



**Universidad**  
Zaragoza

1542

## **TRABAJO DE FIN DE GRADO**

**APLICACIONES ACTUALES DE LAS TIJERAS  
GENÉTICAS**

**CURRENT APPLICATIONS OF GENETIC SCISSORS**

**Autora**

**María del Mar Corraliza Calvo**

**Directora**

**María Pilar Alcalde Lapiedra**

## INDICE

1. Resumen .....	2
2. Palabras clave .....	3
3. Objetivos .....	3
4. Material y métodos .....	3
5. Bases para la edición genética .....	3
6. Edición génica .....	4
6.1. Edición génica con vector viral .....	4
6.2. Edición génica recombinación homóloga (HDR) .....	4
6.3. Edición génica ZFN (Zinc Finger Nucleases) .....	5
6.4. Edición génica TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease). ....	6
7. El sistema CRISPR/CAS .....	6
7.1 funcionamiento del sistema CRISPR en una bacteria .....	7
8. Edición génica con CRISP/Cas9 .....	10
8.1. Diferencias entre inmunidad natural y edición .....	10
9. CRISPR/Cas9: Breve historia de un descubrimiento .....	11
9.1. Primeros pasos .....	11
9.2. CRISPR. Descifrando el código .....	12
9.3. Emmanuelle Charpentier .....	13
9.4. El experimento de Jennifer A. Doudna y el artículo conjunto .....	13
10. CRISPR en medicina .....	14
10.1. Intervenir en células somáticas o en germinales .....	14
10.2. Edición génica in vivo y ex vivo .....	14
10.3. El peligro de las mutaciones no deseadas.....	14
10.4. Investigaciones en enfermedades humanas .....	15
10.4.1. Cáncer .....	15
10.4.2. Alergias y trastornos inmunitarios .....	17
10.4.3. Distrofia muscular de Duchenne .....	18
10.4.4. Trastornos cardiovasculares .....	19
10.4.5. Desórdenes neurológicos .....	22
10.4.6. Desórdenes metabólicos .....	24
10.4.7. Fibrosis quística .....	24
10.4.8. Trastornos relacionados con la sangre .....	25
10.4.9. Trastornos oculares.....	26
10.4.10. Infecciones virales .....	27
10.4.12. Xenotrasplantes CRISPR .....	30
11. Conclusiones .....	30
12. Abreviaturas .....	31
13. Bibliografia .....	31

## 1. RESUMEN

Este trabajo de fin de grado es una revisión bibliográfica sobre el estado actual de la edición genética. La técnica de edición CRISPR/Cas9 abre un mundo de posibilidades tanto en el campo de la biología como, especialmente, en el de la medicina. En él se destacan las líneas principales de investigación, que, derivadas de la misma se están llevando actualmente por la comunidad científica.

CRISPR/Cas (repeticiones palindrómicas cortas regularmente interespaciadas asociadas a las nucleasas Cas) es actualmente la herramienta más destacada de edición génica. Su descubrimiento es el fruto de una simbiosis de varios estudios sobre los mecanismos de inmunidad adquirida de las bacterias y arqueas frente a los fagos y plásmidos que atacan su ADN. Las bacterias, como demostraron estos estudios, se defienden incorporando material genético de sus invasores para establecer inmunidad frente a futuros ataques de estos. El reconocimiento posterior de estos se realiza mediante crRNA y se degrada mediante unas nucleasas denominadas Cas. Posteriormente se dedujo la posibilidad de transformar esta defensa natural en una técnica de edición genética.

El descubrimiento de esta técnica de edición se debe fundamentalmente a dos mujeres, **Emmanuelle Charpentier**, directora de la Unidad Max Planck para la Ciencia de Patógenos en Berlín (Alemania) y a la profesora **Jennifer A. Doudna**, de la Universidad de California en Berkeley (Estados Unidos).

La técnica de CRISPR/Cas9, mediante la aplicación de estos principios, permite silenciar, añadir, activar y cambiar genes o secuencias específicas de los mismos. Desde entonces se han desarrollado multitud de aplicaciones en áreas como la biotecnología, medicina, agricultura y un sinfín de campos. Nos encontramos ante la mayor revolución científica de la década y posiblemente del siglo actual. CRISPR-Cas9 también se puede aplicar para generar modelos animales genéticamente inhibidos para el descubrimiento y desarrollo de fármacos.

En este trabajo se analiza el potencial terapéutico del sistema CRISPR-Cas9 contra diversos trastornos genéticos, incluidos el cáncer, alergias, distrofia muscular de Duchenne, fibrosis quística, trastornos inmunológicos, cardiovasculares, neurológicos, hepáticos, sanguíneos, oculares e infecciones virales.

## ABSTRACT

This final degree project is a bibliographical review on the current state of gene editing. The CRISPR/Cas9 editing technique opens a world of possibilities both in the field of biology and, especially, in medicine. The main lines of research are highlighted, which, derived from it, are currently being carried out by the scientific community.

CRISPR/Cas (Cas nuclease-associated regularly interspaced short palindromic repeats) is currently the most prominent gene editing tool. His discovery is the result of a symbiosis of various studies on the mechanisms of acquired immunity of bacteria and archaea against phages and plasmids that attack their DNA. Bacteria, as these studies have shown, defend themselves by incorporating genetic material from their invaders to establish immunity against future attack by them. Subsequent recognition is done by crRNA and is degraded by nucleases called Cas. Subsequently, the possibility of transforming this natural defense into a gene editing technique was deduced.

The discovery of this editing technique is mainly due to two women, **Emmanuelle Charpentier**, director of the Max Planck Unit for Pathogen Science in Berlin (Germany) and **Professor Jennifer A. Doudna**, from the University of California at Berkeley (United States).

The CRISPR/Cas9 technique, by applying these principles, makes it possible to silence, add, activate, and change genes or specific sequences thereof. Since then, a multitude of applications have been developed in areas such as biotechnology, medicine, agriculture, and an endless number of fields. We are facing the greatest scientific revolution of the decade and possibly of the current century. CRISPR-Cas9 can also be applied to generate genetically inhibited animal models for drug discovery and development.

This paper analyzes the therapeutic potential of the CRISPR-Cas9 system against various genetic disorders, including cancer, allergies, Duchenne muscular dystrophy, cystic fibrosis, immunological, cardiovascular, neurological, hepatic, blood, eye, and viral infections.

## 2. PALABRAS CLAVE (KEY WORDS)

- CRISPR/Cas, secuencias CRISPR, Cas9, ARN guía, edición del genoma, terapia génica.
- CRISPR/Cas, CRISPR sequences, Cas9, guide RNA, genomic editing, gene therapy.

## 3. OBJETIVOS

El principal objetivo del trabajo presente es, en primer lugar, describir someramente los sistemas de edición de genes, en particular el Crispr-Cas9 y destacar sus aplicaciones especialmente en el campo de la medicina. Se pretende señalar los hitos científicos en que se ha basado la edición génica y cuáles son los estudios, ensayos y terapias destacadas que se están desarrollando hasta el día de hoy, describiendo su funcionamiento y logros.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una revisión bibliográfica de artículos científicos a través de la búsqueda en revistas científicas como *Science*, *Cell*, *Nature*; y bases de datos como *PubMed* y *Google Scholar* principalmente referidas a los últimos años. También se ha consultado la bibliografía citada en los artículos consultados.

## 5. BASES PARA LA EDICIÓN GENÉTICA

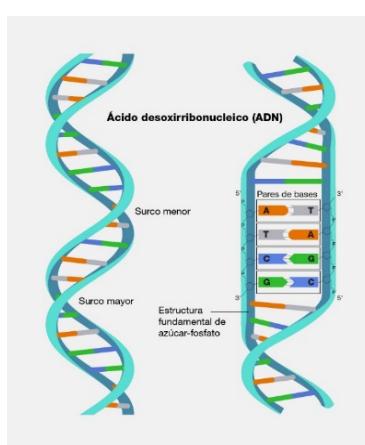


Figura 1. Estructura de cadena de ADN

El genoma se compone de una molécula llamada ácido desoxirribonucleico o ADN (figura 1) con forma de doble hélice<sup>1</sup> que está constituida por cuatro bloques de construcción conocidos como “nucleótidos”. Son unos grupos químicos conocidos como “bases” (adenina, guanina, citosina y timina) y que forman las letras del **ADN** (AGCT). Los organismos de la misma especie comparten los mismos genes y por ello la mayor parte de la secuencia de estas letras.

Las instrucciones contenidas en el ADN son transformadas en proteínas mediante una molécula intermediaria conocida como “ácido ribonucleico” o **ARN**. El ARN se forma a partir del ADN mediante un proceso llamado “transcripción”. Está compuesto por 4 bases, al igual que el ADN, pero en este caso la timina es sustituida por uracilo. Las otras tres bases son iguales (AGCU)

Los organismos y, por lo tanto, los seres humanos pueden albergar diferentes versiones o variantes de un gen (cambios en alguna o algunas de las letras del ADN de un gen). La mayoría de estas variantes no tienen ningún efecto o son responsables de las diferencias que vemos entre las personas, pero algunas son dañinas y provocan enfermedades (enfermedades genéticas). Estas enfermedades pueden ser hereditarias o surgir de nuevas mutaciones en el ADN sin que estas transmitan.

## 6. EDICIÓN GÉNICA

La terapia génica se puede definir como el grupo de técnicas que nos permiten introducir secuencias de ADN o ARN en el interior de las células objetivo con el fin de regular o incluso suprimir la expresión de una o varias proteínas que hemos relacionado con una enfermedad. Veamos algunas de las técnicas que se han ido empleando a lo largo del tiempo.

### 6.1. EDICIÓN GÉNICA CON VECTOR VIRAL

Consiste en utilizar virus para introducir genes en organismos utilizando la capacidad natural que tienen estos para insertar nueva información genética en el ADN.

Llamamos “**transducción**” a la técnica por la que transferimos ADN externo a una célula utilizando un vector viral. Los virus que más se suelen usar en terapia genética como vectores de transmisión son los retrovirus y adenovirus.

#### 6.1.1. PROBLEMAS DE LA TERAPIA GENICA CON VECTOR VIRAL

- a) **Seguridad:** hay posibilidades de que se transfiera sin desecharlo un virus patógeno nativo, se active un virus patógeno existente o se desarrolle un oncogén.
- b) **Poca efectividad:** hay muchas afecciones genéticas que no son causadas por la ausencia o la ineficacia de un gen.

### 6.2. EDICIÓN GÉNICA. RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA (HDR)

Es un método más sencillo que el empleo de vectores virales. La técnica consiste en inyectar directamente en las células el ADN generado en el laboratorio o en sumergir estas mismas células en una mezcla de ADN y fosfato cálcico para que lo absorban.

Cuando insertamos en el genoma, mediante estos procedimientos, muchas copias de un gen, no se integran de forma aleatoria en los distintos cromosomas que lo forman. Los genes introducidos tienden a agruparse en una o en pocas regiones del genoma<sup>2</sup>. Este proceso se denomina “**recombinación homóloga**” y en él se produce la combinación del ADN introducido con el propio de las células editadas, si bien de manera ineficiente.

La recombinación homóloga permite pegar con mayor precisión genes en los lugares que deseamos del genoma y supone una mejora en comparación con la aleatoriedad de la inserción génica con virus. Permite incluso sobrescribir genes defectuosos insertando sanos directamente en el lugar de la mutación corrigiendo o reparando estos. Puede utilizarse además para inactivar genes por motivos de investigación de forma que, apagando estos y observando el resultado, se pueden averiguar las funciones de estos.

#### 6.2.1. PROBLEMAS DE LA TERAPIA GENICA MEDIANTE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

- a) **Baja frecuencia** con la que se da en los mamíferos, especialmente en los humanos.
- b) **Recombinación no homóloga**, o recombinación ilegítima, en la que el ADN se integra aleatoriamente en el genoma y no con precisión en su secuencia correspondiente.

## 6.2.2. MODELO DE ROTURA DE DOBLE CADENA (DSB).

Los profesores Szostak, Rothstein y Stahl para corregir estos problemas publicaron un modelo en el que el factor determinante que da inicio al proceso de recombinación homóloga es un corte en uno de los cromosomas que causa la doble rotura de ambas cadenas de ADN<sup>3</sup>.

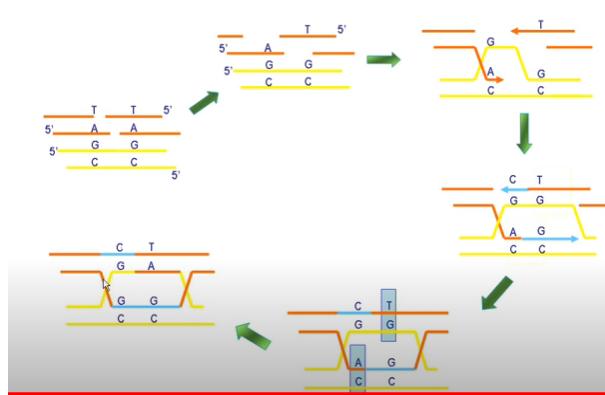


Figura 2: Modelo de ruptura de doble cadena

Los extremos de ADN liberados en la zona de corte tienen una alta tendencia a fusionarse con el ADN externo que se le proporciona (figura 2).

Un cromosoma repara cualquier daño copiando una secuencia equivalente del segundo cromosoma. En este caso, se reemplaza en el lugar del corte el gen defectuoso por la copia que se ha corregido en el laboratorio y que hemos introducido.

## 6.2.3. PROBLEMAS EN EL MODELO DE RUPTURA DE LA DOBLE CADENA

La **precisión de corte** supone el problema principal ya que, a veces, no se reconoce específicamente la secuencia de ADN deseada. Por ello, de buscaron enzimas nucleasas en una cantidad de organismos con el fin de que cumpliesen los siguientes requisitos:

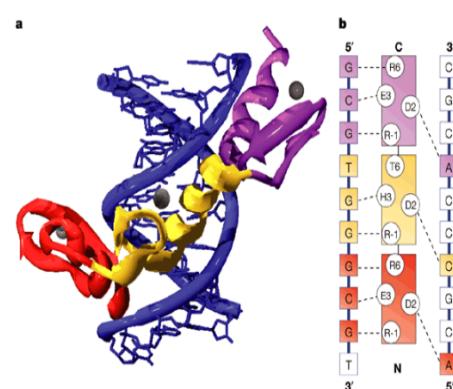
1. Mayor especificidad en el reconocimiento de las secuencias objetivo
2. Capacidad para cortar estas secuencias
3. Posibilidad de reprogramarse para reconocer distintas secuencias

Todas la nucleasas encontradas resultaron incapaces de reconocer secuencias de mas de seis u ocho letras lo que resultaba insuficiente para efectuar una edición de manera precisa.

## 6.3. EDICIÓN GÉNICA ZFN (Zinc Finger Nucleases)

En 1996 se crearon unas endonucleasas quimera mediante la unión de dos proteínas<sup>4</sup> que cumplían los requisitos anteriores de especificidad y capacidad de corte (figura 3).

