esto último es responsable la proteína EA1 que, al interactuar con el material genético de la célula promueve la inhibición de la apoptosis, acontecimiento que no genera beneficio alguno en el marco terapéutico por lo que, en este trabajo de grado será knockeado mediante la tecnología CRISPR-cas el segmento responsable de la oncogenicidad (EA1)<sup>13</sup>.

En cuanto a su efectividad en transmisión de genes, a pesar de que se trata de un virus oncolítico y que en teoría por su naturaleza no le sería posible integrar su material genético en la célula que infecta, esto no quiere decir que no transfiera su material genético, lo que significa que aunque aislado del de la célula hospedera, los genes virales pueden codificar para proteínas y/o enzimas con posibilidad de actuar sobre el material genético de la célula huésped, así lo sostiene Peltola M. en su investigación cuando menciona que se había realizado “una transferencia de genes mediada por *Adenovirus* al modelo de ratón de AGU... de lo que resultó una corrección total en el hígado de la aspartilglucosaminuria (AGU)”<sup>5</sup> esto quiere decir que, no sólo pueden matar directamente las células cancerosas mediante oncolisis sino que también aumentan el número de copias de genes terapéuticos mediante la replicación del virus, lo que resulta en la expresión del transgen ya dentro de los tumores y una potente actividad contra cualquier evento neoplásico incluido la leucemia.

Ésta misma teoría es apoyada por Abudoureyimu M cuando afirma que “ La terapia viral oncolítica dirigida a genes (GTOVT) es un tipo de terapia dirigida contra el cáncer, que crea vectores virales armados con genes anticancerígenos” y que “El *Adenovirus* es un agente

prometedor para GTOVT debido a sus muchas ventajas<sup>71</sup>. Además, bajo estas líneas expresan que la ventaja que tiene esta alternativa terapéutica radica en que, al dirigirse a genes y/o marcadores específicos el virus oncolítico únicamente reconocerá y destruirá las células asociadas al cáncer<sup>71</sup>.

Las razones por las que se ha venido usando cada vez más este modelo viral para la terapia viral oncolítica dirigida a genes es porque éste permite una alta concentración, pudiendo llegar hasta

12

10 partículas/ml además, reconoce tanto células en división como estáticas (como es el caso de las células en la fase G0) lo que de ser usado en la práctica, podría reducir el porcentaje de recaídas terapéuticas que tiene este trastorno mieloproliferativo, finalmente en la actualidad son bien conocidas las porciones genéticas del virus que permiten edición<sup>71</sup>. La única desventaja que tienen este tipo de modelos virales es que en la medida en que sean de origen humano, al momento de ingresar, estos generan una potenciada respuesta inmune lo que limita su acción sobre las células de interés.

Para una mejor aproximación a las características de este virus y su amplia capacidad de edición es premisa conocer los genes que lo conforman. El genoma del *Adenovirus* está integrado entonces por 4 genes tempranos (E1, E2, E3, E4) cuya función es permitir la replicación y cinco tardíos (L1, L2, L3, L4, L5) quienes conforman la cápside viral. En cuanto a su aplicación como terapia viral oncolítica, bajo el criterio de insertar genes correctivos a medida que se replica la partícula viral hasta generar apoptosis, se han delecionado en gran medida los genes E1 y E3 (el primero de ellos relacionado con la oncogenicidad de la partícula y el segundo con la evasión de respuesta inmune) permitiendo un espacio de edición de 7.5 kb a lo que se le suma su amplia adaptabilidad a la inserción lo que le posibilita soportar hasta 30 a 38 Kb de material genético nuevo. Así, la deleción de ambos genes reduce parcialmente la replicación de la partícula viral, sin embargo, la permanencia de la polimerasa en el gen E2 permitirá que, en un momento dado (si bien algo prolongado) la célula entre en lisis dado el caso, que las células neoplásicas generen resistencia adaptativa a la apoptosis mediada por TRAIL, así lo demuestra la ilustración 7 ubicada en el anexo 5.7. Sin embargo, este modelo viral mediante su edición génica busca priorizar un evento apoptótico sobre el lítico (o necrótico) debido a las muchas desventajas que tiene este último, explicado en la tabla 7 ubicada en el anexo 6.7. Continuando con el impacto de

la edición de genes en este modelo viral, Cheshenko N en su investigación describe la importancia de la delección de los genes E2 y E4 para reducir la inmunogenicidad generada por el cuerpo humano<sup>12</sup>.

Así, teniendo en cuenta los diversos alcances de la tecnología CRISPR-Cas y las ventajas del modelo viral descrito y estudiado en diferentes investigaciones, este trabajo de grado define una posible resolución a la LMC dentro del marco del análisis documental a partir de la conjunción de ambas, alcance demostrado en los numerales a continuación.

### ***6.2.3 Beneficios y ventajas de la terapia viral oncolítica.***

Cabe mencionar que de las principales ventajas que tiene este modelo viral investigado por encima de otros también usados para la terapia viral oncolítica, es que el *Adenovirus* ha demostrado tener mayor eficiencia de transducción así lo explica Flores F. cuando menciona que *Adenovirus* es “la herramienta más poderosa para la introducción de genes en diversos modelos terapéuticos de enfermedades humanas”<sup>17</sup>.

Así mismo, es bien conocido que éste es capaz de infectar y expresar genes funcionales exógenos sin células diana lo que permite que tras edición genética exprese ligandos específicos para los receptores de las células de la LMC, tiene alta eficiencia en la apoptosis de células tumorales, posee baja toxicidad en células sanas, permite la edición génica de hasta 30-38 kb (lo que permitiría la modificación del tropismo viral), responde satisfactoriamente a la concentración de partículas, permite la transmisión de genes a células de manera específica, incide sobre la maquinaria celular

y puede ser editado genéticamente para reducir su inmunogenicidad (lo que se traduce en una buena tolerancia). De la misma forma, se ha demostrado que tiene capacidad infectiva en células quiescentes (fase G0) o en cualquier fase del ciclo celular, posee nula o baja frecuencia de recombinación en el genoma del huésped y expresa los genes de interés hasta por 60 días, esto último, podría ser considerado como un estimado de la frecuencia con la cual se debería recurrir a esta terapia (de ser efectiva) hasta que la población celular anómala desaparezca.

#### *6.2.4 Secuencias Knockout objetivo.*

La secuencia genética que se pudiera knockear dependerá netamente del interés a futuro de una investigación in situ; de los genes que conforman la partícula viral se podría Knockear el gen E1B-19 KDa y E1B-55 KDa si el objetivo es generar un vector que no induzca dentro de su proceso terapéutico transformación celular (neoplasia), los genes E2 y E4 si el objetivo es reducir la replicación viral en la célula que infecte y/o reducir la inmunogenicidad de la partícula viral, el gen E1A o la delección del gen E1B y un segmento de la región E3 si lo que se quiere es evitar la lisis de la partícula viral<sup>71</sup>. Por otro lado, en la investigación realizada por Zhang se define que si la finalidad es que el vector genere menos toxicidad en células sanas que los anteriores propuestos y sometidos a ensayos en otras publicaciones es necesario suprimir 24 pares de bases (922-946) de la región CR2 del gen E1A<sup>19</sup>.

Acorde a las referencias estudiadas se logró encontrar el modelo de Ad5 tolerable por la inmunidad celular y humoral y que además permite la resolución de la LMC total sin generar otros eventos neoplásicos la delección más eficiente y apoyada por el gremio científico es la del gen E3/E4 y E1B-19 KDa/E1B-55 KDa respectivamente (estas secuencias genéticas se encuentran en el anexo 3). Si bien la reducción de la toxicidad en células sanas es un requisito necesario para su implementación en la terapia clínica, ya se ha demostrado mediante diferentes ensayos (como el propuesto por Guerrero R) que, aunque el vector ingrese en la célula madre o hija sana, éste no tendría su efecto oncolítico por ausencia del andamio propicio para su replicación.

*6.2.5 Alternativas para reducir la inmunogenicidad contra el modelo viral.* Actualmente es bien conocido que, ante la formulación de terapias biológicas la principal preocupación radica en que el cuerpo responde contra ellas con la inmunidad celular y humoral lo que reduce significativamente la eficacia terapéutica, ello debido a que frecuentemente antes de que el modelo biológico cumpla su función este es reconocido y neutralizado por la respuesta inmune,

así lo explica Sethu S<sup>23</sup>.

33

En la revisión bibliográfica realizada por Abudoureyimu éste, afirma que, para la reducción de la inmunogenicidad de la partícula viral y facilitar la infección por *Adenovirus* oncolíticos en necesario la alteración de las proteínas de la cápside viral mediante:

“...(1) una incorporación de un péptido de direccionamiento en el dominio del botón de fibra (el bucle HI y / o el extremo C); (2)cambio de serotipo de botón de fibra, o pseudotipado, mediante la construcción de fibras quiméricas que consisten en el dominio de botón derivado de un serotipo alternativo (p. Ej., Quimeras Ad5 / 3 o Ad5 / 35 [63 #]), que se une a un receptor (es) distintos de CAR (por ejemplo, desmogleína 2 / DSG2 y / o CD46); (3) "mosaicismo de complejo de fibras", un enfoque que combina el quimerismo de serotipo con la incorporación de ligandos peptídicos (por ejemplo, Ad5 / 3-RGD); (4) "mosaicismo de fibra dual" al expresar dos fibras separadas con distintas capacidades de unión al receptor en la misma partícula viral (p. Ej., Ad5-5 / 3 o Ad5-5 /  $\sigma$ 1); (5) xenotipado de fibras reemplazando los dominios de perilla y eje de la proteína de fibra Ad5 de tipo salvaje con el dominio de itrimerización de fibrina de un bacteriófago T4 o proteína de unión  $\sigma$ 1 de un reovirus.”<sup>71</sup>.

Así mismo, el cambio del serotipo de Adenovirus, las partículas híbridas entre antígenos virales y no virales y la modificación de la fibra knob promueven la reducción de la inmunogenicidad contra la partícula viral<sup>71</sup>(véase la tabla 8 ubicada en el anexo 6.8). Es por ello que el modelo Adenoviral estudiado aquí (Ad5/52s) además de generar el tropismo viral hacia las células hematopoyéticas (puntualmente leucocitos) reduce la inmunogenicidad contra la partícula viral haciendo que sea más tolerable por el sistema inmune.

#### ***6.2.6 Ventajas del modelo Ad5/52s como terapia viral oncolítica sobre las demás alternativas terapéuticas existentes.***

Una vez conocidas las muchas ventajas que tiene el modelo viral (Ad5/52s) con respecto a otros

modelos de terapia viral oncolítica, es premisa valorar su competitividad en el mercado entorno a valor aproximado de la terapia (véase las tablas 12 y 13 de resultados, ubicadas en los anexos

34

6.12 y 6.13 respectivamente) y el beneficio que representa en contraste con las demás alternativas terapéuticas existentes.

Para ello se contó con diversas publicaciones desde el área de química farmacéutica y farmacovigilancia que demuestran desde varias perspectivas las ventajas, desventajas y seguridad de cada tratamiento disponible actualmente, así como las estadísticas involucradas con la benéfica evolución de los pacientes con cáncer, así como los casos de reacciones adversas.

#### *6.2.7 Otros modelos de terapia viral oncolítica.*

Son múltiples los virus implementados a modo de terapia viral oncolítica en busca de la resolución de diferentes tumores, sin embargo, son pocos lo que se han dirigido como vía terapéutica de malignidades hematológicas, es por esto que en este apartado se abordan los últimos avances en la viroterapia enfocada a este sentido contrastando el uso, la capacidad de transducción, citotoxicidad, evasión de la respuesta inmune, tolerancia y efecto sobre las células diana.

Así, virus como los reovirus, FMEV, MPEV, VHS-1 y algunos modelos basados en *Adenovirus* como el rAd5pz-zTRAIL, Adz.f (PK7) y Adzd55-IL24 no pueden ser implementados para el desarrollo de este trabajo de grado, en la medida en que ninguno posee tropismo hacia las células de la LMC<sup>35-89-16-79-7-20</sup>, Además, los vectores basado en reovirus y rAd5pz-zTRAIL se han asociado frecuentemente con alta citotoxicidad en células sanas por lo que generan un potencial riesgo para la salud<sup>35-79</sup>; en lo que respecta con los modelos FMEV, MPEV y Adz.fPK7 si bien han demostrado transducción eficaz en células senescentes, haría falta una modificación del tropismo viral para su implementación en trabajo de grado aquí desarrollado<sup>89-7</sup>. Para el caso de los vectores basados en VHS-1 a pesar de demostrar una alta tasa de transducción, bajo los ensayos clínicos se evidenció que los niveles de expresión génica eran transitorios y que, además,

a pesar de potenciar la respuesta inmune contra el tumor, las líneas transfectadas al expresar proteínas propias del vector entraban en un mecanismo de evasión inmunológica<sup>16</sup>. En cuanto al último (Adzd55-IL 24), a diferencia de los reovirus, no representa una citotoxicidad

35  
significativa sin embargo, la literatura no ofrece datos de este para la resolución completa de la LMC, ello debido a que este modelo viral reconoce al receptor CAR, molécula que se encuentra en bajas concentraciones en las células tumorales de la LMC razón por la cual se ha venido implementando como alternativa para los pacientes con LLA de células B quienes sí poseen alta expresión de este receptor<sup>20</sup>.

Por otro lado, vectores virales como Ad5/F11p-SFV-GFP, Ad/CD34, Ad5/11-BECN y Retrovirus RMGT si bien han demostrado tropismo hacia las líneas celulares neoplásicas de la LMC, es bien sabido que los dos primeros poseen una baja transducción de genes, para el caso de Ad5/F11p-SFV-GFP aún se desconoce la causa, mientras que para Ad/CD34 se asoció con la necesidad del reconocimiento del receptor CAR.

En lo que respecta con el vector Ad5/11-BECN no solo ha demostrado una baja tasa de internalización celular (39-54%), sino que también se asoció con una pobre apoptosis celular a pesar de haber demostrado alto rendimiento en los ensayos de senescencia<sup>29</sup>. Por último, el modelo basado en retrovirus es además otro vector infructuoso para llevar a cabo este trabajo de grado en la medida en que se determinó que este no transdujo células quiescentes por lo que necesita de factores de crecimiento para mejorar la internalización y por ende apoptosis celular, condición que más que beneficiar a los pacientes con este trastorno, los perjudica con un mayor efecto proliferativo del linaje neoplásico<sup>4</sup>.

### **6.3 Leucemia mieloide crónica**

La leucemia mieloide crónica es una patología mieloproliferativa producto de la translocación recíproca entre la porción ABL del cromosoma 9 y el segmento M-bcr del cromosoma 22, lo que se conoce como el cromosoma filadelfia<sup>28</sup>. Producto de este cromosoma anómalo se genera el

protooncogen de fusión BCR-ABL el cual desregula la actividad kinasa intracelular permitiendo que la enfermedad se desarrolle en 3 fases: la fase crónica, acelerada y crisis blástica cuya última es quien tiene el peor pronóstico<sup>25</sup>. Ésta, según la OMS, en conjunto con los demás tipos de

36

leucemia representa el 6.2% de la totalidad de defunciones asociadas al cáncer en Colombia (Véase la ilustración 1 y 2 en el anexo 5.1 y 5.2 respectivamente).

### ***6.3.1 Generalidades y mutaciones genéticas implicadas.***

En lo que respecta con esta patología los pacientes que la presentan y no se tratan o no responden al tratamiento por resistencia a los inhibidores de la tirosina kinasa han reportado una sobrevida promedio de 4 años<sup>48</sup>, ello debido a la alteración de diferentes vías de señalización celular como lo son las proteínas involucradas en la supervivencia y proliferación celular (RAS / RAF / MEK / ERK, GDP/GTP, Vías STAT, Vía PI3K/AKT/mTOR, ADAR1), y a la inhibición y activación de vías y genes que controlan la apoptosis (genes que codifican para el Hsp27, genes que codifican para la proteína P53, e inhibición de la proteína GATA-1) que, por un lado inhiben la apoptosis y por otro potencian la proliferación desregulada de la línea granulocítica y megacariocítica.

Entre las vías y las proteínas involucradas con la inhibición de la apoptosis y la proliferación celular, las proteínas (particularmente Hsp27, ADAR1 y GATA-1) son interesantes en la medida en que estas presentan mayor estabilidad a lo largo de los casos de LMC, ello podría ser explicado en razón a que las mutaciones más comunes están involucradas en la potenciación o inhibición de vías más no sobre algunos productos finales génicos.

En lo que respecta con los criterios de definición de cada una de las etapas de la LMC, la OMS dicta lo siguiente:

#### **FASE CRÓNICA**

La clínica se caracteriza por demostrarse en su mayoría como pacientes asintomáticos, sin

embargo, los que desarrollan sintomatología presentan regularmente fatiga, anorexia, pérdida de peso, plenitud gástrica, esplenomegalia y hepatomegalia.

37

**SP:** leucocitosis neutrofilica con precursores mieloides. Blastos 1-3%, eosinofilia, basofilia. plaquetas normales o aumentadas. Fosfatasa alcalina ausente o disminuida, hiperuricemia, LDH aumentada.

**MO:** Hipercelular, hiperplasia mieloide, reducción del tejido adiposo. Blastos + promielocitos <10% de la celularidad total. Leve aumento de fibras de reticulina.

Fase Crónica Temprana: se considera fase crónica temprana (FCT) cuando han transcurrido menos de doce meses desde el diagnóstico y no ha recibido tratamiento con la excepción de Hidroxiurea

### **FASE ACELERADA**

Cuya clínica se caracteriza por fiebre, dolores óseos, sudores nocturnos y esplenomegalia progresiva resistente al tratamiento. Es frecuente el aumento del score de FAL en estos pacientes.

#### **Uno o más de los criterios hematológicos/citogenéticos**

Persistencia o aumento de leucocitos ( $>10 \times 10^9/L$ ) que no responda al tratamiento

Persistencia o aumento de la esplenomegalia que no responda al tratamiento

Persistencia de trombocitosis ( $>1000 \times 10^9/L$ ) que no responda a la terapia

Persistencia de trombocitopenia ( $<100 \times 10^9/L$ ) no relacionada al tratamiento

Anemia

Basófilos  $>20\%$  en sangre periférica

Blastos del 10%-19% en SP y/o MO

Anomalías cromosómicas clonales adicionales en células Ph+ al diagnóstico que incluyen anomalías de la ruta mayor (doble Ph, +8, i17q, +19); cariotipo complejo, o anomalías de

3q26.2

Cualquier anomalía cromosómica clonal en células Ph<sup>+</sup> que ocurran durante el tratamiento

**Uno o más de los criterios de respuesta a ITK**

Resistencia hematológica al primer ITK (o falla en alcanzar una RHC al primer ITK)

Cualquier indicador de resistencia hematológica

38

Presencia de dos o más mutaciones en BCR/ABL1 durante el tratamiento con ITK

**CRISIS BLÁSTICA**

Blastos >20% en SP y/o células nucleadas de MO

Proliferación blástica extramedular

Clusters de blastos en MO<sup>48</sup>.

Estos blastos pueden ser de diferentes fenotipos

**6.3.2 Ruta diagnóstica.**

Tras el análisis de la clínica, se realizan estudios hematológicos los cuales comienzan con un frotis de sangre periférica en la que se evidencian estadios inmaduros con predominancia de mielocitos, metamielocitos, promielocitos y bandas. Ante la gran cantidad de leucocitos que reporta el hemograma y la evidencia de linaje mieloide en el FSP se procede a la detección del cromosoma filadelfia que según el congreso argentino de hematología se presenta en el 95% de los casos de LMC, acto seguido se ordena un mielograma y biopsia de médula ósea para su confirmación<sup>57</sup>.

Las limitaciones diagnósticas giran en torno a que su presentación es en gran medida asintomática por lo que el diagnóstico suele ser accidental<sup>65</sup>.

A continuación, se unifican todos los tratamientos disponibles para la resolución de la LMC diferentes a la terapia viral oncolítica, hasta el día de hoy.

### *6.3.3 Tratamientos convencionales disponibles.*

Según el estudio de Polakova K, las primeras terapias que lograron el secuestro celular en fase G0 y la reducción del recuento de células madre productoras de LMC corresponden a los inhibidores de tirosina kinasa (ITK)<sup>81</sup>. Sin embargo, la resistencia de muchas células a la acción del primero de ellos; el imatinib, y su ineficacia en pacientes en fase acelerada y crisis blástica han obligado a los diferentes grupos de investigación a dar con nuevas alternativas en respuesta a

39

la recaída terapéutica. Así, la resistencia propiamente dicha contra los ITK puede deberse al desarrollo bien de mecanismos independientes de BCR-ABL (como se evidencia en la tabla 1 ubicada en el anexo 6.1) o al desarrollo de mecanismos dependientes del mismo como lo son las mutaciones genéticas puntuales (véase la tabla 2 ubicada en el anexo 6.2).

Así, fue como surgió el Stelletin B, una sustancia aislada de la estrella de mar<sup>50</sup>, y los cócteles terapéuticos en busca de mejoras permanentes en los recuentos celulares. Sin embargo, muchos de estos medicamentos actúan directamente sobre las más conocidas vías de señalización descritas en la LMC, lo que resulta en una limitación en la medida en que se han descrito por biología molecular las mutaciones mencionadas. Sin contar, que además de las mutaciones se han reportado en la literatura casos con evolución clonal de cromosoma filadelfia como lo puede ser la trisomía del cromosoma 8, doble cromosoma filadelfia, ausencia de cromosoma filadelfia y la trisomía del cromosoma 19 cualquiera de ellos siendo criterio suficiente para la definición de un caso de LMC en fase acelerada según la OMS (véase la tabla 3 en el anexo 6.3)<sup>54</sup>.

#### *6.3.3.1 Inhibidores de tirosina kinasa (ITK).*

En resumen, a lo mencionado anteriormente, los inhibidores de tirosina kinasa (ITK), corresponden a fármacos que, si bien son ampliamente administrados en pacientes con LMC, se

ha demostrado no solo que la dosis se ve afectada por la farmacocinética de este fármaco junto con los demás, sino que, también las interacciones sobre todo con antibióticos de amplio espectro pueden potenciar o reducir su acción. Además, diversos ensayos estadísticos exponen a un número significativo de pacientes con recaídas igual o peor de perjudiciales al trastorno diagnosticado de novo tras ser tratados con fármacos de este tipo.

Cabe aclarar, que al día de hoy una de las principales fallas de esta vía terapéutica es que además de no ser administrado directamente en la médula ósea, es particularmente la terapia alternativa que presenta mayor resistencia tanto dependiente como independiente de BCR-ABL por lo que incluso enfermedades de base logran perjudicar el mecanismo de acción del mismo. Actualmente, se ha descubierto que la mutación KRAS en las células neoplásicas es un predictor

40

de una pobre respuesta frente a los ITK además de las demás mutaciones expuestas con anterioridad<sup>18</sup>.

Después de todas estas desventajas, una igual de significativa, es que al tratarse de un fármaco altamente genotóxico y con la capacidad de pasar barrera transplacentaria está contraindicado en maternas diagnosticadas con dicha leucemia debido a hallazgos de malformación en recién nacidos además de impedir la lactancia materna durante su consumo.

En materia de efectos secundarios a su consumo algunos de los recientemente demostrados es el bloqueo de la potenciación a largo plazo del hipocampo, acción involucrada con la formación de la memoria a largo plazo, ello debido a que este necesita del ingreso de calcio y la activación de proteínas quinasas, éstas finalmente tras entrar en contacto con los ITK inhiben la sinapsis involucrada con la memoria humana<sup>2</sup>. En suma, Laila Y en su investigación aporta además que este fármaco afecta la función tiroidea pudiendo llevar tanto al hipotiroidismo como a la tirotoxicosis en un lapso tan corto como 4 semanas posteriores a su consumo. En la ilustración 8 ubicada en el anexo 5.8 se evidencia la frecuencia de hipotiroidismo reportado con diferentes ITK.

Así mismo, Steegman en su manual para el control de la LMC revela que este tipo de fármacos además de lo ya mencionado, suelen producir náuseas, diarrea, anemia, trombocitopenia,

neutropenia, derrames pleurales, hipertensión arterial pulmonar, daño pancreático, neumonitis, efectos adversos hepatobiliares y gastrointestinales e incluso alteración en el metabolismo de los lípidos<sup>74</sup>. No obstante, técnicas de seguimiento al tratamiento como la respuesta citogenética y molecular, aunque reflejan una resolución completa de la enfermedad, algunos casos reinciden y progresan a fase acelerada o blástica.

### *6.3.3.2 Terapia con interferón.*

Los interferones son glicoproteínas producidas por las células del sistema inmune innato y adaptativo, así como células no inmunes (como lo son los fibroblastos) en respuesta a estímulos externos como lo son patógenos y eventos tumorales. Éstos cumplen la función de vigilar y

41

conservar la integridad fisiológica al intervenir en la resolución de infecciones, así como tener un efecto antiproliferativo y proapoptótico en eventos tumorales. En lo que respecta con este último, diferentes ensayos demuestran que la propiedad proapoptótica de esta alternativa radica en que incrementa la secreción de IL 1 beta 8 lo que hace que aumente la presentación antigénica<sup>10</sup>.

A nivel terapéutico se conocen hasta la actualidad, 3 tipos de interferones según Sarmiento D: interferón  $\alpha$  o tipo leucocitario, interferón  $\beta$  o tipo fibroblástico e interferón  $\gamma$  o tipo inmune, producido por linfocitos T y células NK. De los cuales el único usado para el tratamiento de la LMC es el interferón  $\alpha$ . En la tabla 9 (ubicada en el anexo 6.9) se evidencian las actividades terapéuticas comprobadas de los interferones.

Así, de todas las actividades terapéuticas expuestas en la tabla 9, la propiedad aprovechada para el tratamiento de la LMC es su capacidad antiproliferativa ante eventos tumorales, y su inducción a la apoptosis mediada por las caspasas lo que, dentro de otras ventajas, permite que haya una muerte celular sin liberación de componentes intracelulares al torrente sanguíneo previniendo entre otras cosas, cuadros hemorrágicos a razón de la liberación de los gránulos de heparina, así como dilatación de los vasos sanguíneos, y aumento de la permeabilidad de los mismos debido a la liberación de los gránulos de histamina presente en los basófilos, misma ventaja presentada con el modelo descrito en este trabajo de grado.

Sin embargo, Sarmiento D es muy claro cuando afirma que la administración del INF  $\alpha$  conlleva a una serie de problemas como lo es por ejemplo que la rapidez de absorción (6-72 horas), lo que contribuye a una eliminación muy temprana y por ende requiera de múltiples aplicaciones, condición que no está presente en el modelo estudiado aquí, en el sentido que éste último puede permanecer en circulación hasta 60 días sin generar inmunogenicidad.

En suma, otra desventaja significativa de la administración de estas glicoproteínas es que conllevan a una concentración fluctuante en la circulación lo que dificulta el monitoreo de la eficacia terapéutica, por lo que, una reducción de la concentración del tratamiento estaría asociado con un nuevo ciclo proliferativo de los clones leucémicos y por ende la explicación de las recaídas terapéuticas asociadas a esta alternativa<sup>59</sup>.

42

Asimismo, Flores J sostiene que “se ha encontrado que dosis altas de IFN no son toleradas por un buen número de pacientes, sin embargo, son requeridas para obtener remisiones citogenéticas”<sup>10</sup>. Por otra parte, Ad5/52s al tratarse de un modelo inocuo para la salud, con buena estabilidad fisiológica y óptima distribución no representa esta última dificultad puesto que su concentración fisiológica se espera permanezca constante, lo que no solo garantiza que las células neoplásicas se vean efectivamente infectadas por el modelo viral, sino que además se encuentren en un estado senescente y proapoptótico tan pronto 3-6 horas administrado el tratamiento por vía intravenosa con una duración aproximada de 60 días. En la ilustración 9 ubicada en el anexo 5.9 se evidencia las curvas de concentraciones plasmáticas del INF  $\alpha$ .

A la vez que esta alternativa no solo pone en tela de juicio su eficacia por su gran fluctuación, sino que también contrae una dependencia casi total a su administración por su absorción y eliminación temprana, se ha demostrado experimentalmente que, como cualquier otro fármaco, éste genera interacciones con otros medicamentos pudiendo resultar en cuadros graves de neumonía, infiltrados pulmonares y neumonitis.

Así, el consumo de fármacos narcóticos, hipnóticos o sedantes deberán suspenderse ante la necesidad de optar por esta alternativa para la resolución de la LMC.