1. **Fok I:** una nucleasa encargada de cortar en el ADN seleccionado, pero sin preferencia por una secuencia determinada
2. **Proteínas con dedos de zinc:** estructuras que poseen algunas células eucariotas, capaces de reconocer ADN mediante unas extensiones con forma de dedos unidas por iones de zinc



Nature Reviews | Drug Discovery

Figura 3: Proteína dedos de zinc

Fusionando el módulo de corte de Fok I con el módulo de reconocimiento de ADN de una proteína con dedos de zinc se crea una endonucleasa quimera que es capaz de reconocer y cortar el ADN con precisión.

### 6.3.1. PROBLEMAS EN TERAPIA GÉNICA DEDOS DE ZINC

- a) En teoría, diseñar ZFN es sencillo mediante la combinación de diferentes segmentos de dedos de zinc para que reconozcan la secuencia de ADN que se quiere editar.
- b) En la práctica, es muy difícil ya que una gran proporción de las ZFN diseñadas no reconocen las secuencias de ADN objetivo o son demasiado promiscuas y se dirigen erróneamente a otras levemente relacionadas con las mismas.

### 6.4. EDICIÓN GÉNICA TALEN (Transcription activator-like effector nuclelease)

Esa tecnología fue descubierta en 2009 en proteínas encontradas en **Xanthomonas**, un género de bacterias patógenas de las plantas. Estas proteínas llamadas **TALE**, son semejantes a las proteínas con dedos de zinc y están formadas por múltiples segmentos repetidos, cada uno de los cuales reconoce un área determinada del ADN<sup>5</sup>.

#### 6.4.1. DIFERENCIA ENTRE DEDOS DE ZINC Y TALEN

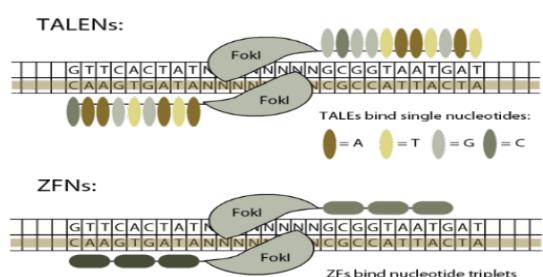
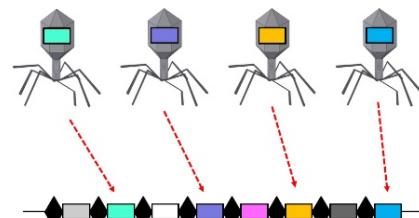


Figura 4: Diferencias en el reconocimiento TALEN y ZFN

Cada uno de los **dedos de zinc** es capaz de reconocer una **secuencia de tres letras**, por el contrario, cada uno de los segmentos de las **TALE** reconoce únicamente **una sola letra de ADN** (figura 4). Luego se organizan esos segmentos, uno tras otro, para reconocer secuencias más largas de un gen.



### 7. EL SISTEMA CRISPR/CAS

**CRISPR** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y espaciadas regularmente) es un término que hace referencia a una región del ADN bacteriano.

Son secuencias de ADN bacteriano que contienen fragmentos del ADN de virus que han atacado a dichas bacterias. Estos fragmentos (memorias moleculares) son utilizados posteriormente por la bacteria para detectar y proceder a la destrucción del ADN de virus semejantes cuando atacan de nuevo la bacteria. Se representan gráficamente con rombos y cuadrados (figura 5).

- **ROMBOS** son las **repeticiones cortas**: son fragmentos de ADN bacteriano de aproximadamente 30 nucleótidos de extensión con la misma secuencia. El término “**repeticiones palindrómicas**” significa que se leen igual en una dirección u otra, como “luz azul” o “zorra y arroz”. Cada una de estas secuencias de nucleótidos está formada por una primera tanda de bases seguida por una segunda tanda de bases complementarias a las primeras ordenadas al revés. Esto permite el plegamiento y apareamiento de dichas bases una vez trascrita la secuencia a ARN (forman una especie de “horquilla”).

*Las repeticiones palindrómicas NO están presentes en el sistema Cas9. En vez de un único ARNcr que forma pares de bases en su interior (formando esa horquilla), el ARNcr de Cas9 forma pares de bases con un segundo ARN denominado ARNtracr.*

- **CUADRADOS son las secuencias espaciadoras:** Se encuentran intercaladas de forma regular entre las repeticiones cortas del ADN bacteriano. Son **pequeños fragmentos del ADN del fago** del virus que atacó a la bacteria. Cada secuencia es diferente. Los espaciadores se transmiten a las siguientes generaciones y con ello la inmunidad. Son las denominadas “memorias moleculares” anteriormente descritas.

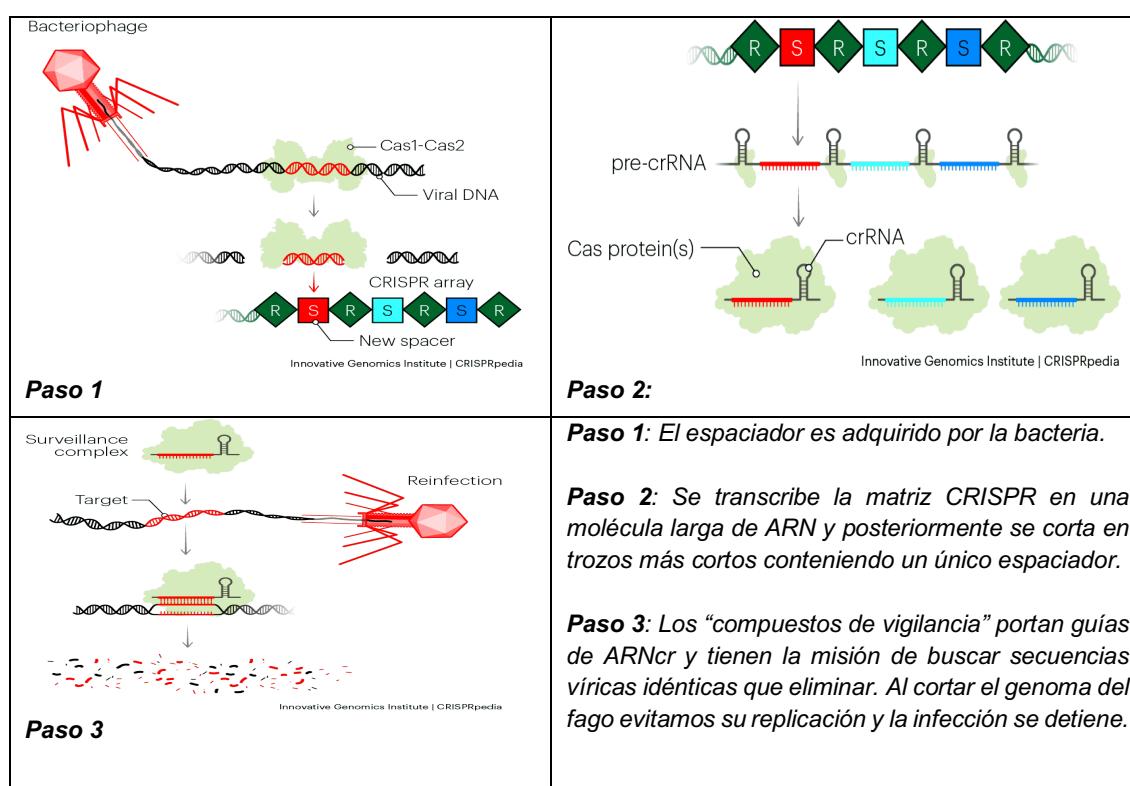
Las series de rombos y cuadrados están agrupadas en una región del cromosoma, la “**matriz CRISPR** o matriz de espaciadores repetidos”, no distribuidas aleatoriamente por todas partes.

Los sistemas CRISPR están formados por una matriz CRISPR y una serie de genes asociados, los **genes Cas**. La proteínas Cas codificadas por estos genes son las encargadas de ejecutar la respuesta inmunitaria.

## 7.1. FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA CRISPR EN UNA BACTERIA

Cada vez que una bacteria con sistema CRISPR-Cas es atacada por un fago, mediante un proceso denominado adquisición o adaptación, incorpora un nuevo espaciador a la matriz CRISPR. El número de espaciadores es variable. Estas bacterias pueden poseer diversas combinaciones o grupos de genes Cas, constituyendo cada uno de ellos un sistema CRISPR distinto, pudiendo coexistir varios sistemas en una misma bacteria.

Cada grupo de genes Cas codifica para una serie de proteínas Cas que desempeñan funciones diferentes, pero con fin común. La proteína **Cas1** es la responsable de incorporar nuevas secuencias espaciadoras en las matrices CRISPR siendo común a todos los sistemas CRISPR.



**Figura 6:** sistema CRISPR en esquema

### 7.1.1. FASES DEL SISTEMA DE INMUNIDAD CRISPR:

#### a) FASE PRIMERA. ADQUISICIÓN DEL ESPACIADOR POR LA BACTERIA.

Las proteínas **Cas1** y **Cas2**, capturan trozos de ADN del fago atacante y lo insertan como un nuevo espaciador en un extremo de la matriz CRISPR. A continuación, el sistema CRISPR añade una nueva repetición corta de ADN en su matriz de forma que cada uno de los nuevos espaciadores se halla entre esas secuencias repetitivas dando origen a una “memoria molecular” de los contactos con fagos de la bacteria (figura 6).

#### b) FASE SEGUNDA: BIOGÉNESIS DE ARN CRISPR (ARNcr)

Las “memorias moleculares” son transformadas en moléculas de ARN para así poder reconocer nuevos fagos que infecten a la bacteria. Se sintetizan diversas copias de estas memorias que constituyen lo que denominamos **ARN CRISPR (ARNcr)**. Durante el proceso de síntesis del ARNcr, se transcribe toda la secuencia de espaciadores y repeticiones cortas que componen la matriz CRISPR. Como resultado, se crea un ARN muy largo llamado **ARN precursor CRISPR (pre-ARNcr)**. Para que ese ARN transcrita sea funcional, el ARN precursor es cortado en porciones más pequeñas por las proteínas Cas. Cada uno de estos fragmentos contiene un espaciador y se denomina **ARNcr**.

#### c) FASE TERCERA: INTERFERENCIA

Es el proceso por el que se destruye el ADN del fago atacante interfiriendo o deteniendo su ciclo vital. Este proceso a su vez tiene unos pasos:

**Primero:** Una o varias proteínas Cas unidas a un ARNcr forman un “complejo de vigilancia”.

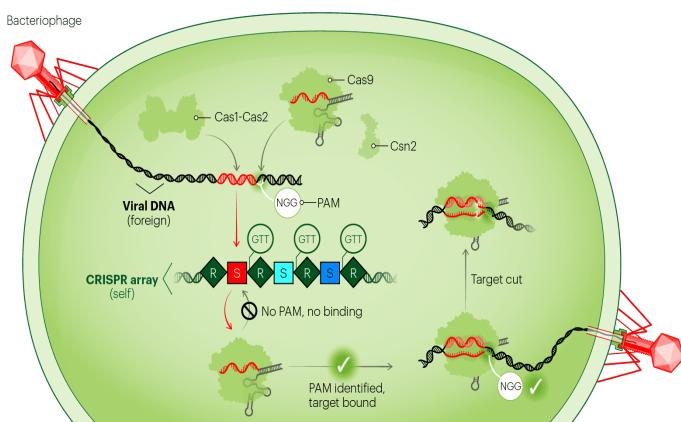
**Segundo:** Este complejo busca secuencias complementarias a la del ARNcr, que actúa como guía, en el ADN introducido por el fago. La secuencia del ADN del fago que coincide con la del ARNcr se denomina *protoespaciador*

**Tercero:** Se emparejan las bases del ARNcr y los protoespaciadores (ADN del fago) y a continuación, las proteínas Cas del complejo de vigilancia cortan el ADN del fago impidiendo su replicación y deteniendo la infección.

En el caso de que el ADN del fago no sea reconocido el sistema no es efectivo.

### 7.1.2. IMPORTANCIA DEL PAM

La destrucción de estos genomas depende de unas secuencias cortas de ADN denominadas **PAM** (protospacer adjacent motif) adjuntas al protoespaciador del ADN del fago, pero que no están en las matrices CRISPR bacterianas y por ello, estas no son destruidas. El papel de los PAM ponemos como ejemplo el sistema CRISPR-Cas9, ilustrado en la figura 7.



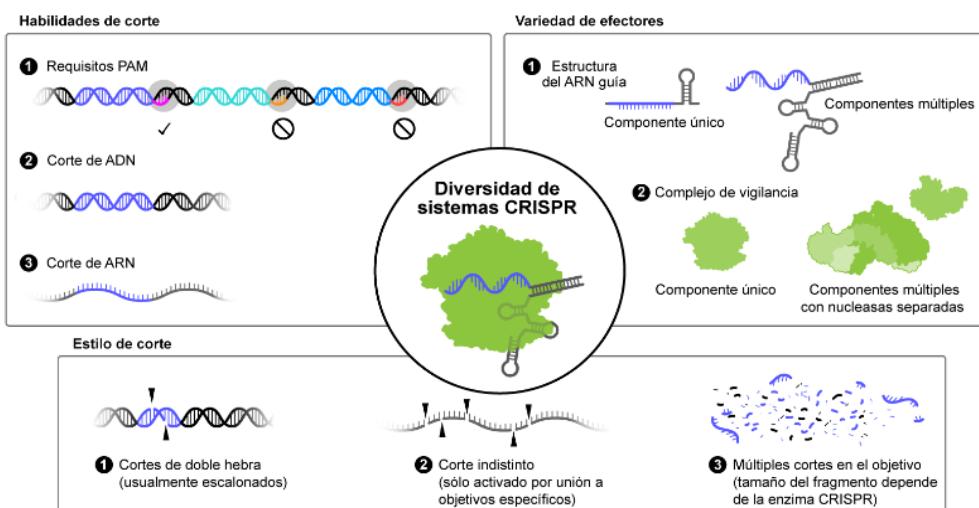
**Figura 7:** Únicamente son seleccionadas por los complejos de vigilancia las secuencias de ADN que presentan PAM. A la izquierda se puede apreciar el sistema de Tipo II. Cas9 es la encargada de guiar a Cas1 y Cas2 para que adquieran nuevos trozos de ADN del fago que contienen la señal PAM (NGG) y así puedan añadir un nuevo espaciador a su matriz CRISPR.

### 7.1.3. DIFERENCIAS ENTRE LOS DISTINTOS SISTEMAS CRISPR.

- a) **ADQUISICIÓN:** Es casi idéntico en los distintos sistemas con algunas diferencias en las proteínas que colaboran con Cas1 y Cas2. Estas proteínas pueden pertenecer a la familia de las Cas o ser otras diferentes con funciones distintas en el organismo. Algunos sistemas pueden incluir, además de ADN, ARN en los espaciadores nuevos.
- b) **BIOGÉNESIS DE ARNcr:** En el proceso de troceado del ARN precursor CRISPR pueden estar implicadas unas proteínas Cas específicas o hacerlo directamente las proteínas Cas con la función de cortar el ADN del fago durante la interferencia. Además, pueden colaborar otras proteínas de la bacteria que tengan otras funciones. De la misma forma, los ARNcr encargados de guiar a los complejos de vigilancia pueden ser distintos o incluso requerir de otros ARNs para ejecutar su función correctamente. Un ejemplo de esto es el sistema CRISPR-Cas9, que además requiere de un ARNcr y un ARNtracr (trans-activate)
- c) **INTERFERENCIA:** Presenta la mayor variabilidad entre los sistemas y sirve para clasificarlos. Se han descrito tres grupos de sistemas con múltiples divisiones en función de los genes cas que intervienen y dependiendo si pueden destruir solo ADN o también ARN. Cada sistema suele reconocer PAMs distintos al resto. Nos centraremos en los dos principales (figura 8):

**Tipo I:** el complejo de vigilancia se compone de **muchas proteínas Cas** distintas que denominamos “**Cascade**” (CRISPR-associated complex for antiviral defense). Puede destruir el ADN del fago de forma directa o de forma indirecta, mediante la activación de proteínas secundarias de corte (*nucleasas*).

**Tipo II:** el complejo de vigilancia se compone de **una sola proteína**, que localiza y destruye las dianas.



**Figura 8:** En la imagen podemos apreciar las peculiaridades de los distintos sistemas según como se compone el complejo de vigilancia, la capacidad de cortar y la forma en que es destruida la secuencia

La mayor diferencia está en la **FORMA DE DESTRUCCIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS**. Los sistemas de **tipo I** poseen la enzima **Cas3**, que corta el ADN diana en distintos puntos. En los sistemas de **tipo II** es **Cas9** la que corta el ADN en un único punto y en el mismo nivel en ambas hebras de ADN. Por último, algunos sistemas CRISPR ejecutan múltiples cortes no solo en el objetivo sino también en las zonas adyacentes al mismo. Suelen coexistir distintos sistemas CRISPR dentro de una misma bacteria. De esta forma, si uno falla en su función, los otros entrarán en acción (figura 8).

## 8. EDICIÓN GÉNICA CON CRISP/CAS 9

El sistema CRISPR-Cas9 es una herramienta que sirve para editar génicamente cualquier organismo. Está compuesto tanto en la forma de inmunidad natural como en la de edición génica por los siguientes elementos:

- a) **La proteína Cas9** que ejerce la función de “tijera molecular” cortando el ADN
- b) **Un ARN guía**; una molécula con posibilidad de programarse para buscar distintas dianas y que sirve de guía para llevar a Cas9 hasta la región del ADN que se quiere seccionar.

Su efectividad, tanto en su forma natural como en la de edición génica, depende de la capacidad de reconocimiento del ARN guía y de corte de Cas9.

### 8.1. DIFERENCIAS ENTRE INMUNIDAD NATURAL Y EDICIÓN

- a) **ENTREGA:** El sistema CRISPR-Cas9 no se encuentra de forma natural en todos los organismos. Las plantas, los humanos y muchos organismos carecen de él y debe introducirse dicho sistema de forma artificial en el interior de estos. Para ello se utilizan plásmidos en bacterias, agrobacterias en plantas, microinyección de óvulos o embriones en modelos animales y procedimientos químicos, virus adenoasociados, incluso partículas de oro conjugadas con ADN o electroporación en células humanas.
- b) **COMPOSICIÓN DEL ARN GUÍA:**

**En la naturaleza** la guía de ARN está formada por dos componentes que constituyen el denominado **ARN de doble guía (ARNdg)**:

- a. **ARN CRISPR (ARNcr)**: que determina el lugar en que Cas9 hará el corte.
- b. **ARN CRISPR trans-activante (ARNtracr)** o **ARN trazador**: Una porción de la guía que funciona como un “mango” y que utiliza Cas9 para unirse a ARNcr. Su función es estructural. De esta forma el ARNcr se aparea con la secuencia ADN diana.

**En la edición genética** se han fusionado los dos componentes en una molécula denominada **ARN de guía única (ARNsg)**. De esta forma, tan solo se necesita producir un único ARN para la edición de una secuencia concreta de ADN.

### c) EDICIÓN EN CÉLULAS PROCARIOTAS Y EUCA RIOTAS

**Las células eucariotas** guardan su ADN en el interior del núcleo y por ello se debe atravesar una doble barrera, la membrana celular y la nuclear. Se ha de proporcionar a la proteína Cas9 una señal de localización nuclear (**NLS**) que indique a la célula la necesidad transportar la enzima dentro del núcleo. El material genético en las células eucariotas presenta una conformación más compleja debido a la existencia en ellas de las **histonas**, unas proteínas entorno a las que se pliega el ADN y que dificultan la acción del CRISPR-Cas9.

Para afrontar esta dificultad, es posible usar una Cas9 modificada, la dCas9. La dCas9 es capaz de fusionarse con una enzima que añade grupos acetilo a la cola de las histonas, la acetilasa. Esto sirve como una señas que hace que se “abra” el ADN posibilitando así la transcripción de este, o en este caso el acceso del sistema CRISPR-Cas9.

**dCas9**: es una enzima Cas9 mutada es capaz de localizar dianas de ADN de fago, sin embargo, no es capaz de cortarlas. Ambos dominios de la nucleasa dCas9 presentan mutaciones. Resulta posible unir proteínas que tengan varias funciones a dCas9.

En los organismos **procariotas**, la dificultad de la edición reside en que estas células tienen sistemas de reparación arcaicos. Por ello, es frecuente que los cortes efectuados con CRISPR acaben desencadenando la muerte de la célula en vez de su edición. Para solucionar eso, pueden utilizarse variantes de CRISPR que corten tan solo una de las hebras. Algunos ejemplos son los editores de bases y CRISPRi.

<b>Editores de base:</b> técnica de edición génica que usa la herramienta CRISPR para modificar letras concretas del ADN sin romperlo.
<b>CRISPRi:</b> forma de inhibición con CRISPR. Es un método de modulación de la expresión génica, en este caso de forma negativa, reduciendo la cantidad de productos proteicos sintetizados a partir de dicho gen.

## 9. BREVE HISTORIA DE UN DESCUBRIMIENTO

### 9.1. PRIMEROS PASOS

**YOSHIZUMI ISHINO** de la Universidad de Osaka fue el primer investigador que al secuenciar un gen de la **bacteria E. coli** encontró cinco segmentos de ADN iguales entre si intercalados con otras secuencias de ADN de apariencia normal a los que llamó espaciadores, aunque no fue capaz de descubrir el sentido biológico de estas secuencias<sup>6</sup> (figura 9).

```

TCAAAATGGGAGCGGACTTC TACCGCAGAGCCGGGGAACTCCAAGTGATATCCATCATGCCATCCAGTGCGCC (1,451)
(1,452) CGGTTTATCCCCGTGATGGGGAAACCCAGCGTCAGGCCTGAAACCTGGCTACCGG (1,512)
(1,513) CGGTTTATCCCTGCTGGCGGGGAACCTCGTGGCTACCGG (1,573)
(1,574) CGGTTTATCCCCGTAACCGGGGAACCTCGTAGTCCATTCACCTATGCTGAACCTCC (1,634)
(1,635) CGGTTTATCCCCGTGGCCGGGGAACTCG (1,664)

consensus: CGGTTTATCCCCGT CC CGGGGGAACTC
          AA

```

Figura 9: Estructura encontrada por Ishino con las repeticiones descritas

**FRANCISCO MOJICA**, en un estudio sobre las arqueas en medios muy salinos detectó catorce secuencias idénticas de ADN, repetidas en intervalos regulares y palíndromos, es decir, que se leen igual en ambos sentidos. En 1995 publicó un artículo en la revista Microbiología Molecular usando el término “repeticiones en tandem”, relacionándolas con la replicación celular<sup>7</sup>

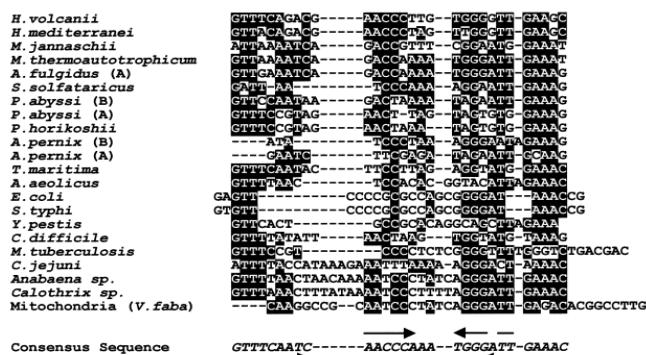


Figura 10: Repeticiones halladas por Mojica

En un segundo artículo ya del 2002 puso de manifiesto la importancia biológica de estas repeticiones en los genomas de Archaea. Las denominó “repeticiones cortas y regularmente espaciadas” (**SRSR**)<sup>8</sup>.

Halló que estas estructuras estaban presentes en algo más del 40% de las bacterias que secuenció y llegaban al 90% en las arqueas (Figura 10).

Posteriormente se le ocurrió el nombre de **CRISPR** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) que actualmente es el empleado con carácter general. Observó que las bacterias con secuencias espaciadoras de CRISPR eran inmunes a la infección de virus que contaban con esas mismas secuencias, mientras que las que no las tenían no. Cuando atacaban nuevos virus, las bacterias que sobrevivían incorporaban parte del ADN de aquellos, transmitiendo a sus descendientes la inmunidad adquirida frente a estos. El estudio de Mojica fue publicado en un artículo que se publicó en el Journal of Molecular Evolution en 2005.<sup>9</sup>

Mojica y otros grupos de investigadores, paralelamente, descubrieron que muchos de los espaciadores en CRISPR eran réplicas del ADN de virus bacterianos conocidos y que había correlación inversa entre el número de secuencias de ADN similares al ADN viral en las CRISPR de una bacteria y el número de virus que podían infectar esa bacteria. Esto apuntaba a CRISPR como parte de un sistema inmune de arqueas y bacterias que les permitía combatir a los virus.

En este sentido otro equipo de investigadores en 2006 publicó un artículo sugiriendo que CRISPR era el equivalente bacteriano del ARN interferente. Según este estudio el sistema CRISPR-Cas (CASS) funciona como una vacuna<sup>10</sup>.

- “El análisis genómico comparativo de los genes CRISPR y cas conduce a la hipótesis de que el sistema CRISPR-Cas (CASS) es un mecanismo de defensa contra los fagos y plásmidos invasores que funciona de manera análoga a los sistemas de interferencia de ARN eucariota (ARNi)”

Posteriormente en un artículo publicado en Science en 2008 se probó que las moléculas de ARN estaban involucradas en la defensa antiviral de CRISPR<sup>11</sup> coordinando las fases de reconocimiento y destrucción en la respuesta antiviral de las bacterias y que esto era común a distintos microorganismos, indicando cierta universalidad. En el artículo mostraban la manera en que se producían las moléculas de ARN de CRISPR en la célula:

1. La bacteria transformaba la serie entera de CRISPR en cadenas largas de ARN coincidentes con la secuencia de ADN de CRISPR, letra por letra.
2. Una enzima las troceaba en cadenas más cortas de longitud uniforme y cuya única diferencia era la secuencia de los espaciadores.

De esta forma estas largas cadenas daban lugar a una serie de cadenas cortas que se almacenaban en una especie de biblioteca demostrando que el ARN de CRISPR desempeña un papel esencial en el sistema inmune bacteriano.

## 9.2. CRISPR. DESCIFRANDO EL CÓDIGO

Conocido todo lo anterior, los siguientes retos fueron averiguar:

1. La forma en que las bacterias adquieren trozos de ADN del genoma del fago y los añaden con precisión entre las repeticiones de CRISPR
2. Cómo las largas cadenas de moléculas del ARN producidas a partir de CRISPR en la célula se convierten en trozos más pequeños que contienen una única secuencia coincidente con la del virus.
3. Cómo un trozo de ARN puede aparearse con el ADN semejante del fago y destruirlo.

Para responder a estas cuestiones otro equipo de investigadores demostró en 2010 que el ADN del fago reconocido por el sistema CRISPR era cortado justo en la secuencia que coincidía con la del ARN de CRISPR<sup>12</sup> y que destruir el fago en la bacteria dependía de que estuvieran presentes ciertos genes cas específicos.

Se determinaron dos grupos principales, que han sido expuestas anteriormente, si bien hoy se cuentan tres:

- **CRISPR-CAS DE TIPO I:** En los sistemas bacterianos **E. coli** y **P. aeruginosa** necesitaban muchas proteínas Cas para reconocer el ADN del fago y otra llamada **Cas3** para destruirlo.
- **II. CRISPR-CAS DE TIPO II:** encontrado en **S. thermophilus** (bacteria del yogur), una enzima cortaba el ADN distinta que **Cas 3** en el punto exacto en que coincidían las letras del genoma vírico con las letras del ARN de CRISPR aunque en ese momento no estaba identificada.

### 9.3. EMMANUELLE CHARPENTIER

Presento en 2011 un artículo en la revista Nature sobre el sistema inmune **CRISPR de Tipo II** en una bacteria llamada **Streptococcus pyogenes**<sup>13</sup>. En él intentaba determinar la forma en que el sistema CRISPR de Tipo II de Streptococcus pyogenes cortaba el ADN viral. Su investigación apuntaba un gen llamado **csn1 (Cas9)** que resultó ser un elemento clave de la fase de destrucción del ADN durante la respuesta inmune de los sistemas CRISPR de Tipo II (figura 11).

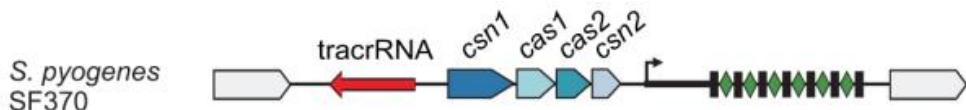


Figura 11: Csn1 y ARNtracr en el artículo de Emmanuelle Charpentier

En el incluía el ARN de CRISPR y además un segundo tipo de ARN (**ARNtracr**) necesario para producir los ARN de CRISPR en *S. pyogenes*, observando como Cas9 cortaba el ADN usando estas dos moléculas de ARN.

Determinó Charpentier que estas cadenas de ADN resultaban cortadas en la misma posición relativa respecto a la del ARN de CRISPR y observó además como las moléculas del ARN de CRISPR y ARNtracr se mantienen invariables y por tanto la proteína Cas9 puede utilizarlas repetidamente para determinar la secuencia que debe cortar.

### 9.4. EL EXPERIMENTO DE JENNIFER A. DOUDNA Y EL ARTICULO CONJUNTO

Esta investigadora utilizó un gen de medusa llamado «proteína verde fluorescente» (en inglés Green Fluorescent Protein, **GFP**). Su equipo generó con cinco secuencias distintas de 20 letras otras tantas moléculas de ARN coincidentes con ellas. Prepararon la guías de ARN y una vez incubados con Cas9 y con el ADN de GFP, este fue cortado en los sitios programados<sup>14</sup>.