En suma, Sarmiento D afirma que "...La administración de Interferones en combinación con otros agentes quimioterapéuticos... puede conducir a incrementar el riesgo de toxicidad...". En conclusión, a pesar que este tratamiento representa una alternativa para los pacientes con resistencia a los ITK, éste no solo no garantiza la resolución completa de la enfermedad tras la frecuente administración, sino que también representa un riesgo para la salud, en la medida en que este, se ha demostrado, genera reacciones adversas e interacciones farmacológicas que pueden resultar potencialmente mortales.

### *6.3.3.3 Radioterapia.*

La radioterapia es un tratamiento que consiste en la exposición de cualquier tejido a altas dosis de radiación con el fin de reducir las células neoplásicas. Sin embargo, al tratarse de un

43

leucemogeno<sup>46</sup> investigaciones en revistas de alto prestigio revelan que esta alternativa además de no garantizar la resolución completa del tumor también se ha asociado con una elevación en el riesgo de desarrollar cánceres de novo con predominancia de leucemias mieloides agudas (LMA), síndrome mielodisplásico (SMD) e incluso la leucemia mieloide crónica (LMC)<sup>63</sup>, lo que sugiere que este tipo de terapia induce mutaciones en pro de la transformación celular, suceso que según Smirnova O "posee el periodo de latencia más corto de todos los cánceres con un desarrollo tan próximo como dos años posterior a la exposición de estas radiaciones"<sup>46</sup>. Además, este mismo fenómeno se ha presentado en pacientes con malignidad hematológica inicial, la cual tras ser tratada desencadena otra completamente diferente a largo plazo, así lo explica Wu B en su estudio "Sequential development of chronic myelogenous leukemia and primary myelofibrosis in a patient with history of large B-cell lymphoma treated with radiotherapy and chemotherapy: two myeloid neoplasms with distinct genotypic profiles suggestive of biclonality in a single individual" tal es el caso de un paciente varón de 48 años diagnosticado con linfoma de células B que tras ser tratado con radioterapia desarrolló inicialmente un cuadro característico de LMC y posteriormente mielofibrosis primaria de lo que, se considera una aberración genética menor debido a que según Wu B los efectos secundarios de esta terapia "Suelen manifestarse como

pérdidas totales o parciales del cromosoma 5 y / o el cromosoma 7, que con frecuencia se acompañan de anomalías adicionales como cambios cariotípicos complejos”<sup>40</sup>.

En lo que respecta con el posible origen de los eventos neoplásicos desarrollados a partir del uso de quimioterapias y radioterapias Waller C afirma que esto podría tener un origen en “predisposición genética, la susceptibilidad de un huésped inmunodeprimido o la influencia de los carcinógenos en la patogénesis de múltiples neoplasias”<sup>8</sup>. Así, en lo que respecta con el último de los factores asociados al desarrollo de la leucemogénesis Smirnova O y colaboradores mediante ensayos de modelados por programas en base a la predicción, determinaron que el desarrollo de la LMA y LMC dependen significativamente de las dosis de radiación más no del número de dosis a aplicar, estando las menores dosis asociadas más fuertemente con el desarrollo del curso crónico y las mayores radiaciones con el curso agudo de la enfermedad<sup>46</sup>.

44

#### *6.3.3.4 Trasplante de médula ósea.*

El trasplante de médula ósea consiste en administrar células madre hematopoyéticas sanas en diferentes fases de maduración posterior al tratamiento con quimioterapia y/o irradiación de los pacientes diagnosticados con LMC.

Si bien, se ha demostrado que este trasplante resulta en una modulación inmune antitumoral, también cabe recalcar que la probabilidad del éxito de esta terapia depende de múltiples factores asociados a la enfermedad y el individuo y que factores como el trasplante de médula ósea singénico aumenta el riesgo de recidiva leucémica<sup>15</sup>. Así, el primer determinante para la sobrevida de los pacientes es la fase de la enfermedad al tiempo del diagnóstico, siendo los mejores resultados cuando se realiza tempranamente<sup>10</sup>. De igual manera, la toxicidad del trasplante y la enfermedad del injerto contra el hospedero resultan ser factores determinantes de la sobrevida en pacientes de este tipo.

Además de corresponder a la alternativa terapéutica más costosa, ésta no garantiza una remisión completa de la patología, más bien, resulta en una alternativa viable para la prolongación de la vida en los pacientes con dicho trastorno.

En cuanto a la supervivencia de los pacientes, Flores J mediante la comparación de diferentes investigaciones experimentales demuestra que esta alternativa permite una prolongación en la esperanza de vida entre los 5 y 10 años y un porcentaje de éxito entre el 49% y el 72%<sup>10</sup>. Ello debido, a que frecuentemente a los pacientes se les administran corticosteroides, fármacos que no sólo generan una grave alteración de la inmunidad (lo que entre otras cosas dan paso a infecciones oportunistas) sino que también aumentan aún más la probabilidad de desarrollar la enfermedad del injerto contra el receptor dentro de lo que se evidencia afectación hepática e intestinal significativa lo que puede incluso desencadenar la muerte. En suma, diferentes hallazgos han demostrado que la población de pacientes tratados con estos inmunosupresores presenta una pancitopenia similar a los pacientes sin tratar, esto porque como bien se mencionó anteriormente, este tipo de trasplantes poseen una acción antitumoral por lo que inicialmente es usual que se presente una reducción de todas las líneas celulares<sup>73</sup>.

45

El papel del autotrasplante actualmente se está reevaluando en la medida en que puede ser implementado en los pacientes no candidatos a trasplante de médula ósea debido a la presentación de determinantes no favorables. Sin embargo, esta opción puede ser riesgosa en tanto que esta consiste en administrar al paciente sus propias células madre Ph negativas posterior a la quimioterapia y/o interferón. No obstante, frecuentemente se administran además células Ph positivas residuales del tratamiento por lo que es habitual que se presenten recaídas<sup>10</sup>. Es por esto que muchos autores, califican esta medida como incierta (en la tabla 10 ubicada en el anexo 6.10 se evidencian las indicaciones de trasplante de progenitores hematopoyéticos y tipo de trasplante más indicado en cada situación).

En conclusión, el trasplante de médula ósea, además de corresponder a la alternativa terapéutica que más costo produce por año de vida extendido es también la que genera más incertidumbre a la hora de predecir el curso hematológico y la probabilidad de éxito debido a los múltiples determinantes que la rodean. Además, los posibles efectos benéficos para la salud se ven opacados por el alto riesgo de conllevar a la toxicidad hematológica y el rechazo del injerto, así

como también el bajo porcentaje de pacientes con remisión hematológica completa. Después de todas estas limitantes, la probabilidad de que algún día aparezca un paciente compatible con el donante es muy baja debido a la falta de conciencia por parte de la población y el polimorfismo del HLA entre personas sin ningún parentesco, en la tabla 11 ubicada en el anexo 6.11 se evidencia el listado parcial del polimorfismo existente para el HLA<sup>42</sup>.

En este sentido es imprescindible que el HLA del donante y el receptor sean compatibles debido a que esta intervención quirúrgica da paso a la presentación del HLA del donante a las células del receptor, lo que en un escenario de incompatibilidad generaría una respuesta inmunológica por parte de los linfocitos T CD8+ y CD34+ del receptor y/o por parte de las células donadas, la cual es la causa mejor conocida del rechazo del injerto-huésped.

46

#### *6.3.4 Seguimiento al tratamiento en pacientes con LMC.*

Como todos los trastornos y enfermedades, tras la espera de un lapso de tiempo oportuno (para la LMC 3 meses) post-implementación terapéutica se deben realizar controles con el fin de dar seguimiento a la evolución del paciente y su respuesta frente al tratamiento. Para el caso de las leucemias en general, el seguimiento está dado por parámetros citogenéticos y moleculares que permiten determinar si el paciente presenta un estado de respuesta completa, parcial, menor, mínima o nula al tratamiento (véase la tabla 4 y 5 en los anexos 6.4 y 6.5 respectivamente).

Aunque cerca de la mitad de los pacientes tratados con ITK presenten remisión completa del trastorno mieloproliferativo, no sólo muchos reingresan a la unidad de cuidados intensivos con recaídas más agresivas que el trastorno inicial, sino que también tras la administración de hasta 800mg de ITK por dosis desarrollan cuadros incluso permanentes de toxicidad hematológica caracterizadas por neutropenia, anemia y trombocitopenia, además del bien conocido riesgo de daño hepático y renal asociado a la dependencia farmacológica. En suma, diferentes ensayos

clínicos sostienen la alta toxicidad que tienen estos fármacos al entrar en contacto con el desarrollo fetal debido a que frecuentemente estos están asociados con malformaciones en el recién nacido. Este tipo de terapia en particular resulta riesgosa para el desarrollo fetal y neonatal en el sentido en que se excreta en la leche materna lo que imposibilita la lactancia durante su administración<sup>54</sup>. Además de todas estas limitaciones y riesgos que representan para los pacientes consumir los ITK, como cualquier otro fármaco su funcionalidad depende de su interacción con otros medicamentos; así, lo explica Bengio R cuando entre otros fármacos menciona a la carbamazepina, la rifampicina y la dexametasona como unos de los tantos fármacos que reducen la concentración fisiológica de los ITK y por ende su funcionalidad, condición que bajo ensayos clínicos no se presenta mediante el uso de terapia viral oncolítica<sup>54</sup>.

### *6.3.5 Marcadores conocidos de las células madre de la LMC.*

Para generar el concepto terapéutico buscado en este trabajo de grado, es mandatorio contar con características que permitan diferenciar a las células madre de la LMC de las células madre sanas tanto a nivel humoral como en la identificación celular. Para esto se encontró la investigación

47

realizada por Ma L publicada en el año 2019 en la que se precisa que dependiendo de la maduración de la célula neoplásica los marcadores varían entre células progenitoras y células madre. Para fines prácticos, se tomaron en cuenta tanto los marcadores comunes entre las células madre de la LMC y las células madre sanas, como los marcadores que permiten la diferenciación entre ambas poblaciones celulares. Dentro del primero de los grupos Ma L y colaboradores precisan que los marcadores comunes entre ambas poblaciones se resumen en CD34<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> CD48<sup>-</sup> y CD45RA<sup>-67</sup>.

En materia de marcadores diferenciables Naka K caracterizó por secuenciación genómica de ARN los marcadores celulares expresados en las células madre de la LMC que se resumen en: CD150<sup>+</sup> CD48<sup>-</sup> CD135<sup>-</sup> KLS<sup>+37</sup>.

Sumado a lo anterior, otra investigación realizada por el mismo autor demuestra que los marcadores de la LMC varían en torno a si la célula inducida en el ratón es una célula de limitada autorenovación y por ende primitiva (CD150<sup>+</sup>, TSI) o si se trata de una célula madre neoplásica de autorenovación temprana (CD150<sup>-</sup>). Teniendo en cuenta que la célula madre de la LMC de

auto renovación temprana es un estadio de maduración superior al de la célula de limitada renovación y que el objetivo del artículo es la resolución de la LMC, únicamente se va a tener en cuenta los marcadores expresados en las células madre de autorenovación limitada (CD150<sup>+</sup>, TSI)<sup>84</sup>.

Estos aportes son relevantes en la medida en que cualquiera de los marcadores descritos podrían ser objetivos específicos de la partícula viral y por ende ser clave en la apoptosis dirigida únicamente a células madre de la LMC debido a que es bien conocido que para los virus oncolíticos, las células que proporcionan mejor andamio intracelular son las neoplásicas lo que facilita su replicación y apoptosis mientras que la internalización de la partícula viral en células sanas no conduce a la apoptosis debido a que suelen controlar y degradar al patógeno, así lo afirma Guerrero R en su tesis doctoral titulada “Caracterización del potencial oncolítico del aislamiento rotaviral Wt1-5 en cultivos primarios de leucemia linfoblástica aguda de precursores B”<sup>60</sup>.

#### *6.3.5.1 Objetivos terapéuticos.*

En el marco de la resolución de las leucemias conocidas hasta el día de hoy, los diferentes grupos de investigación acuñan el término objetivo terapéutico para referirse a las moléculas, proteínas, vías de señalización y/o genes sobre los que se desea incidir para generar, a grosso modo, efectos benéficos sobre el estado general y el curso natural de la enfermedad en los pacientes sometidos a la terapia en cuestión. Esto, resulta en un concepto totalmente diferente al que frecuentan utilizar algunas farmacéuticas en el sentido de llegar a los alcances y/o promesas generadas con cualquier producto.

En este sentido, para esta investigación documental, éste término hace alusión precisamente a las proteínas (Hsp27, ADAR1 y GATA-1) sobre las cuales según la literatura tras cambiar su expresión modifican el curso natural de la enfermedad mejorando el pronóstico; por otro lado, el término “secuencias Knockin y/o antioncogenes” hará alusión a las moléculas (LY303511, 8-Azaadenosina y p300 respectivamente) responsables de su cambio de expresión intracelular,

hallazgos evidenciados en estudios aquí revisados, detallados y citados en el subtítulo a continuación.

#### *6.3.5.2 Papel de la proteína de choque térmico Hsp27, ADAR1 y GATA-1 en la supervivencia y proliferación celular.*

En lo que respecta con la supervivencia celular una de las proteínas mayormente involucradas en la inhibición de la apoptosis es la proteína de choque térmico Hsp27, esto debido a que aumenta la resistencia celular a distintos tipos de estrés como el oxidativo<sup>24</sup>.

En suma, Heinrich J explica que “Hsp27 se sobreexpresa en muchos tipos de cáncer e influye en procesos celulares como la apoptosis, la reparación del ADN, la recombinación y la formación de metástasis”<sup>44</sup>.

Por otro lado, GATA1 es conocida como una de las proteínas que en condiciones normales está involucrada en el crecimiento celular debido a que trata de un factor de transcripción sin embargo, varios esquemas experimentales no sólo han demostrado su reducida concentración en células progenitoras y clones de la LMC sino que además demuestran la eficacia de tratamientos dirigidos a potenciar esta proteína en la medida en que, contrario a lo que se esperaría el aumento

49

de expresión de esta proteína estaría involucrada con la supresión del tumor. La razón por la cual su concentración es inesperadamente reducida es porque el oncogén de fusión BCR-ABL estaría suprimiendo o silenciando los genes que codifican para esta<sup>27</sup>. Este fenómeno estaría supeditado a otro evento explicado por Li H en su investigación cuando menciona que el aumento de GATA1 estaría relacionada con el arresto celular en fase G0 en pacientes con LMC<sup>36</sup>.