Tras este experimento redactó junto a **Emmanuelle Charpentier** un artículo de investigación publicado en la revista Science en 2012. El artículo se centró en explicar la función de CRISPR en la defensa antiviral de *S. pyogenes* proponiendo una metodología alternativa basada en Cas9 programada por ARN para la detección de secuencias específicas de ADN y la edición del genoma<sup>15</sup>.

En el artículo se detalla como en los sistemas CRISPR/Cas de tipo II, Cas9 se guía por una estructura de dos ARN formada por tracrRNA y crRNA o bien mediante un ARN químero único para escindir el ADN en el sitio específico (figura 12).

Este hallazgo les hizo merecedoras del premio Nobel de medicina en 2020.

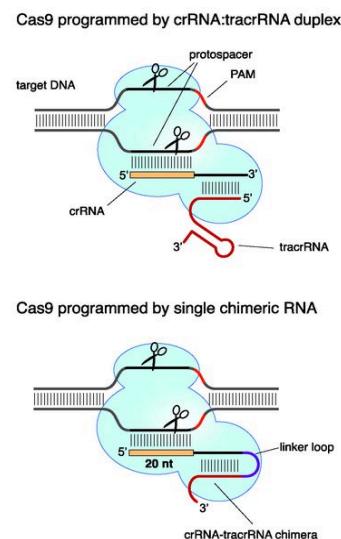


Figura 12:

## 10. CRISPR EN MEDICINA

La utilización de la técnica CRISPR en medicina pasa en primer lugar por crear modelos celulares y animales con enfermedades de tipo genético, estudiarlos fisiopatológicamente y de esta forma poder llegar a plantear posibles terapias génicas en ellos.

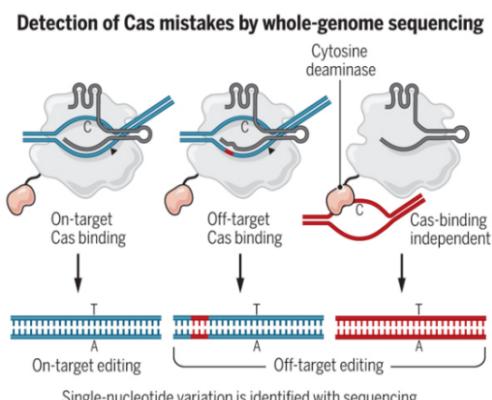
### 10.1. INTERVENIR EN CÉLULAS SOMÁTICAS O EN GERMINALES

- **Las células germinales** son aquellas cuyo genoma es hereditario y constituyen la línea germinal de cada organismo. Se incluye en ellas a los progenitores de células sexuales maduras, así como a las células madre del embrión en las primeras fases del desarrollo
- **Las células somáticas** son el resto de las que tenemos en el organismo y cuyo ADN no se transmite a la descendencia. Aunque todas las células posean una mutación de ADN causante enfermedad, los síntomas se manifiestan habitualmente solo en aquellos tejidos donde la función normal del gen mutado es más importante. Éticamente, su edición es menos conflictiva, aunque esto supone una complejidad mayor.

### 10.2. EDICIÓN GÉNICA IN VIVO Y EDICIÓN GÉNICA EX VIVO

- **IN VIVO:** CRISPR es administrada de forma directa al paciente en un punto concreto de su cuerpo para que realice su cometido. El vector de administración suele ser un virus que generalmente ha sido diseñado en laboratorio con la función de transportar ADN, pero sin infectar al huésped. El más empleado es el **virus adeno-asociado (AAV)**
- **EX VIVO:** las células se extraen del paciente, son editadas fuera del cuerpo y luego se reintroducen en él. La terapia ex vivo resulta un método más sencillo de llevar a cabo y pueden ser sometidas estas células a un análisis de control de calidad más riguroso.

### 10.3. EL PELIGRO DE LAS MUTACIONES NO DESEADAS



**Figura 13:** identificación de “mismatches”

Los sistemas CRISPR-Cas como herramienta programable de edición genómica tienen un obstáculo, la escisión del ADN fuera del objetivo que puede generar mutaciones no deseadas, conocidas en inglés como “**off-target**”.

La especificidad de CRISPR/Cas9 es definida por la capacidad de reconocer una secuencia de 20 nucleótidos guiada por el sgRNA en el ADN del fago y sus PAM adyacentes. Se pueden tolerar un máximo de tres errores en el emparejamiento (conocidos como “**mismatch**”). Si se supera esta cifra se pueden dar efectos “off target” (Figura 13).

Es un problema relevante en la aplicación clínica de CRISPR pues incrementa el riesgo de mutagénesis y la aparición de efectos adversos especialmente la **activación de oncogenes** en las células. Estas mutaciones en el ADN resultan irreversibles y pueden hacerse permanentes al reproducirse esta primera célula editada. Para evitarlo se ha desarrollado una variedad de variantes de Cas9 de alta fidelidad con mayor especificidad en el sgRNA para poder efectuar cortes con mayor precisión y mejoras en los sistemas de entrega de CRISPR-Cas.

## 10.4. INVESTIGACIONES EN ENFERMEDADES HUMANAS

### 10.4.1. CANCER.

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad. Su origen **son las mutaciones de ADN**, heredadas o adquiridas a lo largo de la vida y que resultan ocultadas en cantidad de mutaciones sin responsabilidad en la enfermedad.

Actualmente CRISPR está contribuyendo directamente en el tratamiento del cáncer y como sistema de apoyo a otras terapias existentes. Para ello se deben identificar objetivos moleculares específicos con el fin de diseñar medicamentos que combatan los genes causantes de que las células malignas proliferen con el fin de inducir la apoptosis en las células tumorales. Se trata de localizar mutaciones que incapaciten el cáncer y sirvan de diana en tratamientos de quimioterapia cuyo inconveniente suele ser la falta de orientación específica y la resistencia a los fármacos quimioterapéuticos.

Se muestran varios artículos científicos relacionados con la investigación del cáncer utilizando la técnica CRISPR:

1. El sistema CRISPR-Cas9 se puede usar para eliminar el gen de la **leucemia de células mieloídes-1 (MCL-1)**, de la familia de genes del linfoma de células B2 (BCL-2) y en células de linfoma de Burkitt humano (BL) para la inducción de la apoptosis en las células BL en modelos de ratón<sup>16</sup> ya que MCL-1 interfiere en la apoptosis.
2. Las **quinasas dependientes de ciclina (CDK)** son reguladores esenciales del ciclo celular. Por ello, la activación desregulada de las CDK puede conducir a la aparición de tumores. Hay varios ensayos sobre el silenciamiento de distintos genes CDK
  - **gen CDK11** en el tratamiento del osteosarcoma humano *in vitro*.<sup>17</sup>
  - **gen CDK7** en el tratamiento de **células de cáncer de mama triple negativo** en un modelo de ratón<sup>18</sup>.
3. La **resistencia a los fármacos quimioterapéuticos** depende de un gen implicado en resistencia a múltiples fármacos (**MDR**) y que codifica para la glicoproteína P de la bomba de salida de membrana. La sobreexpresión de MDR es responsable de que no entren o salgan los medicamentos quimioterapéuticos contra el cáncer en las células. Se ha podido comprobar que la eliminación de MDR mediada por CRISPR-Cas9 en líneas celulares de osteosarcoma humano *in vitro* restaura la sensibilidad hacia los fármacos quimioterapéuticos<sup>19</sup>.
4. **SHC La proteína de unión al dominio SH2 1 (SHCBP1)** perteneciente a la familia de homólogos de colágeno es fundamental para la regulación de la proliferación celular. Dado que existe **sobreexpresión del gen SHCBP1** en varias enfermedades, especialmente el cáncer, puede ser un objetivo terapéutico potencial, así como un biomarcador de diagnóstico adecuado para el cáncer. Se ha demostrado que la desactivación del gen SHCBP1 mediada por CRISPR-Cas9 podría inhibir la proliferación de células cancerosas e inducir la apoptosis en células de mama<sup>20</sup>.
5. **La familia de genes tipo Kelch (KLHL)** codifica un grupo de proteínas que están relacionadas con varias enfermedades humanas, junto con el cáncer. La inactivación mediada por CRISPR-Cas9 del gen Kelch que contiene el dominio 4 (KLHDC4) en una línea celular de **carcinoma nasofaríngeo** inhibe considerablemente la migración y el crecimiento de las células cancerosas, e induce la apoptosis tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*<sup>21</sup>.
6. La tecnología CRISPR-Cas9 también se utiliza para generar modelos de ratón con **leucemia mieloide aguda (LMA)** con un sistema de lesiones genéticas combinatorias al inducir múltiples mutaciones en los genes, así como factores de transcripción y señalización de citoquinas en las células madre hematopoyéticas de ratones<sup>22</sup>.

#### 10.4.1.1. INMUNOTERAPIA Y CRISPR (CANCER)

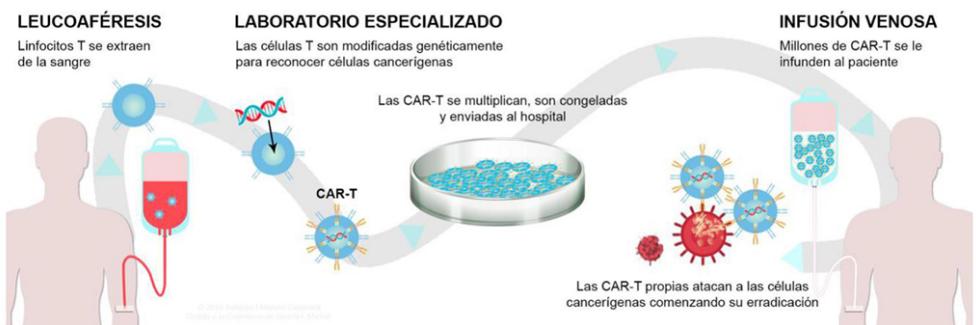


Figura 14: inmunoterapia Crispr

Es una de las principales líneas de tratamiento del cáncer y requiere la generación de células T modificadas genéticamente, diseñadas para atacar el cáncer específico de un paciente mediante un proceso que se conoce como “**transferencia celular adoptiva**” (figura 14). Los ensayos clínicos se han centrado en las terapias de células T con receptor de antígeno químérico (**CAR**) y con receptor de células T modificado genéticamente (**TCR**).

Destacamos dos medicamentos que se están utilizando actualmente en terapia clínica en humanos. Son los medicamentos **Tisagenlecleucel o Kymriah** y el **Axicabtagén ciloleucel (axi-cel) o Yescarta**. Ambos se producen a partir de las células T (células del sistema inmunitario) del paciente. El procedimiento consiste en agregar el gen de un receptor de antígeno químérico (**CAR**) a las células T, dando lugar a las llamadas “**células T con CAR**” que se producen en grandes cantidades y se administran al paciente por infusión. Esto resulta oneroso y suele ser común la linopenia en el paciente. La fabricación de células T universales “off-the-shelf”.es uno de los mayores retos hoy de la inmunoterapia.

Como las células T tienen un gen receptor natural, es necesario inactivarlo para que el nuevo “receptor” sea útil. Aquí es donde actúa CRISPR, noqueando el receptor original y, por lo tanto, dejando un hueco para el nuevo receptor con capacidad de encontrar el cáncer. El receptor CAR se dirige **contra la proteína CD19**, que se encuentra en algunas células leucémicas y de linfoma lo que ayuda al sistema inmunitario del cuerpo a destruir células cancerosas.

Se destacan los siguientes ensayos:

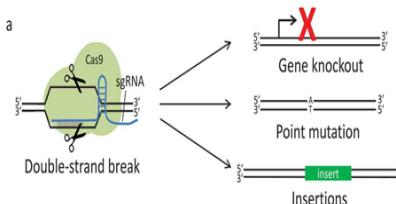
1. El tratamiento con el medicamento **Tisagenlecleucel o Kymriah** para ciertos tipos de **leucemia linfoblástica aguda de células B de personas de 25 años o menos**<sup>23</sup>.
2. Ensayo de fase 1 con **Axicabtagene ciloleucel (axi-cel) o Yescarta** que demostró eficacia en pacientes con **linfoma de células B grandes refractario** después del fracaso de la terapia convencional<sup>24</sup>.
3. Tratamiento para los pacientes con **linfoma difuso de células B grandes** que es refractario a las terapias primarias y de segunda línea o que han recaído después de un trasplante de células madre y tienen un mal pronóstico. La terapia de células T con receptor de antígeno químérico (CAR) **Tisagenlecleucel o Kymriah** se dirige y elimina las células B que expresan CD19 y demostró eficacia contra los linfomas de células B en un estudio de fase 2<sup>25</sup>.

CRISPR se está utilizando asimismo como herramienta de detección para identificar con exactitud qué tipo de cáncer tiene un paciente diseñando herramientas diagnósticas basadas en la CRISPR que se puedan aplicar en tumores para identificar con facilidad las secuencias de ADN que estén asociadas a los diversos tipos de cánceres.

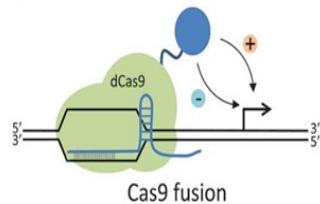
## 10.4.2. ALERGIAS Y TRASTORNOS INMUNITARIOS

La herramienta CRISPR/Cas9 permite lograr diferentes objetivos (Figura 15):

- **Gene Knockout o “noquear genes”:** inactivación de un gen o genes concretos. Esto es útil a la hora de generar organismos knockout, es decir, que presenten dicho gen inactivado y que por tanto sirven como modelo para estudiar la expresión y la función del gen “noqueado”.
- Realizar **edición de bases** concretas en la secuencia
- Realizar **inserciones de secuencias** en el ADN objetivo

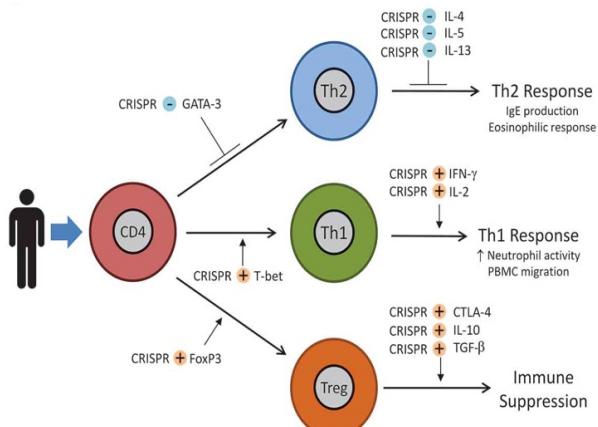


**Figura 15:** Aplicaciones de CRISPR/Cas9



**Figura 16:** Fusión de dCas9 con potenciadores o represores génicos

Es posible modificar Cas9 desactivándolo (dCas9) para que en vez de funcionar como nucleasa de corte, module la expresión génica. Para ello, **dCas9 se puede fusionar con potenciadores o represores génicos** (Figura 16). Mediante este mecanismo es posible **redirigir la diferenciación de las células T CD4 primarias** hacia respuestas T helper 1 (Th1) y T reguladora (Treg), en vez de hacia el fenotipo de respuesta auxiliar Th2, implicado en los mecanismos de las alergias con la producción de IgE y eosinófilos<sup>26</sup>. Para modular la dirección de dicha respuesta inmune es necesario la represión o la inducción de determinados genes implicados en la misma.



**Figura 17:** factores transcripcionales y perfiles de respuesta inmune modulados mediante la herramienta CRISPR

La **represión (signo - azul)** del gen **GATA 3** (que codifica la proteína GATA3, un factor de transcripción importante en el desarrollo de células Th2) e **inducción (signo + naranja)** del gen **FoxP3** (que codifica para la proteína FoxP3, factor de transcripción importante en el desarrollo de células Treg), pueden dirigir la diferenciación inmune hacia respuestas Th1 y Treg. Existen otros genes que codifican para diferentes factores de transcripción que podrían ser también dianas para la modulación de la respuesta inmunitaria (Figura 17).

### 10.4.2.1. EPOC y ASMA

La **eliminación del gen MUC18 o CD146** en células epiteliales de las vías respiratorias nasales primarias (AEC) humanas reduce el nivel de una interleucina proinflamatoria, **IL-8**, cuya respuesta se implica en parte de la patogenia de las reacciones alérgicas y cuya expresión se encuentra aumentada en los macrófagos alveolares de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) mediada por infecciones bacterianas o virales o asma<sup>27</sup>. Para estudiarlo se generan poblaciones de células con el gen MUC18 noqueado (células knockout). Después, para simular una infección microbiana se utilizan agonistas del receptor tipo Toll (TLR). La eliminación del gen MUC18 reduce el nivel de interleucina 8 (IL-8) en respuesta a dicho estímulo.

#### 10.4.2.2. INMUNODEFICIENCIA COMBINADA SEVERA (SCID)

La Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID) puede ser ocasionada por mutaciones en el gen JAK3 entre otros. Esta mutación ocasiona una disminución de células natural killer (NK) y células T circulantes, y cantidades normales de células B que funcionan inadecuadamente.

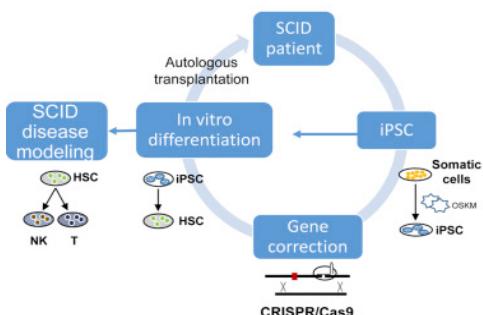


figura 18: CRISPR en SCID

Mediante el uso de células madre pluripotentes del paciente inducidas (iPSC) y un sistema de diferenciación in vitro de células T, es posible la **corrección de la mutación JAK3** mediante la herramienta CRISPR/Cas9 (Figura 18)<sup>28</sup>.

Este **restaura el desarrollo normal de las células T**, incluida la producción de poblaciones de células T maduras con un amplio repertorio de receptores de células T (TCR). Además, la secuenciación del genoma completo de las células corregidas no demuestra modificaciones CRISPR/Cas9 fuera del objetivo.

#### 10.4.3. DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD)

La DMD es un **trastorno ligado al cromosoma X** caracterizado por la debilidad de los músculos proximales. Esta causado por pequeñas **mutaciones en el gen DMD** que provocan ausencia de la proteína distrofina.

Se ha explorado si CRISPR puede utilizarse para editar eficientemente la mutación que causa la muerte temprana de las células musculares en un modelo murino genéticamente destinado a desarrollar la enfermedad (figura 19). En un ensayo de Long et al. editando este gen, se ha evitado que los músculos se degeneren, incluso en ratones que albergan solo un pequeño porcentaje de células corregidas<sup>29</sup>. Esto hace patente que la edición génica CRISPR es capaz de implementar un método para la corrección duradero para la mutación genética DMD y de esta manera cualesquiera otras enfermedades de tipo muscular.

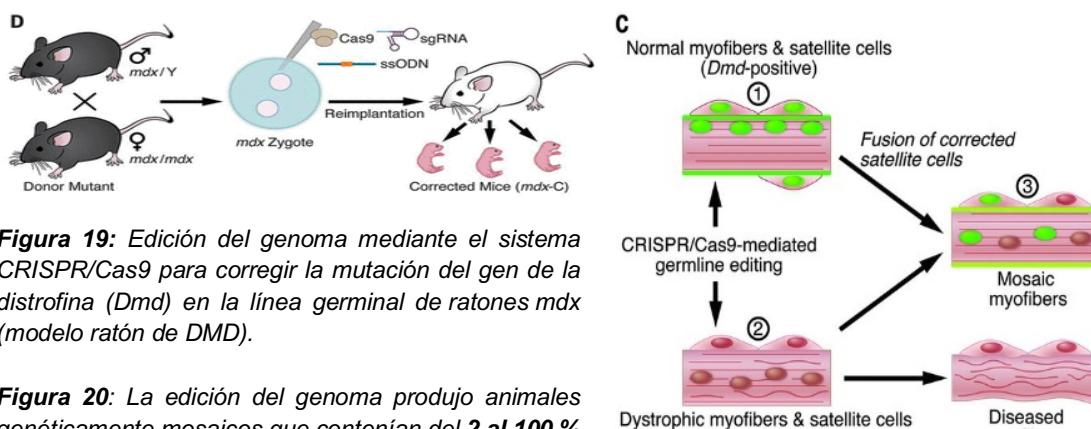


Figura 19: Edición del genoma mediante el sistema CRISPR/Cas9 para corregir la mutación del gen de la distrofina (*Dmd*) en la línea germinal de ratones *mdx* (modelo ratón de DMD).

Figura 20: La edición del genoma produjo animales genéticamente mosaicos que contenían del **2 al 100 % de corrección** del gen *Dmd*

Sin embargo, la edición mediante CRISPR-Cas9 en esta línea germinal da lugar a **organismos mosaicos**, portadores de células con ADN alterado y células con ADN inalterado (figura 20). Pese a que el mosaicismo es intolerable y hace imposible la puesta en marcha de esta terapia en la clínica, este experimento sienta las bases para el desarrollo de futuras terapias para dicha enfermedad.

**Organismos mosaico:** En condiciones normales, cada una de las células de los organismos presenta dos copias del genoma, una de cada progenitor. Sin embargo, los embriones modificados mediante ingeniería génica, por ejemplo, mediante la herramienta CRISPR, presentan alteración en algunas de las copias de su material genético. Por tanto, serán portadores tanto de células alteradas como de células inalteradas. El término “mosaicismo genético”, hace referencia al hecho de que poseen tanto células con ADN alterado, como células con ADN inalterado. Estos organismos mosaico podrán mostrar o no el rasgo de interés. La transmisión o no del mismo dependerá de si sus gametos poseen la versión alterada de material genético, independientemente de que lo expresen fenotípicamente.

#### 10.4.4. TRASTORNOS CARDIOVASCULARES (ECV)

En la actualidad hay varios laboratorios de investigación que están utilizando la herramienta de CRISPR-Cas9 para editar genes involucrados en la ECV. Hasta la fecha lo que se está haciendo es crear modelos animales con deficiencias genéticas concretas para ser estudiados.

Gracias a las pruebas genéticas y los análisis bioinformáticos, podemos identificar sujetos susceptibles a enfermedades cardíacas particulares, aunque en humanos hay límites por el hecho de que el aislamiento y cultivo de cardiomiocitos humanos primarios para la investigación cardiovascular es extremadamente difícil. Se ha demostrado que la tecnología CRISPR/Cas9 es eficaz para editar células madre pluripotentes inducidas (iPSC).

**Se exponen algunos estudios:**

##### 10.4.4.1. HIPERCOLESTEROLEMIA

El gen de la **proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9)** y el gen similar a la angiopoyetina 3 (**ANGPTL3**) parecen tener un papel importante en la regulación de la homeostasis del colesterol. Centrándonos en el primero de los dos, la **proteína PCSK9** ejerce su acción **degradando el receptor de LDL** a nivel sanguíneo impidiendo que estas lipoproteínas sean incorporadas al interior de las células y ocasionando hipercolesterolemia. Por tanto:

- La regulación al alza de los receptores de LDL por **mutaciones de pérdida de función del gen PCSK9** ocasiona un descenso en los niveles de colesterol LDL circulante y por tanto previene de enfermedad coronaria.
- La inhibición de los receptores de LDL por **mutaciones de ganancia de función del gen PCSK9** ocasiona una elevación en los niveles de colesterol LDL circulante, lo cual aumentaría el riesgo de hipercolesterolemia y arterosclerosis asociada.

Se ha estudiado la orientación terapéutica mediada por CRISPR-Cas9 en la edición del gen PCSK9 en ratones. Estos estudios han comprobado que es posible crear modelos ratón de ateroesclerosis mediante la interrupción del gen del receptor de lipoproteínas de baja densidad (Ldlr) por medio de la sobreexpresión del gen PCSK9 con el fin de permitir el estudio de dicha enfermedad<sup>30</sup>.

Estos estudios de la edición de PCSK9 en ratones, tienen una relevancia limitada para una posible terapia de edición de PCSK9 en pacientes humanos. Por ello recientemente, se han realizado estudios que han abordado la eficacia y seguridad de la edición somática *in vivo* en primates no humanos, específicamente monos cynomolgus<sup>31</sup>.

Los resultados de dichos estudios en primates difieren en cuanto al nivel de reducción de colesterol circulante LDL (desde un 14% a un 60 % de reducción de las cifras de LDL). Por lo tanto, parece que el siguiente paso sería la aplicación de la edición en humanos, apagar la actividad del gen y reducir el nivel de colesterol.

#### 10.4.4.2. AMILOIDOSIS POR TRANSTIRETINA.

La **proteína TTR** se expresa en gran medida en los hepatocitos y se secreta en el torrente sanguíneo. TTR funciona normalmente transportando tiroxina y vitamina A en forma de tetramero. Sin embargo, las formas monoméricas mal plegadas de TTR pueden potencialmente formar agregados y acumularse dañando tejidos como el corazón (miocardiopatía) o los nervios (polineuropatía). Se ha demostrado que es posible la reducción de los niveles de proteína TTR en sangre mediante un ARN de interferencia en ratones y primates no humanos. La edición del gen TTR consigue una reducción de los niveles circulantes de TTR superior al 95% al año.

Gillmore et Al. han hecho historia al presentar la primera herramienta de edición del genoma mediante CRISPR en humanos para tratar la amiloidosis por trastiretina (ATTR). **NTLA-2001** es una terapia basada en el sistema CRISPR/Cas9 para la edición in vivo génica cuya diana en la proteína TTR<sup>32</sup>. Tras la realización de estudios preclínicos in vitro e in vivo, se ha iniciado un estudio clínico en fase 1 (aún en curso) basado en la terapia con NTLA-2001. En este estudio se incluyeron 6 pacientes con amiloidosis ATTR hereditaria con polineuropatía, se dividieron en dos grupos en función de las dosis iniciales del agente (0.1mg/kg y 0.3 mg/kg).

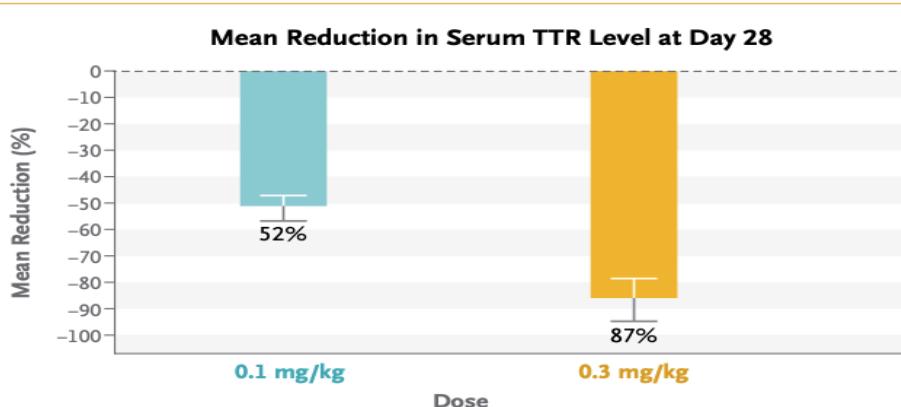


Figura 21

- “Las evaluaciones seriadas de seguridad durante los primeros 28 días después de la infusión en pacientes revelaron pocos eventos adversos, y los que ocurrieron fueron de grado leve. Se observaron efectos farmacodinámicos dependientes de la dosis. En el día 28, la reducción media desde el inicio en la concentración de proteína TTR sérica fue del 52 % (rango, 47 a 56) en el grupo que recibió una dosis de 0,1 mg por kilogramo y fue del 87 % (rango, 80 a 96) en el grupo que recibió una dosis de 0,3 mg por kilogramo”. (Figura 21).

#### 10.4.4.3. DISPLASIA TRICUSPÍDEA

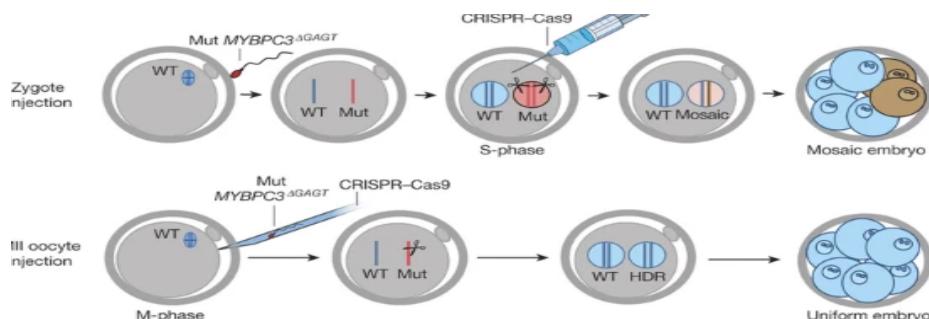
Mediante la edición génica es posible la creación de modelos porcinos para el estudio de enfermedades congénitas como la displasia tricúspidea. Además, los cerdos editados genéticamente constituyen una herramienta de estudio de gran valor por tener un corazón más parecido anatómica y fisiológicamente al humano que el de los ratones. En concreto hay un artículo que refiere a cerdos editados genéticamente generados con **mutación en el modificador de la cromatina SAP130** que les produce **displasia tricúspidea**. El perfil de desarrollo es similar al humano, lo que brinda nuevas oportunidades para estudios preclínicos centrados en mejorar los resultados de las enfermedades cardíacas congénitas<sup>33</sup>.