ADAR1, enzima desaminasa editora del RNA ha permitido evidenciar una actividad dependiente de BCR-ABL, actividad involucrada con la proliferación celular de las células madre hematopoyéticas, la reducción de la supervivencia en los pacientes con LMC y el desarrollo de la fase crónica a la fase blástica. Así lo reveló una pantalla de CRISPR-Cas tras analizar el genoma completo de una célula de la LMC en la investigación realizada por Bajaj J, el resultado de esta técnica fue confirmado tras comparar el recuento celular y la supervivencia entre ratones con LMC y ratones con el mismo trastorno knockeados para la proteína, teniendo en cuenta que ADAR1 corresponde a una proteína de unión al ARN<sup>78</sup>.

En suma, en lo que respecta con la LMC se ha visto mayormente involucrada en las células madre o progenitoras sobre todo en estadio blástico pudiendo ser otro objetivo de interés terapéutico. Además, esta enzima (sobreexpresada en las células de la LMC) está implicada con la inhibición de la apoptosis, la autorenovación de las células madre, la inhibición de la diferenciación celular y la resistencia terapéutica por lo que, este es un biomarcador de la progresión del trastorno. Es por ello, que mediante ensayos de inhibición de la enzima mediante la exposición celular a 8-Azaadenosina, se evidenció apoptosis de las células hematopoyéticas en hígado, secuestro del ciclo celular (fase G0) e inducción de citocinas. Condiciones que resultan favorables para la generación de nuevas alternativas terapéuticas<sup>86</sup>.

Sin embargo, son muchos los RBPs (proteínas de unión al RNA) que intervienen en la leucemogénesis y que por tanto son potenciales objetivos terapéuticos. En razón a esto, la selección de ADAR1 estuvo determinada por su bien conocido y poderoso papel en el desarrollo de la LMC, su sobreexpresión demostrada en el estadio crónico y blástico de la enfermedad, así como el conocimiento y disponibilidad comercial del inhibidor. En la ilustración 4 ubicada en el anexo 5.4 se evidencian las proteínas de unión al RNA envueltas en la leucemogénesis.

50

#### ***6.3.5.3 Características de las secuencias Knockin para escindir sobre Hsp27, GATA-1 y ADAR1.***

Las características que se encontraron deben tener las secuencias Knockin para escindir sobre cada uno de los 3 blancos terapéuticos se resumen en que cada uno de ellos tiene secuencias genéticas y/o estructuras moleculares ya conocidas publicadas en bancos de genes como Genbank y/o otras plataformas de dominio público, que la sumatoria de los nucleótidos de estas no debe superar los 38 kb para permitir la inserción del modelo Adenoviral, y que el mecanismo de acción de los compuestos que inciden sobre los blancos deben ser altamente específicos y deben tener baja o nula toxicidad en las células sanas. Así, bajo recientes investigaciones se ha demostrado en modelos tumorales que para la inhibición de la proteína Hsp27 responsable de la resistencia a la apoptosis, es altamente eficaz el mecanismo de sensibilización del ligando inductor de apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) mediante la exposición celular a

LY303511 un clorhidrato análogo del inhibidor de fosfoinositido 3-quinasa LY294002. Esto fue materia de estudio en la investigación realizada por Mellier G y colaboradores quienes demostraron bajo ensayos electroforéticos que la inhibición de Hsp27 por LY303511 estaría mediada por una fosforilación mantenida en la serina 82 facilitando la disociación de los oligómeros de la proteína y posterior internalización pasiva al núcleo por medio de los poros<sup>30</sup>.

En suma, este clorhidrato tras inhibir la actividad chaperona de Hsp27, potencia la apoptosis extrínseca tras sensibilizar a TRAIL. Cuando se activa TRAIL hay apoptosis significativa de células tumorales, mientras que provoca una toxicidad mínima para las células sanas. El grado de especificidad de este blanco terapéutico, su baja toxicidad en células sanas y su dualidad de reducir la resistencia celular a la apoptosis a la par que sensibiliza la apoptosis mediante la sobreexpresión de TRAIL en células cancerígenas hace que sea de interés no solo para este trastorno sino también para otros eventos tumorales<sup>30</sup>.

Es por ello que se desea mostrar la secuencia de LY303511 (anexo 1). El total de bases para este clorhidrato corresponde a 1,010 llegando a ser apenas de una longitud de aproximadamente 1 Kb de las 38 Kb de capacidad necesarias para el modelo viral.

51

GATA-1 ha tenido fuerte impacto terapéutico desde 1998 para diferentes patologías, particularmente en la investigación llevada a cabo por Morceau F se demostró en ensayos in vitro que tras la adición GTP un nucleótido trifosfato a un medio de cultivo con células K562 éste indujo una inhibición de la proliferación celular mediada por el aumento de GATA-1<sup>11</sup>.

Una vez demostrado que la estimulación de esta proteína reduce la proliferación celular y continuando con la búsqueda de secuencias para escindir positivamente sobre GATA-1 en los artículos investigados se encontró que en la investigación de Boyes J se demuestra que GATA-1 es acetilada in vivo por p300 una acetiltransferasa y, producto de esta acetilación se aumenta la expresión de esta proteína<sup>6</sup>, se muestra la secuencia génica de p300 en el anexo 2, con una longitud de aproximadamente 7 Kb una cifra mucho más razonable y sencilla a la hora del Knockin en la partícula viral.

En lo que respecta con ADAR1 la investigación liderada por Elcheva I demostró que esta enzima

desaminasa promueve la leucemogénesis con énfasis en las células madre sanas y neoplásicas por lo que se ha visto asociada fuertemente con el paso de la fase crónica a la fase blástica. Bajo esa investigación entre otros blancos terapéuticos, se menciona esta enzima y la implementación de 8-azaadenosina (un carbohidrato) para inhibir su función. Sin embargo, acorde a los artículos investigados ésta no puede ser insertada en la secuencia genética del modelo Adenoviral por la naturaleza de su composición química, por lo que el modo de administración de esta a las células neoplásicas fue tema de investigación adicional que se ve reflejado en el numeral a continuación en la tabla 6 (ubicada en el anexo 6.6) donde se pueden evidenciar los inhibidores de genes involucrados en la leucemogénesis conocidos hasta la actualidad.

#### *6.3.5.4 Transferencia de información mediada por exosomas.*

Los exosomas corresponden a vesículas membranosas pequeñas (30-150 nm) de origen endocítico producidas por todas las células en condiciones fisiológicas y patológicas<sup>53</sup>. En cuanto a estudios respecto a estas, diversas investigaciones señalan, en efecto, que corresponden a vehículos de transferencia de información genética involucrados con la “diafonía de las células dentro del sistema hematopoyético y las interacciones entre las células hematopoyéticas y las

52  
células tisulares locales o distantes”<sup>34</sup> y que resultan de un proceso de “gemación” por lo que “conservan el contenido del citosol y membranal de la célula productora”<sup>58</sup>. En otras palabras ello querría decir que, ante un evento tumoral (como lo es la LMC) los blastos leucémicos se ven estimulados a la producción de estos que, tras ser liberados se dirigen de manera específica a células de igual condición (leucémicas) para la trasmisión de información, lo que significa que dicho vehículo conserva (de origen) los ligandos específicos para la unión e internalización a las células de interés (células madre de la LMC y clones neoplásicos) así lo explica Swathi N en su investigación “DPP4+ exosomes in AML patients’ plasma suppress proliferation of hematopoietic progenitor cells”<sup>85</sup>; condición que facilita el transporte activo y específico del carbohidrato 8-Azaadenosina a las células de interés. Sin embargo, esto último se traduce en la necesidad de editar el contenido exosomal para tal fin, debido a que, teniendo en cuenta que en principio estos exosomas contienen el material prooncogénico y antiapoptótico de las células

neoplásicas, es racional esperar que, de no editar el contenido exosomal, este actúe en beneficio de la progresión tumoral.

Así, para evitar estas reacciones adversas a la implementación de los exosomas como vehículo terapéutico, recientes ensayos clínicos como el de Berdani S han conseguido con éxito la producción activa de exosomas in vitro mediante la transfección de la línea celular HEK293T con plásmidos que codifican la proteína exosómica Lamp2b, fusionados con un fragmento de interleucina 3 (IL3), receptor del cual se conoce está presente en la membrana de las células causantes de la LMC, así, el producto de este cultivo celular condujo a la generación de exosomas que, por poseer tal receptor conseguían una transmisión génica activa en la población celular neoplásica en modelos murinos. En efecto, esta alternativa no solo elimina el riesgo de progresión tumoral, sino que, a la par conserva los mismos beneficios del transporte por vehículos eléctricos como lo son los exosomas<sup>88</sup>.

#### *6.3.5.4.1 Ventajas del uso de exosomas.*

Una de las grandes ventajas hasta el momento comprobada de estos sistemas de transmisión de información es que, por su naturaleza estructural, la carga de carbohidratos, lípidos, proteínas y/o material genético no se ve afectada por digestión enzimática por lo que la entrega de dichas

53

moléculas a las células diana están preservadas tal cual fueron emitidas inicialmente<sup>68</sup>. En suma, estos han demostrado alta estabilidad ante la edición genética.

Conviene subrayar además que, estas vesículas liberadas de los clones neoplásicos han logrado ser obtenidas de muestras de plasma a partir de técnicas de centrifugación diferencial, captación por cromatografía de exclusión por tamaño y ultrafiltración, procedimientos que no solo conservan la integridad de los exosomas presentes, sino que además los purifican de elementos contaminantes como microorganismos, residuos celulares y otros vehículos eléctricos de mayor tamaño<sup>34</sup>. Así mismo, técnicas de caracterización celular como la citometría de flujo se han venido implementando para la identificación y cuantificación de exosomas producidos por células normales así como los derivados de tumores, respecto a este último tema, investigaciones como la de Whiteside T han demostrado que “La membrana de superficie contiene las principales

moléculas del complejo de histocompatibilidad; antígenos asociados a tumores (TAA); ligandos inhibidores tales como FasL, TRAIL, PD-L1, TGF- $\beta$  / LAP; moléculas de adhesión, en particular ICAM, EPCAM, CD44, CD26, CD39 / CD73; receptores transmembrana tales como CXCR4 y c-Met; proteínas de choque térmico; y varias tetraspaninas (CD9, CD63, CD81)<sup>58</sup>.

Por último, los exosomas derivados de células tumorales han demostrado bajo ensayos in vitro y murinos alta eficiencia de inhibición de la respuesta inmune, lo que lo hace una partícula tolerable y estable a nivel fisiológico, característica indispensable para la transmisión del carbohidrato 8-Azaadenosina.

En conclusión, este reciente modelo de transmisión de información no solo ha demostrado poseer una alta estabilidad de edición génica sino también especificidad, así como baja inmunogenicidad; por lo que, podría ser implementado no solo para la resolución de la LMC sino también, de otros trastornos en la medida en que este sea aprovechado como un vector de terapia génica. A pesar de esto, la escasez de estudios limita el planteamiento de nuevas aplicaciones terapéuticas y a priori su implementación en humanos.

## **7. Análisis de la información encontrada.**

### ***7.1 Compilación y contraste de las alternativas terapéuticas disponibles y el modelo viral descrito.***

Se expondrán a continuación las múltiples ventajas que posee la terapia viral oncolítica en contraste con las alternativas terapéuticas disponibles actualmente y más puntualmente el modelo viral Ad5/52s en contraste con los demás vectores virales desarrollados por los diferentes grupos de investigación bajo el marco de la compilación de los diferentes hallazgos de la investigaciones aquí consultadas. Es así como, el primer resultado, fruto de la recopilación de 90 referentes bibliográficos recae sobre parámetros a tener en cuenta como vida media fisiológica, riesgos a la salud humana descritos en la literatura, eficiencia de transducción de genes, expresión de genes exógenos, ligandos afines a los receptores de las células productoras de la LMC, apoptosis

dirigida a células tumorales, recaídas, entre otros (véase las tablas 12 y 13 ubicadas en los anexos 6.12 y 6.13 respectivamente).

En las tablas 12, 13 y 14 (ubicadas en los anexos 6.12 a 6.14) se resalta en rojo las características negativas de cada alternativa terapéutica, en azul los aspectos sin dato y en verde o negro las que resultan positivas para la implementación en ensayos in vivo.

Así el modelo estudiado y escogido (Ad5/52s) no sólo es el vector viral con mayor eficiencia en transducción de genes<sup>5</sup>, sino que también a diferencia de muchos vectores virales (véase la tabla 14 ubicada en el anexo 6.14), este posee el tropismo necesario para la internalización de la partícula viral debido a la independencia de CAR, un ligando pobremente expresado en las células de la LMC postura relacionada a la investigación de Abudoureyimu<sup>71</sup>, García M<sup>38</sup> y Qian W<sup>20</sup>. Además, la ausencia de reportes de efectos secundarios por la literatura, da a entender que el único o quizás el más perjudicial resultaría inevitablemente en la leucopenia inicial al generar apoptosis intravascular de los clones neoplásicos. Por otro lado, si bien no posee tanta estabilidad fisiológica como lo hace la cepa salvaje<sup>38</sup>, este logra evadir la respuesta inmune tanto por la delección de los genes E3 y E4 como por el quimerismo de la partícula viral lo que entre otras cosas lo hace más tolerable en ensayos in vivo<sup>71</sup>. Finalmente, la literatura apunta además que es

55

el vector viral con mejor capacidad de concentración de partículas a la par que logra infectar células en estadios no proliferativos, desventaja observada en los modelos basados en *retrovirus* y que, a diferencia de los modelos basados en *reovirus* y el rAd5pz, posee una baja citotoxicidad en la población celular sana<sup>35-79</sup>.