#### 10.4.4.4. MIOCARDIOPATÍA HIPERTRÓFICA

Es una enfermedad hereditaria que posee una **mutación heterocigota específica en el gen MYBPC3**, responsable de la enfermedad. Un equipo científico ha corregido este gen patógeno en **embriones humanos preimplantacionales** mediante la técnica CRISPR-Cas9.

Como hemos visto anteriormente, uno de los retos que plantea la edición de embrones es el problema de los individuos mosaicos, característica que hace imposible su utilización en la clínica. Sin embargo, en este estudio, mediante la modulación de la fase del ciclo celular en la que se produce la rotura de la doble cadena se ha conseguido **solucionar el problema del mosaicismo**. Para ello, se realiza de forma conjunta la inyección de los espermatozoides y la herramienta CRISPR-Cas9 en los ovocitos durante la Metafase II<sup>34</sup> (Figura 22).

Los embrones editados no han sido implantados en el útero de la madre a pesar de que estaban libres de la enfermedad transmitida por el padre. Se procedió a su destrucción por razones éticas. No obstante, este experimento sienta las bases para la corrección potencial de mutaciones hereditarias en embrones humanos al complementar el diagnóstico genético preimplantacional.

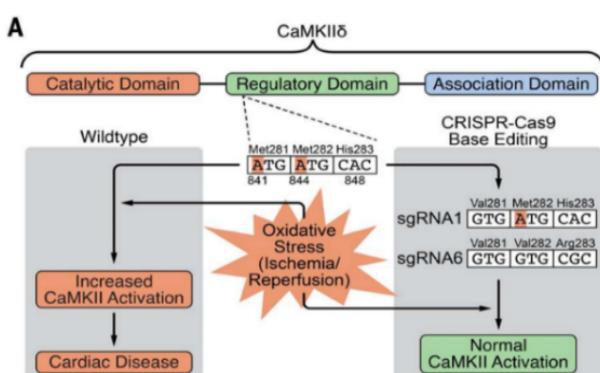


**Figura 22:** La inyección intracitoplasmática simultánea de esperma y la herramienta CRISPR-Cas9 en el ovocito durante la Fase M logra la edición del genoma cuando aún solo contiene una copia mutante y elimina el mosaicismo

#### 10.4.4.5. LESIÓN POR ISQUEMIA/REPERFUSIÓN

Una proteína clave que juega un papel en este daño es la proteína quinasa II $\delta$  dependiente de calmodulina de calcio (**CaMKII $\delta$** ).

Un equipo descubrió que es posible dirigirse a CaMKII $\delta$  mediante CRISPR-Cas9 para proteger el tejido cardíaco del daño por isquemia/reperfusión en modelos de ratón. Posteriormente se ha demostrado que en células madre pluripotentes humanas (iPCS) con edición de CaMKII $\delta$  confiere protección contra la lesión por isquemia/reperfusión<sup>35</sup>. (Figura 23)



**Figura 23:** El daño oxidativo ocasionado por la isquemia-reperfusión en células no modificadas, células de tipo salvaje o Wildtype, ocasiona una activación aumentada de CaMKII $\delta$  y daño cardíaco. Sin embargo, la edición de bases mediante la herramienta CRISPR-Cas9 cambiando las bases adenina (A) por Guanina (G) de la secuencia del gen CaMKII $\delta$  mediante sgRNA1 o sgRNA6 protege a las células cardíacas del daño de isquemia-reperfusión.

#### 10.4.5. DESÓRDENES NEUROLÓGICOS

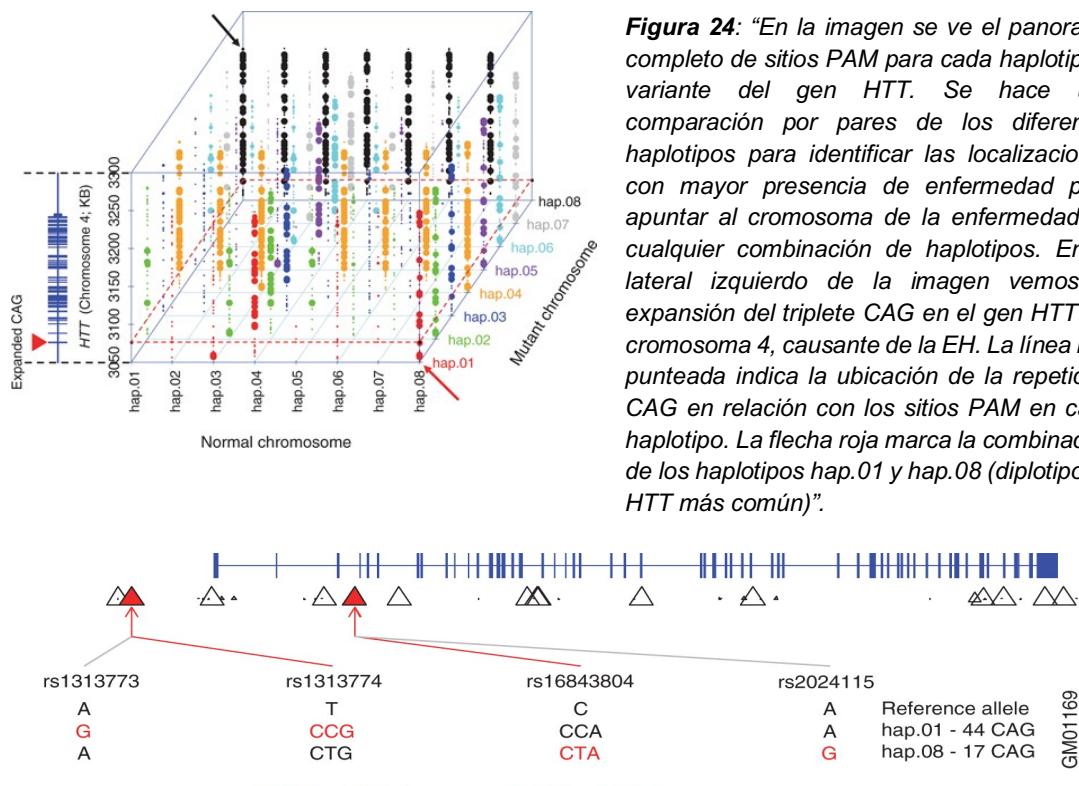
La tecnología de edición de genes CRISPR-Cas9 se puede utilizar como una estrategia eficaz contra los trastornos neurológicos inducidos genéticamente.

##### 11.4.5.1. ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurológico hereditario autosómico dominante causado por la repetición de tripletes CAG en el exón 1 del gen de la huntingtina (HTT). En un trabajo publicado en 2016 los investigadores emplearon la estrategia de inactivar el alelo mutante utilizando CRISPR/Cas9 específicos del haplotipo en la enfermedad de Huntington<sup>36</sup> (figura 24). La estrategia se basaba en:

- Identificación de pares de secuencias PAM (motivos adyacentes al protoespaciador) exclusivos del haplotipo mutante pero ausentes en el haplotipo normal
- Generación de 2 ARN guía específicos para apuntar a esos 2 PAM simultáneamente aumentando así la especificidad.

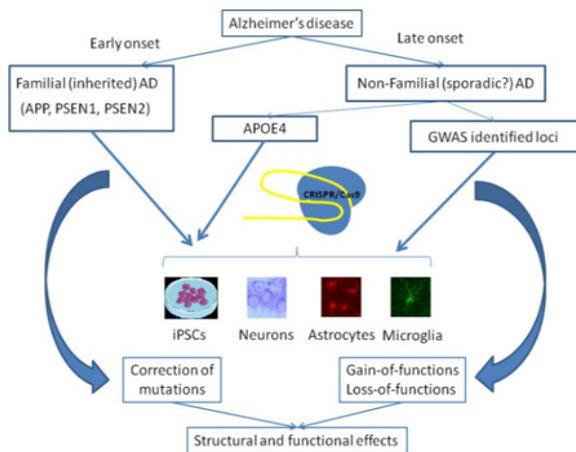
El resultado fue la inactivación completa del alelo mutante sin afectar al alelo normal (figura 25). Esta escisión en el cromosoma de la enfermedad impidió por completo la generación de proteína y ARNm de HTT (gen de la huntingtina) mutante.



**Figura 24:** “En la imagen se ve el panorama completo de sitios PAM para cada haplotipo o variante del gen HTT. Se hace una comparación por pares de los diferentes haplotipos para identificar las localizaciones con mayor presencia de enfermedad para apuntar al cromosoma de la enfermedad en cualquier combinación de haplotipos. En el lateral izquierdo de la imagen vemos la expansión del triplete CAG en el gen HTT del cromosoma 4, causante de la EH. La línea roja punteada indica la ubicación de la repetición CAG en relación con los sitios PAM en cada haplotipo. La flecha roja marca la combinación de los haplotipos hap.01 y hap.08 (diplotipo de HTT más común)”.

**Figura 25:** “Experimento realizado en fibroblastos primarios de un paciente con EH con la combinación de haplotipos hap.01. y hap.08. (diplotipo de HTT más común, ubicación de la repetición CAG). Los triángulos son las localizaciones de cada PAM. Los sitios PAM marcados de color rojo delimitan una región que incluye el promotor y la mutación de interés. Mediante la generación de dos ARN guías específicos para dichos PAM se logró la eliminación mediante CRISPR/Cas9 de la región promotora, el sitio de inicio de la transcripción y los 3 primeros exones de HTT incluyendo la mutación de expansión CAG, responsable de la enfermedad de Huntington”.

#### 10.4.5.2. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)



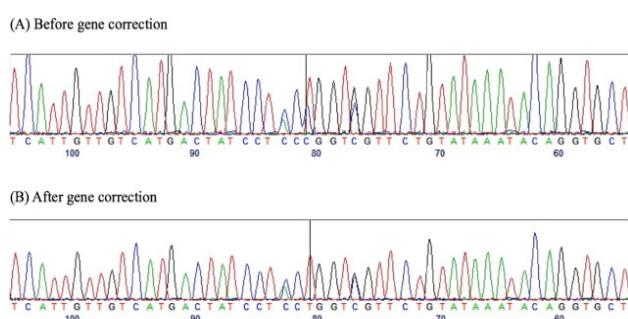
**Figura 26** Principales estrategias del uso de la edición génica CRISPR/Cas9 en los estudios sobre la enfermedad de Alzheimer.

Neurodegenerativa, conduce a la pérdida progresiva de la memoria. La EA es una enfermedad multifactorial y poligénica, por lo que se pueden observar los mismos síntomas clínicos como resultado de la presencia de mutaciones en diferentes genes. Solo una pequeña parte de los pacientes tiene EA familiar causada por mutaciones específicas en los genes de la presenilina 1 (**PSEN1**) y 2 (**PSEN2**) y en el gen APP. Sin embargo, la patogénesis de la EA está asociada con más de 50 loci de genes que son responsables del inicio de la enfermedad, lo que indica que la EA, específicamente la EA de inicio tardío, es una enfermedad de múltiples componentes.

- La EA de inicio temprano** está asociada con algunas mutaciones conocidas en los genes **APP**, **PSEN1** y **PSEN2**. CRISPR/Cas9 se puede aplicar para corregir estas mutaciones en líneas celulares, incluidas iPSC isogénicas, o diferentes tipos de células en el cerebro para examinar las consecuencias estructurales y funcionales de esta terapia.
- El genotipo APOE4** predispone al desarrollo de **EA de inicio tardío** y la corrección de este genotipo puede realizarse mediante CRISPR/Cas9. Además, varias docenas de SNP revelados en GWAS pueden estudiarse por su importancia para la patogenia de la EA de inicio tardío, así como para el funcionamiento normal del cerebro.

La Figura 26 muestra los propósitos generales de la aplicación del sistema CRISPR para la investigación de la EA. En primer lugar, la edición del genoma se utiliza para la corrección de mutaciones bien conocidas, que son responsables de las formas familiares de EA de inicio temprano, y el estudio de las consecuencias de este tratamiento. En segundo lugar, CRISPR/Cas9 es una herramienta adecuada para estudiar las consecuencias de las mutaciones en genes que no son causales para revelar su papel en la fisiología cerebral y la fisiopatología de las formas de EA de inicio tardío.<sup>37</sup>

Las mutaciones en los genes de presenilina 1 (PSEN1) y PSEN2, como se ha dicho, están presentes en la condición de EA familiar. Las mutaciones en el gen de la presenilina 1 (PSEN1) conducen a la forma más agresiva de la enfermedad de Alzheimer (EA) familiar. Los estudios han avalado la corrección de las mutaciones en PSEN1 en una línea de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) derivadas de pacientes con EA por sistema de edición de nucleótidos CRISPR-Cas9<sup>38</sup> como estrategia a seguir. (Figura 27)



**Figura 27.** Secuenciación de PSEN1 para confirmar la corrección génica mediada por CRISPR/Cas9 y ssODN. (A) Secuencia de PSEN1 del paciente antes de la corrección del gen. La línea vertical negra indica el sitio de la mutación puntual donde se detecta el **alelo mutante con el nucleótido "C"** (azul). (B) Secuencia de PSEN1 tras la corrección del gen mostrando el **alelo normal con el nucleótido "T"** (rojo).

## 10.4.6. DESÓRDENES METABÓLICOS

### 10.4.6.1. TIROSINEMIA HEREDITARIA (HT) terapia in vivo

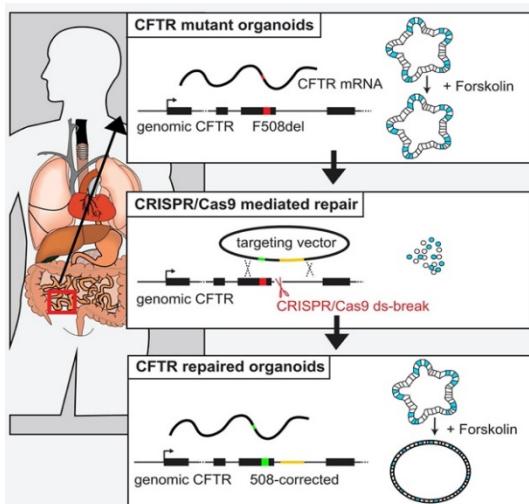
Es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva que se asocia con una deficiencia de la enzima fumarilacetoadetato hidrolasa debido a mutaciones en el gen **Fah**. La **HT tipo I (HTI)** provoca trastornos hepáticos graves, como **cirrosis, insuficiencia y cáncer hepáticos**, debido a la acumulación de toxinas. La HT1, que afecta aproximadamente a 1/100 000 nacidos vivos en todo el mundo, es mortal si no se trata. El trasplante de hígado sigue siendo el único tratamiento curativo, pero presenta sus propias dificultades, incluida la escasez de órganos y la necesidad de inmunosupresión de por vida.

Usando una versión de CRISPR programada para editar un gen diferente y una versión de AAV más adecuada para actuar sobre el hígado, un grupo científico utilizó la edición génica para curar en ratones una mutación genética que causa tirosinemia<sup>39</sup>. Aplicando a un modelo de ratón con tirosinemia hereditaria humana demostraron que el tratamiento genera hepatocitos positivos para Fah al corregir la mutación.