Además, cabe destacar que en la documentación investigada no se observaron datos relevantes de la tolerancia de los vectores ni de la evasión de la respuesta inmune por lo que se da a entender que, si bien esta familia nueva de terapias ha presentado un buen comportamiento en diferentes fases de prueba, aun esta alternativa se encuentra en desarrollo para lo que son las malignidades hematológicas, razón por la cual no se ha explorado lo suficiente en ensayos in vivo. Por otra parte, en lo respecta con las terapias disponibles en la actualidad, Adenovirus 5/52s ha demostrado múltiples y contundentes ventajas como lo es la ausencia de resistencia al modelo

viral en ensayos in vivo, la no producción de daño hepático<sup>5</sup>, objetivos celulares específicos (sólo el linaje neoplásico)<sup>71</sup>, no presentar interferencias en presencia de fármacos y el claro bajo riesgo de generar recaídas por tratamiento, último aspecto que ha venido tomando mayor importancia para todas las terapias evaluadas aquí.

## *7.2 Knockout génico del vector viral: construcción de la herramienta CRISPR-Cas*

En lo referente a la aplicación de la tecnología CRISPR-Cas para la edición génica del modelo viral, los resultados se dividieron en dos segmentos, el primero de ellos respecto al knockout y los elementos que lo componen y el segundo lo correspondiente al knockin mediante la construcción de un plásmido recombinante. Así, respetando el subtítulo que refiere, para la realización del knockout se tuvo en cuenta en primera medida la ubicación génica de los genes de interés (E1b, E3 y E4) en el genoma completo del Ad5 (véase el anexo 4),

posteriormente se seleccionó el tipo de endonucleasa a implementar en base al tipo de material genético al que se dirige y el tipo de extremos resultantes de la acción nucleasa (romos o cohesivos) así, en vista de que el material genético a editar es de doble cadena de ADN por pertenecer al genoma viral se descartaron las endonucleasas dirigidas a ARN, quedando así únicamente las endonucleasas Cas9, Cas12a y Cas3; las dos últimas fueron descartadas en la

56  
medida en que Cas12a produce extremos cohesivos lo que dificulta la inserción de material genético y Cas3 debido al hallazgo de la degradación del material génico en dirección 3'-5' lo que entre otras cosas puede terminar en la deleción de material genético que se desea conservar.

Una vez encontrada la endonucleasa se procedió a la búsqueda teórica de los PAM's de variantes de Cas9 con lo que finalmente se hallaron 3 PAM's en dirección 3' y próximos a las secuencias a deleccionar (resaltadas en rojo en el anexo 4). Así, para el knockout del gen E1b se emplea la endonucleasa SpCas9 al poseer como PAM la secuencia NGG, adyacente a la secuencia en dirección 3', de igual modo para el knockout del gen E3 se emplea la endonucleasa VQRspCas9 (PAM NGAN). Por otro lado, Hu et al demostró que xCas9 3.7 expuso el rango de PAM más

amplio, reconociendo NG, NNG, GAT y CAA. último de los cuales está presente inmediatamente antes del gen E4 del modelo viral<sup>61</sup>.

Posterior a las endonucleasas en base al PAM, se encontró que la secuencia de ARN complementaria al genoma viral en la porción génica que se podría deletar, es el ARN<sub>cr</sub>, que en conjunto con el ARN<sub>tracr</sub> son de vital importancia para el correcto funcionamiento de la herramienta de edición génica en la medida en que direccionan los puntos sobre los cuales la endonucleasa debe ejercer su acción por lo que están directamente involucradas con la deletación de los genes ya descritos (véase las ilustraciones 10, 11 y 12 en los anexos 5.10, 5.11 y 5.12 respectivamente).

**7.3 Knockin del vector viral: construcción teórica de plásmidos recombinantes.** Continuando con la edición génica del modelo viral, una vez estudiado el knockout<sup>32</sup>, en beneficio del espacio generado en la doble hebra de material genético viral, se podrían insertar los genes de interés<sup>32</sup> LY303511<sup>30</sup> y p300<sup>6</sup> (véase los anexos 1 y 2 respectivamente) mediante la construcción de dos plásmidos recombinantes<sup>32</sup> (uno para cada secuencia). Para ello, se debe obtener la ubicación de cada una de las secuencias de interés dentro del genoma completo que lo contiene, así, las bases que le anteceden en dirección 3'-5' a los genes de interés corresponderán a los nucleótidos sobre los cuales deben cortar las enzimas de restricción (PAM), de modo tal que se logre aislar selectivamente los genes de interés<sup>32-39-41-69-70-72-77-83</sup>.

57

Una vez conseguido esto, se investiga cuáles podrían ser los plásmidos bacterianos que, además de tener en alguna porción la secuencia reconocible por la enzima de restricción escogida, debe poseer además, homología con los extremos romos generados en el knockout (representados en verde), a esto se le llaman brazos homólogos; estos, además de ser complementarios a las bases que flanquean el knockout, deberían poseer una longitud de 30 nucleótidos en la medida en que le proporciona mayor especificidad a la hora del knockin (véase las ilustraciones 13 y 14 en los anexos 5.13 y 5.14 respectivamente).

**7.4 Modelado del genoma viral resultante de la edición génica por CRISPR-Cas9.** Acorde a

toda la investigación bibliográfica se logró la definición del modelado teórico del genoma viral resultante de la interpolación que favorece entre otras cosas la edición génica por la tecnología CRISPR-Cas anteriormente explicada e ilustrada en los anexos<sup>32-39-41-69-70-72-77-83</sup>(véase la ilustración 15 en el anexo 5.15). Así, mediante el knockout esquematizado anteriormente, se puede obtener la delección de los genes E1B, E3 y E4 del genoma viral<sup>71</sup> y en reemplazo a ellos, mediante el knockin también construido y explicado en el apartado anterior obtener la inserción específica de las secuencias genéticas<sup>69</sup> que codifican para la acetiltransferasa p300<sup>6</sup> y el clorhidrato LY303511<sup>30</sup>, genes que como fue descrito anteriormente inciden positivamente sobre GATA-1 y negativamente sobre Hsp27, respectivamente.

Así, la construcción de genoma viral se ubica en el anexo 5.15, en donde las siglas ITR hacen referencia a las repeticiones terminales invertidas que son regiones cortas canónicas (de aproximadamente 100pb) altamente conservadas en la familia *Adenoviridae*<sup>79</sup> y sobre las cuales se unen las proteínas celulares para promover la replicación del ADN de la partícula viral, los cajones blancos corresponden a los genes delecionados (E1B, E3 y E4)<sup>83</sup> y a la derecha se encuentran intactos los genes tardíos de la partícula viral.

***7.5 Importancia relativa de las revistas compiladas: clasificación por cuartiles.*** Teniendo en cuenta que el cuartil es un indicador que sirve para evaluar la importancia relativa de una revista dentro del total de revistas de un área determinada y que están ordenadas de mayor

58

a menor índice de impacto, en el primer cuartil (Q1) se encuentran las revistas de mayor impacto mientras que en el último (Q4) se ubican las revistas cuyas publicaciones no poseen un número significativo de citas. A groso modo, el primer cuartil corresponde al 25% de las revistas con mayor impacto, el segundo cuartil abarca entre el 25%-50%, el tercer cuartil entre el 50%-75% y el último entre el 75%-100%.

Así, como se manifiesta en el gráfico circular de la ilustración 16 (ubicada en el anexo 5.16), el 78% de la literatura consultada (70 publicaciones) corresponden a cuartil uno (Q1), el 11% (10 publicaciones) al cuartil 2 (Q2), el 3% (3 publicaciones) a cuartil 3 (Q3) y el 8% (7

publicaciones) al último cuartil (Q4). Se refleja por lo tanto que el 89% de la literatura consultada se ubica en los dos primeros cuartiles razón por la cual cumple con el primer punto de los criterios de inclusión en el diseño metodológico.

Por otro lado, detallando puntualmente cuáles revistas fueron consultadas para el desarrollo de este trabajo de grado y su aporte en el gráfico circular, se generó otra gráfica, en la cual se puede observar la distribución porcentual de la literatura consultada clasificada por revistas (véase la ilustración 17 ubicada en el anexo 5.17), en donde las revistas con barras verdes pertenecen al cuartil uno (Q1), las amarillas al cuartil dos (Q2), las naranjas al cuartil tres (Q3) y las negras al cuartil cuatro (Q4).

Así, en lo referente a la literatura consultada, no solo es de calidad, en el sentido de ubicarse en los cuartiles de impacto diseñados por SCOPUS, sino que también, al reflejar cada una de ellas un sentido científico maduro, específico y especializado revelan legitimidad académica y exigencia.

*7.6 Importancia mundial de las malignidades hematológicas en el desarrollo investigativo.* Las malignidades hematológicas en Colombia hoy día, según un comunicado de la organización mundial de la salud han cobrado la muerte de millones de personas, representando así el 6.2% de la mortalidad por cáncer, en razón a esto, como quinto resultado de este trabajo de grado se halló la distribución geográfica de la literatura consultada, dato que refleja los esfuerzos mutuamente excluyentes de cada país en el desarrollo investigativo en torno a tecnologías de edición génica,

59  
origen, tratamientos disponibles, limitaciones y futuras visiones terapéuticas asociadas a las malignidades hematológicas (véase las ilustraciones 18 y 19 ubicadas en los anexos 5.18 y 5.19 respectivamente).

Investigaciones que, dentro de otras cosas, fueron analizadas individualmente en busca de evaluar la probabilidad de aplicarlas en torno al trastorno mieloproliferativo estudiado aquí, en razón al metanálisis desarrollado.

Así, como lo demuestra la gráfica de barras y en el cartograma (ubicados en el anexo 5.18 y 5.19), el país con mayor desarrollo investigativo en torno a las malignidades hematológicas aquí

consultadas fue Estados Unidos con 28 publicaciones que representan el 33% de la literatura, seguido de China con 11 publicaciones (13%).

Por otro lado, los países con menor impacto investigativo en lo referente a malignidades hematológicas son Suecia, Finlandia, Inglaterra, Francia, Luxemburgo, Perú, México, entre otros. Hallazgo explicado en la medida en que, diferentes estudios de incidencia epidemiológica como la liderada por Miranda-Filho y colaboradores demuestran que, para el año 2018 los países con mayor incidencia de leucemias por cada 100.000 habitantes/año son los ubicados en norteamérica, con una incidencia mayor a 6.5 casos por cada 100.000 habitantes/año, esto demuestra el por qué Estados Unidos ocupa un tercio de la bibliografía consultada, no obstante, este comportamiento no se ve reflejado en los demás países de norteamérica como lo es Canadá.

Por otro lado, continuando con la misma investigación, países como México, Colombia, España y Rusia demuestran una incidencia de 5.2-6.4 casos por cada 100.000 habitantes/año, sin embargo, para esta elevada incidencia solo Colombia y España demostraron un desarrollo investigativo superior al 5% de la literatura consultada. Ahora bien, aun siendo un porcentaje bajo para la incidencia que le corresponde, Colombia fue el país de latinoamérica con mayor aporte científico para el desarrollo de este trabajo de grado. Continuando, países como China, Brasil, Chile, Argentina y Perú poseen una incidencia de 4.1-5.1 de casos por cada 100.000 habitantes/año y, aunque es menor que la observada en países como Colombia y España, China aportó mayor desarrollo científico en busca de la resolución de malignidades hematológicas, indudablemente por su accesibilidad tecnológica.

60

### *7.7 Avances científicos orientados a las malignidades hematológicas a lo largo de los años.*

En razón al peso que conlleva redactar estudios y revisiones con material bibliográfico reciente, este trabajo de grado demuestra a partir de un gráfico de barras la distribución de la literatura consultada, clasificada cronológicamente como literatura citada y publicada en los últimos 30, 10 y 5 años. No obstante, si bien el trabajo de grado aquí desarrollado (monografía) no posee restricciones en cuanto a la cronología de literatura citada, durante la recopilación de la totalidad

documental se procuró establecer como referentes bibliográficos, publicaciones que no superarán los 10 años de antigüedad, no obstante, en el diseño metodológico se estableció que, en favor de la recopilación de información absolutamente necesaria para el progreso de este metanálisis se permitirían referentes con mayor antigüedad, en la medida en que, la LMC al tratarse de un trastorno mieloproliferativo estudiado e investigado ampliamente desde los años 80, era absolutamente inevitable recopilar los primeros hallazgos en torno a esta enfermedad para posteriormente ante el pleno entendimiento de la fisiopatología, establecer una terapia innovadora y segura en ensayos in vivo. En el gráfico de barras a continuación se evidencia la cantidad neta y porcentual de la literatura investigada y clasificada cronológicamente (véase la ilustración 21 ubicada en el anexo 5.21).

Así, como lo demuestra el gráfico de barras, el 100% de la literatura consultada (90 publicaciones) corresponden a los últimos 30 años de antigüedad, el 73% (66 publicaciones) corresponden a los últimos 10 años de antigüedad y el 58% (52 publicaciones) a los últimos 5 años de antigüedad, siendo así cada categoría incluida en la anterior.

Así, el 27% (24 publicaciones) de la literatura consultada corresponde cronológicamente a estudios publicados entre 1984 y 2010, el 15% (14 publicaciones) fueron publicados entre 2011 y 2015 y el 58% (52 publicaciones) fueron publicados entre 2016 y 2021, cuya vigencia corresponde a los últimos 5 años.

61

## **8. Conclusiones**

Así dentro del marco del análisis y recopilación documental se concluye que la endonucleasa Cas 9 de la tecnología CRISPR-Cas no sólo posee la capacidad de reconocer y knockear las secuencias de interés en el modelo viral descrito sino que también logra hacer inserciones igual de específicas y estables a nivel intracelular mediante el aprovechamiento de las diferentes variantes de esta endonucleasa descritas en la literatura consultada.

Por otro lado las ventajas más contundentes del modelo descrito reportadas en la literatura con respecto a los ITK y otros virus usados como terapia viral oncolítica se resumen en que el modelo

viral posee una vida media fisiológica mucho más prolongada siendo esta 60 días, además de ser el vector viral que ha demostrado mejor transducción génica y tropismo por las células responsables de la LMC. Por otro lado la terapia viral oncolítica a diferencia de los ITK poseen baja toxicidad en células sanas y su acción no se ve interrumpida por el consumo de fármacos. Además los virus usados en este tipo de terapias no han registrado en la literatura resistencias asociadas o no con el oncogen de fusión BCR-ABL como sí se ha reportado con los ITK. En suma, el modelo viral aquí descrito según los referentes aquí citados es menos propenso a generar recaídas terapéuticas en la medida en se ha visto que reconoce y genera apoptosis incluso en las células madre que pudiesen estar en fase G0. Por otro lado, al tratarse de un virus quimérico no es fácilmente reconocible por el sistema inmune lo que permite su ingreso en las células diana.

Para terminar, el análisis bibliográfico permite concluir que los vectores virales modificados genéticamente no han reportado producción de metabolitos indeseados caso contrario con el consumo de este tipo de fármacos que dentro de otras cosas produce mutaciones en el genoma humano. Esto, sumado a las investigaciones que respaldan al modelo quimérico aquí descrito (Ad5/52s) como un excelente candidato para la resolución de la LMC en base a su reconocido tropismo. Así, de esto último nace la relevancia de este trabajo de grado en el sentido en el que, si bien se ha reconocido el tropismo de diferentes vectores virales por diversas moléculas, ningún grupo de investigación Colombiano extrapoló esta ventaja en torno a la resolución del trastorno estudiado aquí, siendo así, la investigación más próxima la realizada por Guerrero R actual doctor egresado de la universidad nacional de Colombia quien demostró por ensayos 62 experimentales que la implementación de un modelo viral basado en rotavirus permite la resolución de la LLA de células B en población pediátrica.

Por otra parte, en el marco de la redacción con referentes actualizados y bajo el esquema de pertinencia, esta revisión bibliográfica concluye que no sólo la información es suficiente para la temática desarrollada sino que además es satisfactoria en el sentido en el que se abordan temas desde diferentes puntos de vista sino que también dentro las posibilidades y teniendo en cuenta que la LMC ha sido una enfermedad ampliamente estudiada a lo largo de los años, se generó una revisión y análisis documental en base a referentes mayoritariamente de los últimos 10 años y de

revistas con las más altas calificaciones a nivel mundial ubicándose principalmente en los primeros cuartiles.

Finalmente, en respuesta a los objetivos planteados, la leucemia mieloide crónica (LMC), es una enfermedad que no solo carece de terapias definitivas, sino que también representa un desafío para los grupos de investigación debido a su amplia variabilidad genética y presentación clínica. Es por esto, que el objetivo del desarrollo de este trabajo de grado se centró en la implementación de la tecnología CRISPR-Cas sobre un modelo de Adenovirus como alternativa terapéutica para la resolución de la LMC en el marco de lo definido en la literatura disponible.

Así, frente a la necesidad de generar edición genética de la doble cadena de ADN del modelo viral (Ad5/52s) sumado al valor agregado de implementar nuevas tecnologías, es mandatorio considerar la introducción de CRISPR-Cas al tratarse de un sistema de edición génica sencillo, estable y específico; Sin embargo, CRISPR no solo corresponde a una familia de enzimas muy amplia, sino que también, posee (según el tipo de CRISPR) afinidad por diferentes tipos de material genético además de diferentes mecanismos de acción. Dentro de los mecanismos de acción que hace a esta tecnología más eficiente en el reconocimiento del punto de edición es la capacidad de ésta de identificar el punto de corte mediante la unión específica de la endonucleasa al motivo adyacente de protoespaciador (PAMPs).

Al tratarse de un modelo viral con material genético de tipo ADN, una característica primordial de CRISPR es que esta permita la acción nucleasa en este tipo de material genético, alguna de estas son CRISPR-Cas 9, Cas 12a y Cascade y Cas3; no obstante, cada una de estas posee

63

variantes lo que permite obtener un amplio repertorio de PAMPs. Así, el tipo de CRISPR seleccionado fue CRISPS-Cas9 con 3 de sus variantes: SpCas9, VQRspCas9 y xCas9-3.7 cuyo PAMP (NGG, NGAN y CAA respectivamente) al estar delimitando los genes E1B, E3 y E4 respectivamente (del modelo viral) hace efectivo el Knock out, esta corresponde a la segunda gran característica debido a que facilita la edición genética del modelo viral. Una vez realizado el Knock out, la doble hebra de material genético se rompe por lo que se genera un espacio; En beneficio del Knock in, el espacio es aprovechado para la inserción de los genes que inciden sobre los objetivos terapéuticos encontrados en las células de la LMC. Así, las características de

CRISPR que resultan fundamentales para la construcción del modelo viral y por ende para la resolución de la LMC se resumen en que: la endonucleasa ejerza su acción sobre material genético de tipo ADN y que, el PAMP (que es reconocido por la endonucleasa) esté presente e inmediatamente adyacente las secuencias Knock out de interés, características que sumadas a la eficiente transducción de genes (que posee CRISPR) garantizan el correcto ensamble y funcionamiento de la partícula viral.

Así, continuando con el segundo objetivo específico, dentro de las ventajas que tiene esta tecnología cabe resaltar su fácil selección y manipulación de secuencias, debido a que únicamente necesita la presencia de una endonucleasa activa y un RNA guía complementaria a la secuencia que se desea knockear, ser la alternativa de edición genética más económica hasta la actualidad (cerca de 60 USD) y haber demostrado alta estabilidad intracelular. Así mismo, cumple con la viabilidad de editar genéticamente al modelo viral descrito aquí en la medida en que uno de los tipos de CRISPR más estudiados (CRISPR-Cas 9) genera su acción nucleasa en material genético de tipo ADN, a esto se le suma que la acción nucleasa de esta enzima se caracteriza por dejar extremos romos lo que facilita la inserción y delección de regiones genéticas. Además, se ha demostrado que permite el control del tipo de secuencia a insertar mediante la reparación por homología libre de errores (HDR) para la cual únicamente se necesita de un templado donante con la secuencia de interés. Sin embargo, una de las desventajas que presenta esta herramienta es que, aunque la célula diana (en este caso Ad5/52s) sea de fácil transfección y proliferación, este tipo de reparación (HDR) se presenta en menos del 5% de las células (Virus) sometidas al Knock out.

64

La eficiencia de transducción y la expresión de genes exógenos que posee el Adenovirus sin embargo permite que esta herramienta supere la expansión clonal del templado donante al no ser necesario. Además, el aislamiento del material genético viral respecto al material genético celular durante la infección in vivo reduce las posibilidades de mutación del genoma viral, así lo explica Hu Y en su investigación<sup>70</sup>. Esto último se traduce en un genoma viral estable y funcional, aspectos necesarios en una terapia génica exitosa.

Por otro lado, si bien CRISPR-Cas está abriendo nuevas fronteras en edición génica, como cualquier otra requiere de condiciones celulares específicas para no presentar limitaciones transversales a todas las técnicas de edición génica que le anteceden. Así, una de las grandes desventajas que posee esta herramienta de edición genética, es que al tratarse de una tecnología fundamentada en la complementariedad de bases, es premisa establecer una endonucleasa y ARN guías para cada secuencia que se desee editar, además que múltiples investigaciones han demostrado que su practicidad se ve reducida cuando se implementa en células con baja tasa de transfección y proliferación, sin embargo esto no aplica para el modelo viral por lo que representa una ventaja debido a que asegura una correcta y permanente edición génica. Continuando con el vector viral, dando respuesta al primer objetivo específico, Adenovirus es un virus de ADN de doble cadena, éste ha demostrado bajo diferentes investigaciones ser el modelo de terapia viral oncolítica que posee mayor eficiencia de transducción de genes, la mejor estabilidad fisiológica (60 días), alta eficiencia en concentración de partículas virales, baja o nula toxicidad en células sanas, además de expresar los genes que carga sin necesidad de infectar una célula lo que permite, entre otras cosas, modificar su tropismo viral<sup>71</sup>. Sumado a esto, el modelo Ad5/52s por su quimerismo favorece a la reducción de la inmunogenicidad lo que lo hace un vector altamente tolerable para el humano<sup>38</sup>. Además, la edición genética anteriormente explicada mediante la implementación de la tecnología CRISPR-Cas no solamente permite que la partícula viral no genere eventos patológicos (como la oncogénesis) sino que también aporta a la reducción de la inmunogenicidad del modelo (al Knockear los genes E2 y E4) características inigualables frente a otros modelos de terapia viral oncolítica, aquí yace entonces la importancia de la aplicación de este modelo viral y no otro.

65

Finalmente, una vez conocida la tecnología CRISPR-cas y su uso sobre el modelo viral, es menester garantizar no solo que la partícula ingrese a las células de interés sino que, además, genere una transducción efectiva de los antioncogenes que carga; Así, para el desarrollo de este trabajo de grado se tomaron como secuencias genómicas y moléculas algunos antioncogenes, como al LY303511, un clorhidrato que, se ha demostrado inhibe a Hsp27 (una proteína de choque

térmico), a la par que sensibiliza a la célula infectada a la apoptosis extrínseca mediada por TRAIL y como segundo antioncogen p300, una acetiltransferasa responsable de la acetilación (y por ende activación) de GATA-1,

proteína que en altas concentraciones intracelulares se ha visto implicada con la senescencia de las células de la LMC (ambas secuencias se encuentran en los anexos 1 y 2 respectivamente).

De otra parte en lo respecta con el desarrollo investigativo entorno a las malignidades hematológicas a nivel mundial si bien Colombia es el país de latinoamérica que aportó más publicaciones científicas para el desarrollo de este trabajo de grado, la contribución fue menor al 10%, lo que denota firmemente la carencia de desarrollo investigativo por parte de latinoamérica. En este sentido y retomando la alta incidencia de leucemias en latinoamérica, se convierte cada vez más en una necesidad, impulsar a la población al crecimiento de la comunidad científica.

## **9. Discusión.**

En este trabajo de grado se describe por primera vez un modelo Adenoviral editado genéticamente para la resolución de la LMC mediante terapia viral oncolítica, alternativa que, de demostrar resultados óptimos en la práctica, no sólo se trataría de una terapia competitiva económicamente con respecto a los demás tratamientos disponibles actualmente, sino que además se espera, presente los menores efectos secundarios y la menor probabilidad de rechazo y recaída.

Así, una vez finalizada la búsqueda y análisis bibliográfico se determinó que este trabajo de grado llegó a la misma postura que la investigación liderada por Larripa J y colaboradores titulada “Leucemia mieloide crónica” publicada en el año 2017 cuando afirman que los orígenes

de la resistencia a los ITK son tanto dependiente como independiente de BCR-ABL lo que repercute en la alta incidencia de recaídas terapéuticas.

Además, si bien es cierto que la aplicación de Adenovirus y sus derivaciones genéticas en la LMC no ha sido explorada ampliamente, esto no quiere decir que el modelo viral salvaje no

represente una vía terapéutica como lo afirma Marini F y colaboradores en su estudio “Adenovirus as a gene therapy vector for hematopoietic cells” publicado en 1999 en la medida en que las células neoplásicas de la LMC exponen el receptor CAR (en baja cantidad) cuyo ligando está presente en la partícula viral salvaje, en este sentido, no es pertinente afirmar que la partícula viral no logre una internalización efectiva en células hematopoyéticas sino que, más bien es una internalización pobre por lo que requiere de modificaciones genéticas que permitan un tropismo mayor. Es así, como este trabajo está a favor de la postura de Qian W y colaboradores en su estudio “Enhanced antitumor activity by a selective conditionally replicating adenovirus combining with MDA-7/interleukin-24 for B-lymphoblastic leukemia via induction of apoptosis” publicado en 2007 cuando demuestran por medio de citometría de flujo que cerca de un tercio de las células sanguíneas de pacientes con LMC expresan el receptor CAR y que incluso, varios vectores basados en Adenovirus salvaje logran una infección significativa en células k562 in vitro con un MOI alto e incubación prolongada, no obstante la introducción de este modelo viral in vivo requiere de modificaciones genéticas tanto para aumentar el tropismo viral como para garantizar que no genere citotoxicidad y/o transformación en células sanas. En ese sentido, ante el reducido tropismo viral que posee la cepa salvaje, este trabajo de grado postula la implementación de un virus quimérico (Ad5/52s) en el sentido de que diversas investigaciones asocian al fiber corto del Ad52s con el ácido siálico, receptor que se encuentra presente en todos los leucocitos, en lo que respecta con la citotoxicidad es bien conocido que el uso de la tecnología CRISPR-Cas posee los alcances suficientes para retirar los factores de virulencia asociados con la transformación celular (E1), como también para facilitar la evasión de la respuesta inmune (con la delección del gen E3 y E4); Así, una vez la partícula viral es inocua, mediante la misma tecnología es viable a la inserción de antioncogenes que permiten la muerte celular programa de las células neoplásicas.

67

En materia de edición de genética, al igual que McCarty N y colaboradores en su estudio “Multiplexed CRISPR technologies for gene editing and transcriptional regulation.” publicado en el año 2020 este trabajo de grado está a favor con su postura con la cual definen que CRISPR-Cas corresponde a la herramienta de edición genética más sencilla en la actualidad

debido a que requiere únicamente de una endonucleasa, un motivo adyacente de proto-espaciador (PAMP) y una secuencia genética de tipo RNA complementaria a la secuencia de interés para generar una modificación que no solo es específica sino que también es estable a nivel celular pudiéndose ver reflejada en clones celulares o en este caso en las nuevas partículas virales por los métodos de concentración. Sin embargo, también este trabajo simultáneamente está a favor de Pickar A y colaboradores con la revisión bibliográfica titulada “The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications” publicada en 2019 cuando afirma que una desventaja significativa de esta herramienta es la creación de un CRISPR completamente diferente para cada gen en el sentido de que se basa en la complementariedad de bases y que, para cada gen el PAMP que le antecede es particular.

Retomando lo correspondiente con el vector viral, en la conclusión que da respuesta al primer objetivo específico, se establece que se llegó a la misma deducción de Martínez F y colaboradores en su investigación “Biología molecular de los vectores adenovirales” publicada en 2006 al afirmar que el Adenovirus es el vector que tiene la mayor transducción a nivel celular al exponer diferentes ensayos clínicos donde este virus modificado genéticamente de diversas maneras logra una transducción eficaz entre el 70 y el 100% de la población celular con un predominio en los ensayos que revelan una transducción incluso del 95% de la misma. Así mismo, se comparte la postura con Abudoureyimu M y colaboradores, en su revisión bibliográfica “Oncolytic Adenovirus—A Nova for Gene-Targeted Oncolytic Viral Therapy in HCC” publicado en 2019 cuando afirma que se trata del vector viral con mayor estabilidad fisiológica al demostrar mediante ensayos hasta 60d en circulación. En este mismo sentido, se apoya (a partir del análisis de diferentes investigaciones) lo descrito por Marini F y colaboradores en su investigación “Adenovirus as a gene therapy vector for hematopoietic cells”

68

publicada en 1999 cuando se menciona que este modelo es el que permite la mejor concentración de partículas virales al compararlo con otros vectores virales como los retrovirus.