En otro estudio la corrección basada en CRISPR-Cas9 del gen Fah en un modelo de rata HTI mostró la **prevención de la cirrosis hepática** en ratas, ya que los modelos de ratón no desarrollan fibrosis hepática ni cirrosis, que es la manifestación crónica clave de la tirosinemia hereditaria tipo I en los pacientes. Después de recibir terapia de corrección génica mediada por Cas9n, las ratas HTI aumentaron de peso de manera constante y sobrevivieron. Los hepatocitos que expresan Fah ocuparon más del 95% del tejido hepático 9 meses después del tratamiento. Además, la terapia génica mediada por CRISPR/Cas9 evitó la progresión de la cirrosis hepática<sup>40</sup>.

## 10.4.7. FIBROSIS QUÍSTICA

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (**CFTR**), que causa daño a los pulmones y al sistema digestivo.



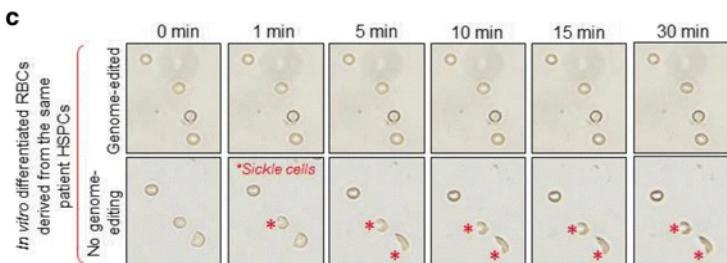
**Figura 28:** Las células con la versión mutante de CFTR, al estímulo con Forskolina (activador del CFTR) no presentan respuesta alguna. Sin embargo, con la corrección de CFTR por la doble rotura ejecutada por el sistema CRISPR-Cas9, al ser estimuladas las células con Forskolina, los organoides aumentaron su superficie por estímulo del CFTR ya funcionante.

Un equipo ha corregido la mutación de **CFTR** en células madre pluripotentes inducidas (iPSC) a través de CRISPR-Cas9 sin mutaciones fuera de objetivo recientemente<sup>41</sup>. En otro estudio anterior, también se ha utilizado el enfoque CRISPR-Cas9 en células madre cultivadas de pacientes con FQ para corregir el gen CFTR<sup>42</sup>(Figura 28). Por lo tanto, la tecnología CRISPR podría ser un enfoque potencial para el tratamiento de la FQ en el futuro.

## 10.4.8. TRASTORNOS RELACIONADOS CON LA SANGRE

### 10.4.8.1. LA ANEMIA DE CÉLULAS FALCIFORMES (SC)

Es un trastorno relacionado con la sangre, está originado por una mutación en el **gen de la globina β** que da como resultado la formación hemoglobina S (HbS). La SC es ocasionada por la mutación de una única letra entre todos los pares de bases del ADN y conduce a una deformación de los glóbulos rojos.



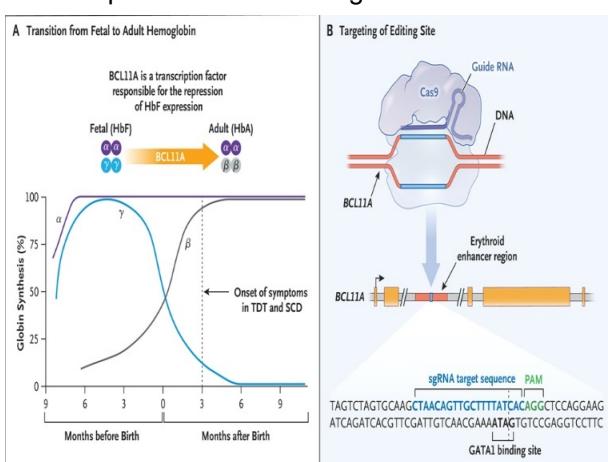
**Figura 29:** La edición del genoma mediante la herramienta CRISPR de la HSPC de los pacientes es capaz de restaurar la función de los glóbulos rojos descendientes clonados.

La SC es una de las mejores candidatas para la edición genética ex vivo porque afecta a células sanguíneas que es posible extraer y reintroducir con facilidad. CRISPR-Cas9 es un método de terapia génica con futuro para la anemia SC. La corrección basada en CRISPR-Cas9 del gen HbS en células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) de sangre de pacientes con enfermedad SC confirma la restitución funcional normal de la hemoglobina<sup>43</sup>(figura 29). En un estudio *in vitro*, los componentes de CRISPR-Cas9 muestran más del 18 % de modificaciones genéticas en células CD34<sup>+</sup>. También reportan corrección de CD34<sup>+</sup>HSPC derivadas de la médula ósea de pacientes con anemia SC a través de la tecnología CRISPR-Cas9<sup>44</sup>.

Ye et al.<sup>45</sup> han creado un genotipo de persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (HPFH) en HSPC normales utilizando CRISPR-Cas9 y han implementado un trasplante autólogo seguro para pacientes con enfermedad SC y β-talasemia.

### 10.3.8.2. CORRECIÓN DE LA BETATALASEMIA

La **talasemia β**, otra enfermedad genética relacionada con la sangre es causada por la disminución de la síntesis de las cadenas de globina β del tetrámero de hemoglobina, lo que reduce la producción de hemoglobina.



**Figura 30**

Científicos de la Universidad Sun Yat-sen (Guangzhou, China) extrapolaron en 2015 la modificación celular a embriones humanos defectuosos e inviables para el nacimiento con el fin de corregir la betatalasemia<sup>46</sup>.

En un estudio más reciente en células madre y progenitoras hematopoyéticas<sup>47</sup> CD34+ obtenidas de donantes sanos se ha comprobado la intervención en un factor de transcripción que reprime la expresión de globina (BCL11A) y la hemoglobina fetal en las células eritroides (figura 30).

El resultado fue que el 80 % de los alelos en este locus se modificaron resultando que más de un año después, los pacientes tenían altos niveles de edición alélica en la médula ósea y la sangre y significativos aumentos en la hemoglobina fetal.

## 10.4.9. TRASTORNOS OCULARES

### 10.4.9.1. LA CEGUERA CONGÉNITA

El objetivo es tratar la **amaurosis congénita de Leber (LCA)**, una de las principales causas de ceguera infantil. Se trata de una enfermedad ocasionada por mutaciones autosómicas recesivas en varios genes, entre ellos el gen RPE65 y el gen CEP290. Estas mutaciones originan un grave déficit visual ocasionado por una grave pérdida de bastones y conos a nivel retiniano o incluso del propio epitelio pigmentario de la retina. En este caso, el procedimiento se lleva a cabo *in vivo* (en el cuerpo del paciente) puesto que las células oculares no se pueden extraer y reintroducir del mismo modo que las de la sangre o la médula ósea.

La primera aplicación del tratamiento fue en marzo de 2020. En el procedimiento, de una hora de duración, los médicos emplearon una diminuta cánula del diámetro de un pelo para inyectar tres gotas de un fluido que contenía CRISPR-Cas9 en la capa formada por células fotosensibles que se encuentra justo debajo de la retina del paciente. Se utilizó un virus modificado para introducir la CRISPR-Cas9 en las células objetivo<sup>48</sup>.

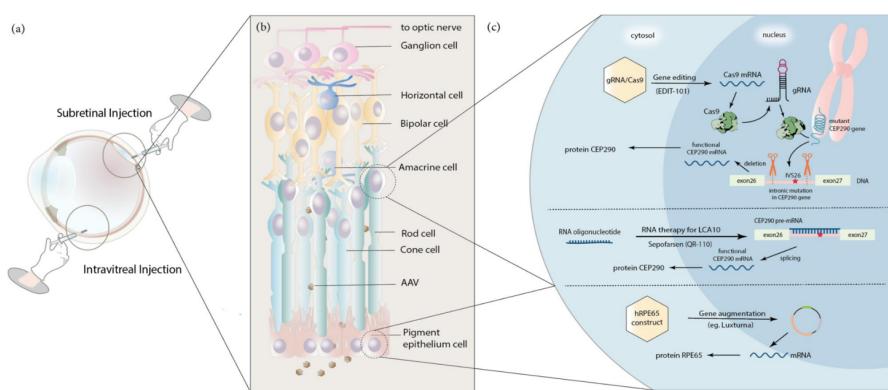


Figura 31: terapias génicas retinianas de la amaurosis congénita de Leber

### Terapias génicas retinianas de la amaurosis congénita de Leber (LCA): (figura 31)

- Terapia de edición de genes (EDIT-101): administración subretiniana del sistema CRISPR-Cas9 por medio de un AAV. Como resultado, se produce la eliminación de la mutación del gen CEP290 y el reempalme de la secuencia resultando una proteína CEP290 normal, implicada en el transporte cilíar intrafotorreceptor.
- Terapia basada en nucleótidos antisentido de ARN (QR-110): administración intravítrea de oligonucleótidos antisentido de ARN dirigidos a la mutación del gen CEP290. Los oligonucleótidos actúan a nivel del ARN mutados produciendo su reempalme.
- Terapia de aumento de genes (Luxturna): administración subretiniana del gen RPE65 sano por medio de una AAV para corregir el efecto de la mutación en el gen RPE65 mutado. Como resultado de este aumento de genes, la proteína RPE65 normal se restablece parcialmente mejorando la visión.

### 10.4.9.2. LA RETINITIS PIGMENTOSA (RP)

Es una distrofia retinal pigmentaria hereditaria que puede causar pérdida de la visión. Existen varias mutaciones asociadas a esta enfermedad, como mutaciones en los genes RP1, rodopsina (RHO) y regulador de RP GTPasa (RPGR).

La técnica de edición de genes CRISPR-Cas9 puede corregir el gen Rho (S334) mediante la inyección subretiniana del plásmido Cas9 de ARN guía (ARNg), lo que mejora la función visual a través de la interrupción de la degeneración retiniana en ratas<sup>49</sup>.

Suzuki et al.<sup>50</sup> han aplicado CRISPR-Cas9 usando el método de inserción dirigida independiente de homología (HGT), que permite la inserción dirigida de un gen en células que no se dividen, para mejorar la función visual usando un modelo de rata con degeneración retiniana (retinitis pigmentosa). Esto sugiere la posibilidad de corrección génica *in vivo* utilizando la tecnología CRISPR-Cas9. Recientemente se ha publicado un artículo que utiliza la edición del gen PDE6 $\beta$  mutante implicado en la retinitis pigmentosa aplicado con éxito *in vivo* en ratones<sup>51</sup>.

#### 10.4.9.3. CATARATAS

Hay varias mutaciones en diferentes loci genéticos que originan cataratas, es decir, opacidad del cristalino. En 2013 se editó el gen Crygc mutante, implicado en el desarrollo de cataratas, primero para crear ratones con esta mutación y luego para reparar ese defecto con cierto éxito en la mayoría de los ratones, pero efectos off-target de hasta 5 loci en algunos de ellos<sup>52</sup>.

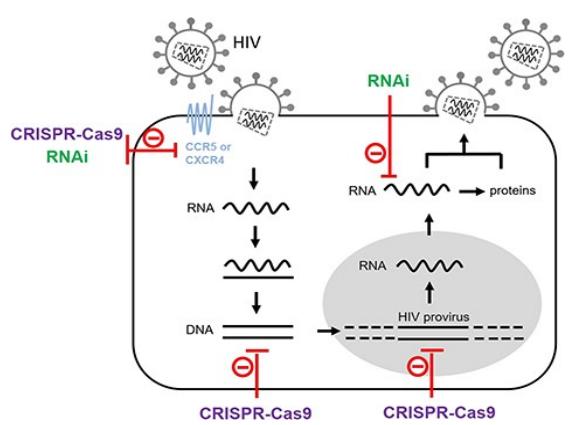
#### 10.4.10. INFECCIONES VIRALES

##### 10.4.10.1. VIH

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un patógeno que ataca el sistema inmunológico, específicamente a las células TCD4+ y es causante del (SIDA) síndrome de inmunodeficiencia adquirida, aunque, hoy mediante terapia antirretroviral es manejable. Se ha observado que la expresión del gen del VIH-1 está influenciada en gran medida por unas repeticiones terminales largas LTR (long terminal repeat), secuencias génicas que se localizan en la parte terminal del genoma de los retrovirus y cuya función es mediar en la regulación de la transcripción de los genes retrovirales y, por tanto, en su virulencia.

Existen diversas variantes de las LTR en los diferentes tipos de VIH-1. Estas variaciones explicarían parte de las diferencias entre las clases de VIH-1 y la progresión de la enfermedad. Por ello, la variación genética en los sitios de unión de los LTR puede alterar la transcripción viral impulsada por LTR<sup>53</sup>.

Un grupo de investigación chino en 2016 trató de editar los genes de embriones triploidiales humanos tempranos con el fin de hacerlos resistentes al Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) mediante la introducción de un alelo en el locus CCR5<sup>54</sup>.



**Figura 32:** Dianas terapéuticas para la terapia mediante CRISPR/Cas9 y ARNai contra el VIH.

Más recientemente (2022) destaca el trabajo de la doctora Elena Herrera Carrillo en la UMC de Ámsterdam, que estudia los nuevos métodos CRISPR-Cas para atacar el genoma integrado del ADN en el VIH, sobre todo centrados en dirigirse a las transcripciones de ARN que codifican los receptores del VIH para bloquear la entrada viral (Fig. 32). Sin embargo, hasta el momento no se ha aprobado ninguna terapia curativa por el riesgo que suponen las modificaciones fuera de objetivo en el genoma humano<sup>55</sup>.

Por otra parte, se están estudiando los lentivirus de la familia del VIH para que, mediante la inactivación de estos, puedan servir de vehículos para la inserción de material genético permanente en las células que se desee editar distinguiéndolos así de los adenovirus.

#### 10.4.10.1.1. LA POLÉMICA DEL EXPERIMENTO DEL DR. HE JIANKUI (LULU Y NANA)

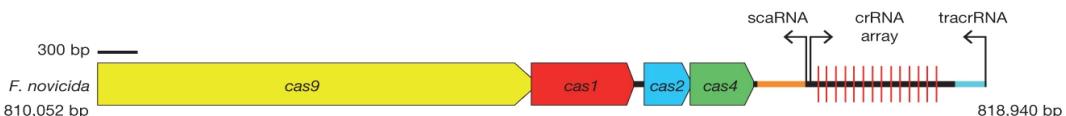
El Dr. He Jiankui en 2018 procedió a la modificación genética de embriones humanos mediante la técnica CRISPR-Cas9 y utilizando la fecundación in vitro. Seleccionó unas parejas fértiles cuyo progenitor masculino era positivo en VIH y consiguió desactivar el gen **CCR5**, receptor que utiliza el virus para entrar en células, logrando la inmunidad en los futuros bebés al virus, pero con tremendas implicaciones éticas. Como consecuencia clínica se ha observado que pacientes con VIH+ sometidos a trasplante de médula ósea de donantes con una mutación espontánea en ambos alelos del gen CCR5 les ha remitido su enfermedad e incluso han llegado a sanar<sup>56</sup>.