En cuanto a la citotoxicidad hacia las células sanas, este trabajo de grado está en parcial acuerdo

con respecto a lo que establece Guerrero R en su tesis doctoral “Caracterización del potencial oncolítico del aislamiento rotaviral Wt1-5 en cultivos primarios de leucemia linfoblástica aguda de precursores B” publicada en 2018 cuando afirma que una de las características de la terapia viral oncolítica y por lo que ha sido implementada con mayor fuerza actualmente es que, sea cual sea el vector en cuestión, solamente logra ejercer su efecto en la células que le proporcionen el andamio físico necesario, ambiente que únicamente se presenta en las líneas celulares neoplásicas. Sin embargo, el apoyo parcial de esta afirmación radica en que, hallazgos experimentales han revelado que, si bien los vectores virales corresponden a una terapia prometedora, establecer una citotoxicidad nula es sobrevalorar esta alternativa, debido a que se ha evidenciado una citotoxicidad hasta del 5% en células sanas de pacientes con LMC. Lo que sí resulta completamente verídico bajo decenas de investigaciones científicas aquí citadas como la de García M y colaboradores titulada “Generación de un Adenovirus quimérico Ad5/52s pseudotipado con la proteína fiber corta del Ad52 para su caracterización in vitro e in vivo como vector de terapia génica” en el 2015 es que esta partícula posee la facilidad de modificar el tropismo viral mediante la introducción de genes debido a que logra expresarlos sin necesidad de una infección celular. Así, parte de la modificación del tropismo viral es alcanzada mediante la construcción de virus quiméricos, condición que además facilita la evasión de la respuesta inmune. Además, el modelo detallado aquí, es el único que da respuesta a las necesidades primordiales para la implementación de una terapia in vivo para la LMC como lo son la reducida citotoxicidad, evasión de la respuesta inmune, ausencia de efectos colaterales diferentes a la leucopenia, tropismo celular e inducción a la apoptosis, lo que no solo corresponde a una alternativa inocua, sino que también garantiza (al menos teóricamente) muerte celular de tipo apoptótico por lo que no genera liberación de los componentes celulares que pueden resultar nocivos para la salud.

Para finalizar con el modelo de terapia viral oncolítica (Ad5/52s), la carga genética que se debe priorizar para la obtención de un efecto prosenescente y proapoptótico según la revisión bibliográfica debe constar de un gen que aumente la expresión de GATA-1 como lo es p300 (una

acetiltransferasa) esto, debido a que este trabajo de grado está a favor de Boyes J y colaboradores en su investigación “Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation” cuando afirman experimentalmente que el aumento de la expresión de esta proteína se asoció significativamente con la senescencia celular tanto en ensayos in vitro como in vivo, para el segundo de los efectos, esta monografía apoyo lo concluido por el estudio de Mellier G y colaboradores titulado “Small molecule sensitization to TRAIL is mediated via nuclear localization, phosphorylation and inhibition of chaperone activity of Hsp27” publicado en octubre de 2013 cuando demuestran que el aumento intracelular de LY303511 (un clorhidrato) se asoció significativamente con la degradación de Hsp27 citoplasmático y por ende con la apoptosis extracelular mediada por TRAIL, fenómeno explicado por la fosforilación mantenida en la serina 82 de la proteína. Es así como, este trabajo de grado detalla una alternativa terapéutica para la leucemia mieloide crónica mediante la implementación de la tecnología CRISPR-Cas sobre un modelo de Adenovirus genéticamente modificado en base a la recopilación y metanálisis bibliográfico.

## **Bibliografía**

1. Pettersson U. Structural and Nonstructural Adenovirus Proteins.SpringerLink. [Internet].1984. [citado 4 sep 2020]. Available in:  
[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4684-7935-5\\_6](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4684-7935-5_6)

2. O'Dell T, Kandel E, & Grant S. Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors. Nature. [Internet]. 1991. [citado 4 sep 2020]. Available in:

<https://www.nature.com/articles/353558a0>

3. Vergara C, Martínez C. Las moléculas de adhesión y la respuesta inmune. *Revista biomédica*. [Internet]. 1994. [citado 4 sep 2020]. Disponible en:  
[file:///C:/Users/COMPAC%20PRESARIO/Downloads/2101-Texto%20del%20manuscrito%20completo%20\(cuadros%20y%20figuras%20insertos\)-7677-1-10-20130829.pdf](file:///C:/Users/COMPAC%20PRESARIO/Downloads/2101-Texto%20del%20manuscrito%20completo%20(cuadros%20y%20figuras%20insertos)-7677-1-10-20130829.pdf)
4. Traycoff C, Srour E, Dutt P, Cornetta F. The 30/35 kDa chymotryptic fragment of fibronectin enhances retroviral-mediated gene transfer in purified chronic myelogenous leukemia bone marrow progenitors. *Nature*. [Internet]. 1997. [Cited 09 jul 2021]. Available in:  
<https://www.nature.com/articles/2400529#author-information>
5. Peltola M, Kytta A, Heinonen O, Rapola J, Paunio T, Revah F. Adenovirus-mediated gene transfer results in decreased lysosomal storage in brain and total correction in liver of aspartylglucosaminuria (AGU) mouse. *Nature*. [Internet]. 1998. [citado 4 sep 2020]. Available in:  
<https://www.nature.com/articles/3300740.pdf>
6. Boyes J, Byfield p, Nakatani Y, Ogryzko V. Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature*. [Internet]. 1998. [citado 4 sep 2020]. Available in:  
<https://www.nature.com/articles/25166>
7. Gonzalez R, Vereecque R, Wickham T, Vanrumbeke M, Kovesdi I, Bauters F, et al. Increased gene transfer in acute myeloid leukemic cells by an adenovirus vector containing a modified fiber protein. *Nature*. [Internet]. 1999. [Cited 09 jul 2021]. Available in:  
<https://www.nature.com/articles/3300836>
8. Waller C, Fetscher S, Lange W. Treatment-related chronic myelogenous leukemia. *Annals of hematology*. [Internet]. 1999. [Cited 09 jul 2021]. Available in:  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s002770050527>
9. Marini F, Yu Q, Wickham T, Kovesdi I, Andreeff M. Adenovirus as a gene therapy vector for hematopoietic cells. *Nature*. [Internet]. 1999. [Cited 09 jul 2021]. Available in:  
<https://www.nature.com/articles/7700174>
10. Flores J. Leucemia mieloide crónica. Interferón vs trasplante de médula ósea.

Oncohematología. [Internet]. 2000. [citado 4 sep 2020]. Disponible en:

[http://www.anmm.org.mx/bgmm/1864\\_2007/2000-136-SUP2-31-34.pdf](http://www.anmm.org.mx/bgmm/1864_2007/2000-136-SUP2-31-34.pdf)

11. Morceau F, Dupont C, Palissot V, Borde-Chiché P, Trentesaux C, Dicato M, Diederich M. GTP-mediated differentiation of the human K562 cell line: transient overexpression of GATA-1 and stabilization of the  $\gamma$ -globin mRNA. *Nature*. [Internet].2000. [citado 12 sep 2020]. Available in: <https://www.nature.com/articles/2401890>

12. Cheshenko N, Krougliak N, Eisensmith R, Krougliak V. A novel system for the production of fully deleted adenovirus vectors that does not require helper adenovirus. *Nature*. [Internet].2001. [citado 6 sep 2020]. Available in:

<https://www.nature.com/articles/3301459#author-information>

13. Bernaola G, Luque W. FISIOPATOLOGÍA DE LAS INFECCIONES POR ADENOVIRUS. [Internet] 2002 [citado 20 Abr 2020]. Available in:

[https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/paediatria/v04\\_n2/fisiopatolog%C3%ADa.htm](https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/paediatria/v04_n2/fisiopatolog%C3%ADa.htm)

14. Rosenfeld C, Cheever M, Gaiger A. WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of WT1 targeted therapies. *Nature*. [Internet]. 2003. [cited 20 Abr 2021]. Available in:

<https://www.nature.com/articles/2402988>

15. Fernandez F. Estudio secuencial y cuantitativo del quimerismo hemopoyético en pacientes sometidos a un trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos con depleción linfocítica T o con acondicionamiento sub-mieloablatoivo. TDX. [Internet] 2005 [citado 20 Abr 2021]. Disponible en: <https://www.tdx.cat/handle/10803/2170#page=1>

16. Zibert A, Thomassen A, Müller L, Nguyen L, Glouchkova L, Fraefel C, et al. Herpes simplex virus type-1 amplicon vectors for vaccine generation in acute lymphoblastic leukemia. *Nature*. [Internet]. 2005. [Cited 09 jul 2021]. Available in:

<https://www.nature.com/articles/3302577#author-information>

17. Martínez F, Orozco J, Fausto A, Villegas C. *Biología molecular de los vectores adenovirales*. *Cirugía y Cirujanos* [Internet]. 2006;74(6):483-493. [citado 6 sep 2020].

Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/662/66274613.pdf>

18. Massarelli E. KRAS mutation is a predictor of poor response to EGFR tyrosine kinase inhibitors in NSCLC. *Nature*. [Internet]. 2007. [citado 6 sep 2020]. Available in: <https://www.nature.com/articles/ncponc0893>
19. Zhang W, Cai R, Luo J, Wang Y, Cui Q, Wei X, et al. The oncolytic adenovirus targeting to TERT and RB pathway induced specific and potent anti-tumor efficacy in vitro and in vivo for hepatocellular carcinoma. *Cancer Biology and Therapy*. [Internet]. 2007. [citado 6 sep 2020]. Available in: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cbt.6.11.4831>
20. Qian W, Liu J, Tong Y, Yan S, Yang C, Yang M, et al. Enhanced antitumor activity by a selective conditionally replicating adenovirus combining with MDA-7/interleukin-24 for B-lymphoblastic leukemia via induction of apoptosis. *Nature*. [Internet]. 2007. [Citado 09 jul 2021]. Available in: <https://www.nature.com/articles/2405034#author-information>
21. García J. FACTORES PRONÓSTICO EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA FILADELFIA POSITIVA EN PACIENTES TRATADOS CON INHIBIDORES DE LA TIROSINASA [Internet] 2008 [citado 22 mar 2020]. Disponible en: <https://hera.ugr.es/tesisugr/17647873.pdf>
22. Salazar M. Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Revista colombiana de biotecnología*. [Internet]. 2009. [citado 09 jul 2021]. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/11762>
23. Izarzugaza I, Martínez R, Audicana C, Larrañaga N, Hernández E, Tobalina C, et al. EL CÁNCER EN EL PAÍS VASCO. Vitoria-Gasteiz. [Internet]. 2010 [cited 4 sep 2020]. Disponible en: [https://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/estado\\_salud/es\\_5463/adjuntos/cancer.pdf](https://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/estado_salud/es_5463/adjuntos/cancer.pdf)
24. De Luca P, Zalazar F, Moiola C, Gueron G, Cotignola J, Vazquez E. RESÚMENES DE LAS COMUNICACIONES. *Medicina (Buenos Aires)*. [Internet]. 2010 [cited 4 sep 2020]. Disponible en: <https://eds-a-ebshost-com.ezproxy.javeriana.edu.co/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=2&sid=fe440518-066c-4197-92de-d0f383add989%40sessionmgr4008>

25. Poláková K, Lopotová T, Klamová H, Burda P, Trněný M, Stopka T. Expression patterns of microRNAs associated with CML phases and their disease related targets. Springer Link. [Internet].2013. [cited 11 sep 2020]. Available in:  
<https://link.springer.com/article/10.1186/1476-4598-10-41#Abs1>
26. Sethu S, Govindappa K, Alhaidari M, Pirmohamed M, Park K, Sathish J. Immunogenicity to Biologics: Mechanisms, Prediction and Reduction. SpringerLink. [Internet]. 2012 [cited 4 sep 2020]. Available in:  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00005-012-0189-7>
27. Xu C, Fu H, Gao L, Wang L, Wang W, Li J. BCR-ABL/GATA1/miR-138 mini circuitry contributes to the leukemogenesis of chronic myeloid leukemia. Nature [Internet]. 2012 [cited 4 sep 2020]. Available in: <https://www.nature.com/articles/onc2012557#author-information>
28. Velásquez J, Fonseca D, Jacal M, Sánchez M, Sánchez D, Guerrero S. Diagnóstico citogenético y seguimiento molecular en la leucemia mieloide crónica. Esp Méd Quir. [Internet].2013. [citado 11 sep 2020].disponible en:  
<https://www.medigraphic.com/pdfs/quirurgicas/rmq-2013/rmq133o.pdf>
29. Yang Y, Xiao F, Lu Z, Li Z, Zuo H, Zhang Q, et al. Development of a novel adenovirus–alphavirus hybrid vector with RNA replicon features for malignant hematopoietic cell transduction. Nature. [Internet]. 2013. [cited 09 jul 2021]. Available in:  
<https://www.nature.com/articles/cgt201337>
30. Mellier G, Liu D, Bellot G, Holme A, Pervaiz S. Small molecule sensitization to TRAIL is mediated via nuclear localization, phosphorylation and inhibition of chaperone activity of Hsp27. Nature. [Internet].2013. [cited 11 sep 2020]. Available in:  
<https://www.nature.com/articles/cddis2013413>
31. Organización mundial de la salud. Perfiles oncológicos de los países. OMS. [Internet] 2014 [citado 20 Abr 2020].Disponible en:  
[https://www.who.int/cancer/country-profiles/col\\_es.pdf?ua=1](https://www.who.int/cancer/country-profiles/col_es.pdf?ua=1)
32. Nature. Genome editing for all. [Internet] 2014 [citado 20 Abr 2020]. Available in:  
<https://www.nature.com/articles/nbt.2879>

33. Yoshimi K, Kaneko T, Voigt B, Mashimo T. Allele-specific genome editing and correction of disease-associated phenotypes in rats using the CRISPR–Cas platform. *Nature*. [Internet]. 2014 [cited 20 mar 2020]. Available in: <https://www.nature.com/articles/ncomms5240#Sec6>
34. Boyiadzis M, Whiteside L. Information transfer by exosomes: A new frontier in hematologic malignancies. *Sciencedirect* [Internet]. 2015 [cited 20 mar 2020]. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268960X15000132?via%3Dihub>
35. Parrish C, Scott B, Migneco G, Scott J, Steele P, Ilett E, et al. Oncolytic reovirus enhances rituximab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity against chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* [Internet]. 2015. [cited 9 jul 2021]. Available in: <https://www.nature.com/articles/leu201588#author-information>
36. Li H, Hui H, Xu J, Yang H, Zhang X, Liu X, et al. Wogonoside induces growth inhibition and cell cycle arrest via promoting the expression and binding activity of GATA-1 in chronic myelogenous leukemia cells. *SpringerLink* [Internet]. 2015 [cited 20 mar 2020]. Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-015-1552-3>
37. Naka k, Jomen Y, Ishihara K, Kim J, Ishimoto T, Bae E, et al. Dipeptide species regulate p38MAPK–Smad3 signalling to maintain chronic myelogenous leukaemia stem cells. *Nature* [Internet]. 2015 [cited 20 mar 2020]. Available in: <https://www.nature.com/articles/ncomms9039>
38. Garcia M. GENERACIÓN DE UN ADENOVIRUS QUIMÉRICO AD5/52s PSEUDOTIPADO CON LA PROTEÍNA FIBER CORTA DEL Ad52 PARA SU CARACTERIZACIÓN IN VITRO E IN VIVO COMO VECTOR DE TERAPIA GÉNICA. [Internet]. 2015 [citado 19 sep 2020]. Disponible en: [https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2016/hdl\\_10803\\_370116/mgm1de1.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2016/hdl_10803_370116/mgm1de1.pdf)
39. Mojica F. “Sistemas CRISPR-Cas, una revolución biotecnológica con origen bacteriano”. [Internet]. 2016 [cited 18 mar 2020]. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=GOK6FkfmHdQ>
40. Wu B, Ingersoll K, Rehder C, Wang S. Sequential development of chronic myelogenous

leukemia and primary myelofibrosis in a patient with history of large B-cell lymphoma treated with radiotherapy and chemotherapy: two myeloid neoplasms with distinct genotypic profiles

75

suggestive of biclonality in a single individual. *Annals of hematology*. [Internet]. 2016. [cited 9 jul 2021]. Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00277-016-2707-x> 41.

Abyntek. INTRODUCCIÓN A LA TECNOLOGÍA CRISPR-CAS 9. [Internet]. 2016 [cited 18 mar 2020]. Disponible en:

<https://www.abynetek.com/introduccion-a-la-tecnologia-crispr/>

42. Gonzalez S. La donación de médula ósea, influenciada por su desconocimiento. [Internet]. 2016 [cited 18 mar 2020]. Disponible en:

[http://tauja.ujaen.es/bitstream/10953.1/3712/1/TFG\\_Sergio\\_Gonzalez\\_Martnez.pdf](http://tauja.ujaen.es/bitstream/10953.1/3712/1/TFG_Sergio_Gonzalez_Martnez.pdf) 43. Laila Y.

Bielski, Ana M. Orlandi, Hugo R. Boquete. Inhibidores de tirosina cinasa y disfunción tiroidea. ELSEVIER. [Internet]. 2016 [cited 18 mar 2020]. Disponible en:

<https://www.elsevier.es/es-revista-revista-argentina-endocrinologia-metabolismo-185-articulo-inhibidores-tirosina-cinasa-disfuncion-tiroidea-S0326461016300511>

44. Heinrich J, Donakonda S, Joachim V, Lennig P, Zhang Y, Schroeder M. New HSP27 inhibitors efficiently suppress drug resistance development in cancer cells. *Oncotarget*. [Internet]. 2016 [cited 18 mar 2020]. Available in: <https://www.oncotarget.com/article/11905/> 45.

Lompardía SL, Díaz M, Papademetrio DL, Pibuel M, Álvarez E, Hajos SE.

4-methylumbelliferone and imatinib combination enhances senescence induction in chronic myeloid leukemia cell lines. *SpringerLink* [Internet]. 2016 [cited 18 mar 2020]. Available in:

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10637-016-0397-9> 46. Smirnova O. Radiogenic Leukemia Risk Assessment. [Internet]. 2016. [cited 09 jul 2021]. Available in:

[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-45761-1\\_8](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-45761-1_8) 47. Wan T. Cancer Cytogenetics: An Introduction. *SpringerLink* [Internet]. 2016 [cited 18 mar 2020]. Available in:

[https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-6703-2\\_1](https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-6703-2_1) 48. Bengio L, Enrico R, Freitas A, Larripa J, Pavlovsky I, Riveros M, et al. Leucemia mieloide crónica. Sociedad argentina de hematología. [Internet]. 2017 [citado 18 mar 2020]. Disponible en:

<http://sah.org.ar/docs/2017/008-Leucemia%20Mieloide%20Cr%C3%B3nica.pdf> 49.

Organización mundial de la salud. Probióticos y prebióticos. [Internet]. 2017 [citado 18 mar 2020]. Disponible en:

76

<https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-spanish-2017.pdf>

50. Chen Y, Zhou Q, Zhang L, Zhong Y, Fan G, Zhang Z, et al. Stelletin B induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia cells via targeting PI3K and Stat5. *Oncotarget* [Internet]. 2017 [cited 18 mar 2020]. Available in:

<https://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%5b%5d=15957&pubmed-linkout=1>

51. Wan, Thomas S. *Cancer cytogenetics methods and protocols*. SpringerLink. [Internet]. 2017 [cited 18 mar 2020]. Available in: <https://www.springer.com/gp/book/9781493967018>

52. Liang X, Potter J, Kumar S, Ravinder N, Chesnut J. Enhanced CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing by improved design and delivery of gRNA, Cas9 nuclease, and donor DNA. *Journal of biotechnology*. [Internet]. 2017. [cited 09 jul 2021]. Available in:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816561631611X?via%3Dihub> 53.

Boyiadzis M, Whiteside L. The emerging roles of tumor-derived exosomes in hematological malignancies. *Nature*. [Internet]. 2017. [cited 18 mar 2020]. Available in:

<https://www.nature.com/articles/leu201791>

54. Bengio R, Enrico A, Moiraghi B. Leucemia mieloide crónica. *HEMATOLOGÍA*. [Internet]. 2017 [cited 18 mar 2020]. Disponible en:

[http://sah.org.ar/docs/203-230.4.SAH\\_GUIA2012\\_LeucemiaCronica.pdf](http://sah.org.ar/docs/203-230.4.SAH_GUIA2012_LeucemiaCronica.pdf) 55. Li L, You L, Mao

L, Jin S, Chen X, Qian W. Combining oncolytic adenovirus expressing Beclin-1 with chemotherapy agent doxorubicin synergistically enhances cytotoxicity in human CML cells in vitro [Internet]. 2017 [Cited 18 mar 2020]. Available in:

<https://www.nature.com/articles/aps2017100#Abs1>

56. LY303511.1 KR 1020160079864-A/4030: OPTIMAL SOYBEAN LOCI. NIH [Internet].

2017 [citado 11 sep 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LY303511> 57.

Bianchini M. Biología de la leucemia mieloide crónica. Hematología [Internet]. 2017 [citado 20 mar 2020]. Disponible en:

[http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol21/extra3/38-vol21-extra\\_noviembre.pdf](http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol21/extra3/38-vol21-extra_noviembre.pdf) 77

58. Whiteside L. The effect of tumor-derived exosomes on immune regulation and cancer immunotherapy. NIH. [Internet]. 2017 [citado 20 mar 2020]. Available in:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5827821/>

59. Sarmiento D, Ruiz A. EVENTOS ADVERSOS Y PROBLEMAS RELACIONADOS CON MEDICAMENTOS INTERFERONES REPORTADOS EN BOGOTÁ D.C. 2008 – 2017.

[Internet]. 2018 [citado 19 sep 2020]. Disponible en:

<https://repository.udca.edu.co/bitstream/11158/1003/1/TRABAJO%20DE%20GRADO%20INTERFERONES.pdf>

60. Guerrero R. Caracterización del potencial oncolítico del aislamiento rotaviral Wt1-5 en cultivos primarios de leucemia linfoblástica aguda de precursores B. [Internet]. 2018 [citado 19 sep 2020]. Disponible en:

<file:///C:/Users/COMPAC%20PRESARIO/Downloads/1049605017.2018.pdf> 61. Hu H, Miller S, Geurts M, Tang W, Chen L, Sun N, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM

compatibility and high DNA specificity. Nature. [Internet]. 2018. [cited 09 jul 2021]. Available in: <https://www.nature.com/articles/nature26155#author-information> 62. Palacio G, Ramirez G, Muskus C, Torres J, Aya C. Detección de mutaciones en el dominio tirosina quinasa de BCR-ABL1 en pacientes colombianos con leucemia mieloide crónica LMC, resistentes al imatinib. ELSEVIER [Internet]. 2018 [citado 19 sep 2020]. Disponible en:

<https://www.elsevier.es/es-revista-revista-colombiana-cancerologia-361-articulo-deteccion-mutaciones-el-dominio-tirosina-S0123901518300210>

63. Teepen C, Curtis R, Dores G, Gonzalez A, Eibrink M, Kremer L. Risk of subsequent myeloid neoplasms after radiotherapy treatment for a solid cancer among adults in the United States, 2000–2014. Nature. [Internet]. 2018. [cited 09 jul 2021]. Available in:

<https://www.nature.com/articles/s41375-018-0149-2>

64. American Cancer Society. Trasplante de células madre para la leucemia mieloide crónica. [Internet]. 2018 [citado 19 sep 2020]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-mieloide-cronica/tratamiento/celulas-madre-de-la-medula-osea.html>

78

65. Pinheiro T, Feitosa M, Santos M, Saraiva R, Longatti S. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA. Revista de Medicina e Saúde de Brasília [Internet] 2018 [acima mencionado 6 sep 2020]. Disponível em: <https://eds-b-ebsohost-com.ezproxy.javeriana.edu.co/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=2&sid=c81de0f6-c4e1-4334-97f7-94367b224e6e%40sessionmgr101>

66. NIH. Radioterapia para tratar el cáncer. NIH. [Internet]. 2019 [cited 15 mar 2020]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia> 67. Ma L, Pak L, Ou J, Yu J, Louis P, Shan Y, et al. Prosurvival kinase PIM2 is a therapeutic target for eradication of chronic myeloid leukemia stem cells. PNAS [Internet]. 2019 [cited 15 mar 2020]. Available in: <https://www.pnas.org/content/116/21/10482>

68. Túlich L. Exosomas como sistemas de delivery de drogas. UTEC. [Internet]. 2019. [citado 15 mar 2021]. Disponible en: <https://www.utec.edu.pe/blog-de-carreras/bioingenieria/exosomas-como-sistemas-de-delivery-de-drogas#:~:text=Exosomas%20como%20sistema%20de%20administraci%C3%B3n%20terap%C3%A9utica%3A,objetivos%20espec%C3%ADficos%20a%20larga%20distancia.> 69. Pickar A, Gerbach C. The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. Nature [Internet]. 2019. [cited 15 mar 2020]. Available in: <https://www.nature.com/articles/s41580-019-0131-5>

70. Hu Y, Joo H, Lee K, Kim H, Didier R, Yang Y, et al. Streamlined procedure for gene knockouts using all-in-one adenoviral CRISPR–Cas9. Nature. [Internet] 2019 [cited 15 mar 2020]. Available in: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-36736-y> 71. Abudoureyimu M, Lai Y, Tian C, Wang T, Wang R, Chu X. Oncolytic Adenovirus—A Nova for Gene-Targeted Oncolytic Viral Therapy in HCC. Front Oncol. [Internet] 2019 [cited 15 mar 2020]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6857090/> 72. Ross Cloney. Gene editing by

CRISPR–Cas. Nature. [Internet] 2019 [cited 14 abril 2021]. Available in:  
<https://media.nature.com/original/magazine-assets/d42859-019-00088-y/d42859-019-00088-y.pdf>

79

73. Veiga A. Células Stem mesenquimales en el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos: análisis de la experiencia clínica de la unidad de producción celular del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. [Internet] 2020 [cited 14 abril 2021]. Disponible en:

<https://gredos.usal.es/bitstream/handle/10366/145442/Veiga%20Vaz%2c%20Alvaro.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

74. Steegmann J, Casado L, Catellano P, Gómez M, Jiménez A, Pérez M, et al. Manual para el control y el tratamiento de los pacientes con leucemia mieloide crónica. GEL-MC. [Internet]. 2020. [Citado 27 mar 2021]. Disponible en:

<file:///C:/Users/COMPAC%20PRESARIO/Downloads/Manual-GELMC-2020-VDigital.pdf>

Doudna J. The promise and challenge of therapeutic genome editing. Nature. [Internet] 2020 [cited 15 mar 2020]. Available in: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-1978-5>

Matthew C. A Workflow for Knock-in Genome Editing: Simplified. [Internet] 2020 [cited 15 mar 2020]. Available in: [https://www.youtube.com/watch?v=Bto\\_v5au8o4](https://www.youtube.com/watch?v=Bto_v5au8o4)

77. McCarty N, Graham A, Studená L, Amaro R. Multiplexed CRISPR technologies for gene editing and transcriptional regulation. Nature. [Internet] 2020 [cited 15 mar 2020]. Available in:

<https://www.nature.com/articles/s41467-020-15053-x#author-information>

78. Bajaj J, Hamilton M, Shima Y, Chambers K, Spinler K, Nostrand E, Yee B, et al. An in vivo genome-wide CRISPR screen identifies the RNA-binding protein Staufen2 as a key regulator of myeloid leukemia. Nature. [Internet]. 2020. [cited 09 jul 2021]. Available in:

[nature.com/articles/s43018-020-0054-2](https://www.nature.com/articles/s43018-020-0054-2)

79. Wang Z, Liu W, Wang L, Gao P, Li Z, Wu J, et al. Enhancing the antitumor activity of an engineered TRAIL-coated oncolytic adenovirus for treating acute myeloid leukemia. Nature. [Internet]. 2020. [cited 09 jul 2021]. Available in:

<https://www.nature.com/articles/s41392-020-0135-9#Sec23>

80. *Acyrtosiphon pisum* clone LLO1 p300 mRNA, partial cds. NIH [Internet]. 2020 [citado 12 sep 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN734788.1> 81. Polakova K, Zizkova H, Zuna J, Motlova E, Hovorkova L, Gottschalk A, et al. Analysis of chronic myeloid leukaemia during deep molecular response by genomic PCR: a traffic light