#### 10.4.10.2. VIRUS DE LA HEPATITIS B (VHB)

Se ha observado que los ADN circulares cerrados covalentemente (**cccDNA**) del VHB se hayan en las células contaminadas, lo que sugiere que cccDNA es un objetivo terapéutico potencial para tratar la infección por HBV. Recientemente un equipo del Centro de Investigación del Cáncer de Lyon ha demostrado que CRISPR-Cas9 puede degradar el cccDNA del VHB resultando una disminución de la replicación viral<sup>57</sup>. Por lo tanto, se puede sugerir que la interrupción del genoma del VHB a través de la tecnología CRISPR-Cas9 podría ser un enfoque prometedor como terapia contra el VHB.

#### 10.4.10.3. VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)

El **VHC** es un virus de ARN monocatenario (ssRNA), es el agente causal de la hepatitis C, una afección inflamatoria del hígado. Se ha encontrado que la enzima endonucleasa Cas9 de la bacteria Gramnegativa *Francisella novicida*, conocida como FnCas9, puede dirigirse al ARN endógeno<sup>58</sup> (fig.33). Recientemente se ha demostrado que la enzima Cas13 también se dirige eficazmente a los virus ssRNA in vitro, lo que sugiere su potencial como estrategia<sup>59</sup>.



**Figura 33:** CRISPR/Cas de *F. novicida* tipo II. Está formado por **cas9**, **cas1**, **cas2** y **cas4**, la matriz **crRNA** (líneas rojas verticales), **tracrRNA** (azul), **scaRNA** (naranja) y promotores (flechas negras).

#### 10.4.10.4. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

El VPH, un virus de ADN de doble cadena (dsDNA), infecta las células de las mucosas o la piel. Provoca enfermedades de transmisión sexual y representa aproximadamente el 11% de la incidencia mundial de cáncer en mujeres. La endonucleasa guiada por ARN ofrece un enfoque terapéutico contra el VPH mediante la inactivación de los oncogenes E6 o E7 del virus del papiloma humano en células de carcinoma de cuello uterino mediante el uso de una endonucleasa bacteriana guiada por CRISPR/Cas RNA<sup>60 61</sup>. El E6 induce la degradación de p53 (supresores de tumores) y E7 desestabiliza la Rb (proteína del retinoblastoma).

La infección persistente del tipo de bajo riesgo (tipo 6 o tipo 11) del virus del papiloma humano (VPH) es la principal causa de las **verrugas genitales**. El objeto de un estudio fue lograr la inactivación dirigida del oncogén viral E7 mediante la herramienta CRISPR-Cas9 para el tratamiento de las verrugas genitales<sup>62</sup>.

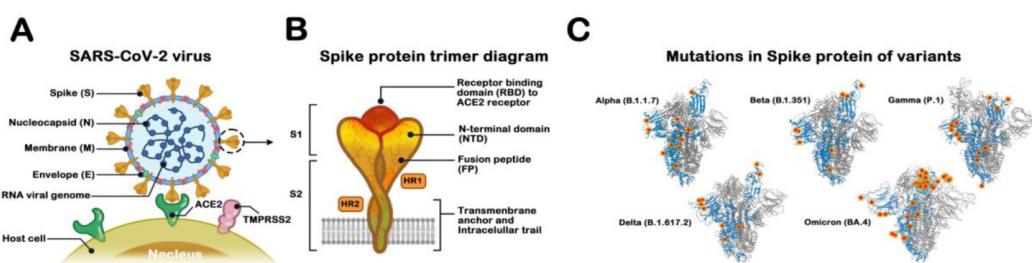
#### 10.4.10.5. VIRUS DE EPSTEIN-BARR (VEB)

El VEB, un virus dsDNA, se propaga principalmente a través de la saliva y causa Mononucleosis infecciosa. La tecnología CRISPR-Cas9 se ha utilizado para la edición del genoma de VEB en células humanas mediante la modificación del gen promotor de **BART** que codifica los microARN virales (miARN)<sup>63</sup>. Estos miARN se encargan de dirigir a los genes virales y celulares para evadir la respuesta inmunitaria y actúan como potenciales carcinogénicos.

#### 10.4.10.6. EL SARS-COV-2

El material genético de los coronavirus se compone de ARN. Una parte de ese ARN en el caso del SARS-CoV-2 codifica para una glicoproteína que está situada en el exterior de la envoltura del virus y que forma la espícula o epítopo S (figura 34). Este determinante antigénico hace las veces de llave si la cerradura fuese el receptor específico situado en la superficie de las células humanas que en el caso de los humanos para el SARS-CoV-2 es la proteína ACE2 que tiene un papel similar la que se ha expresado en este trabajo para la proteína CCR5 en el caso del VIH, una proteína cuya supresión resultó polémica en el experimento del doctor He Jiankui.

Se han logrado vacunas con capacidad para inhibir la entrada del virus en las células que mediante la técnica del ARN mensajero logran actuar contra los epítopos S del virus. Una ventaja del sistema CRISPR-Cas es que puede evaluar e identificar con gran celeridad las nuevas variantes del virus y así desarrollar diagnósticos y posteriormente tratamientos terapéuticos o incluso mediante la edición por CRISPR-Cas.



**Figura 34:** A estructura típica de un virión SARS-CoV-2 B diagrama del homotrimero de la proteína S C distribución de los sitios de mutación en una sola proteína S en diferentes variantes

La herramienta CRISPR-Cas ha permitido en los últimos años<sup>64</sup>:

1. El diseño de nuevos métodos de detección del de SARS-CoV-2 como FELUDA vinculado al editor FnCas9 (FnCAS9 Editor Linked Uniform Detection Assay) capaz de detectar secuencias de nucleótidos, el reportero trans CRISPR dirigido a la endonucleasa de ADN (DETECTR) y el desbloqueo de reportero enzimático específico de alta sensibilidad (SHERLOCK).
2. Crear plataformas de detección de interacción viral-huésped por medio de las cuales es posible identificar los factores celulares esenciales involucrados en la patogénesis, así como las vías clave del ciclo de vida de los coronavirus, incluidos los receptores de entrada de células huésped (ACE2, DPP4)
3. Identificar nuevos genes y factores patógenos implicados en las formas graves

Los sistemas CRISPR-Cas que están actualmente en desarrollo para su uso en la detección de SARS-CoV-2 se basan en las nucleasas Cas9, Cas12 y Cas13<sup>65</sup>. Estas plataformas de detección presentan alta especificidad y capacidad para distinguir diferencias de tan solo un nucleótido y mejoran la sensibilidad diagnóstica, con una actividad mínima fuera del objetivo tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, disminuyen los tiempos de respuesta de diagnóstico a en torno a 40 minutos. La represión o activación selectiva de genes ha permitido identificar nuevos factores del huésped que son críticos para la interacción huésped-patógeno, y que pueden utilizarse para desarrollar terapias antivirales de amplio espectro. Sin embargo, algunos de los problemas y retos aún sin resolver qué se plantean son los efectos fuera del objetivo y que las investigaciones hasta la fecha se han llevado a cabo sobre modelos animales, y se necesitan más estudios en humanos.

#### 10.4.11. XENOTRASPLANTES CRISPR

Las nuevas tecnologías, incluyendo CRISPR, facilitan la generación cerdos con órganos adecuados para el trasplante humano. Los avances previos se han centrado en transferir genes humanos al genoma del cerdo para que los órganos del animal no experimenten rechazo inmune hiperagudo presente en cualquier xenotrasplante.

La edición génica se está utilizando para noquear los genes de cerdo que puedan provocar la respuesta inmune humana y eliminar el riesgo de que virus porcinos dentro en su genoma puedan infectar a los humanos durante el trasplante. Esta investigación está liderada por **George Church**<sup>66</sup>, profesor de Harvard y del MIT, con el fin de acabar con la escasez mundial de órganos para trasplantes editándolos genéticamente para que no transmitan unos virus conocidos como PERV o modificando genes para evitar las reacciones del sistema inmunitario humano contra los órganos transplantados. Recientemente se ha llevado a cabo un trasplante de corazón a un hombre en fase terminal empleando un órgano de cerdo modificado, superando el rechazo agudo en principio, pero muriendo dos meses después<sup>67</sup>.

### 11. CONCLUSIONES

1. Nos encontramos ante la que posiblemente sea la mayor revolución científica de la década y posiblemente del siglo actual. La edición génica mediante CRISPR/Cas fue precedida por otras técnicas como la edición mediante vectores vírales, la recombinación homóloga o la edición con ZFN o TALEN. Sin embargo, la edición génica mediante los sistemas CRISPR/Cas constituye una herramienta capaz de reconocer con mayor especificidad secuencias de material genético, cortarlas y reprogramarse para posteriormente para dirigirse así hacia nuevos objetivos.
2. El sistema CRISPR/Cas9 está constituido por una estructura de ARN dual, formada por un ARNcr y un ARNtrac, unida a una nucleasa Cas9. Gracias al dominio nucleasa, este sistema es capaz de efectuar dobles roturas en el ADN objetivo diana, guiado por el ARNcr y detonado por la presencia de una secuencia PAM contigua a ADN diana.
3. La posibilidad de programación del ARN guía para que dirija la maquinaria de edición hacia secuencias concretas del ADN, así como su versatilidad y eficiencia, convierten al sistema CRISPR en herramienta de edición y selección génica con un inmenso potencial. Además, la extensa biblioteca de sgRNA abre las puertas a la identificación de nuevas dianas farmacológica, así como la edición y regulación de la expresión génica.
4. La facilidad con la que CRISPR puede crear DSB en lugares concretos del genoma humano ha posibilitado la rápida implementación de esta herramienta para el estudio y tratamiento de enfermedades y trastornos genéticos. Sin embargo, el uso de las herramientas CRISPR tiene aún sus limitaciones. Algunos de los principales desafíos son la entrega *in vivo* de dicha herramienta en los tejidos diana y los eventos fuera de objetivo. Se plantea la necesidad de aumentar la precisión y especificidad de las guías de ARN, la creación de nuevas nucleasas Cas, así como sistemas de restricción de los sistemas CRISPR, o la utilización de formas de edición no basadas en la DSB sino en editores de base, por ejemplo.
5. Pese a los grandes avances que se han realizado en este ámbito, aún existe posibilidad de mejora tanto en la especificidad de la técnica, como el desarrollo de nuevas aplicaciones de esta. Existe mucho margen de mejora todavía y un vasto mar de posibilidades de aplicación.

## 12. ABREVIATURAS

<b>AAV:</b> Virus Adeno-Asociado	<b>HDR:</b> (Homology-Directed Repair): Recombinación homóloga directa
<b>ACT:</b> Adoptive Cell Transfer	<b>HT:</b> tirosinemia hereditaria
<b>ADN:</b> Ácido desoxirribonucleico	<b>Ipsc:</b> células madre pluripotentes inducidas
<b>AEC:</b> células epiteliales de las vías respiratorias nasales primarias	<b>KLHL:</b> familia de genes tipo Kelch
<b>ARN:</b> Ácido ribonucleico	<b>LCA:</b> amaurosis congénita de Leber
<b>ARNm:</b> Ácido ribonucleico mensajero	<b>LMA:</b> leucemia mieloide aguda
<b>ATTR:</b> amiloidosis por trastiretina	<b>Ldlr:</b> receptor de lipoproteínas de baja densidad
<b>BCL-2:</b> linfoma de células B2	<b>LTR:</b> long terminal reat. repeticiones terminales largas
<b>BL:</b> linfoma de Burkitt humano	<b>MCL-1:</b> leucemia de células mieloídes-1
<b>CAR:</b> receptor de antígeno químérico	<b>MDR:</b> gen de resistencia a múltiples fármacos
<b>CaMKIIβ:</b> proteína quinasa II $\delta$ dependiente de calmodulina de calcio	<b>NLS:</b> señal de localización nuclear
<b>Cas:</b> (CRISPR-associated): genes o proteínas asociados a CRISPR	<b>PAM</b> (Protospacer Adjacent Motif): motivo adyacente al protoespaciador
<b>Cascade ('Cascada')</b> CRISPR-associated complex for antiviral defense	<b>PCSK9:</b> proteína convertasa subtilisina/kexina
<b>CDK:</b> quinasas dependientes de ciclina	<b>PGH:</b> Proyecto Genoma Humano
<b>CFTR:</b> gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística	<b>pre-crARN:</b> precursor del cr-ARN
<b>CRISPR:</b> (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)	<b>RP:</b> retinitis pigmentosa
<b>CRISPR-Cas:</b> CRISPR asociadas a nucleasas Cas	<b>SC:</b> anemia de células falciformes
<b>CRISPRa:</b> CRISPR activador	<b>SCID:</b> inmunodeficiencia combinada severa
<b>CRISPRi:</b> CRISPR represor	<b>sgARN:</b> ARN guía único
<b>crRNA (cr-ARN):</b> ARN transcripto de CRISPR	<b>SHC:</b> La proteína de unión al dominio
<b>dCas:</b> (DeadCas9): Cas9 sin actividad nucleasa.	<b>SNPs:</b> Polimorfismos de un solo nucleótido
<b>DMD:</b> distrofia muscular de Duchenne	<b>SRSR:</b> repeticiones cortas y regularmente espaciadas
<b>DSB:</b> (Double-Strand Break): doble corte en la cadena	<b>TCR:</b> receptor de células T modificadas genéticamente
<b>E. coli:</b> Escherichia coli	<b>TLR:</b> receptor tipo Toll
<b>EH:</b> enfermedad de Huntington	<b>tracr-ARN:</b> ARN transactivador
<b>EA:</b> enfermedad de alzheimer	<b>TALEN</b> (Transcription Activator Like Effector Nucleases): nucleasas tipo activadores de transcripción
<b>EPOC:</b> enfermedad pulmonar obstructiva crónica	<b>VEB:</b> virus de Epstein-Barr
<b>Fok I:</b> Endonucleasa de restricción tipo IIS	<b>VHB:</b> virus de la hepatitis b
<b>FQ:</b> fibrosis quística	<b>VHC:</b> virus de la hepatitis c
<b>GFP:</b> Proteínas de fluorescencia verde	<b>VIH:</b> virus de la inmunodeficiencia humana
<b>GWAS:</b> Genome-wide association study	<b>VPH:</b> virus del papiloma humano
	<b>ZFN</b> (Zinc Finger Nucleases): nucleasas de dedos de zinc

## 13. BIBLIOGRAFÍA

<sup>1</sup> Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature [Internet]. 1953;171(4356):737–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/171737a0>

<sup>2</sup> Folger KR, Wong EA, Wahl G, Capecchi MR. Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. Mol Cell Biol [Internet]. 1982;2(11):1372–87. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.2.11.1372-1387.1982>

<sup>3</sup> Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW. The double-strand-break repair model for recombination. Cell [Internet]. 1983;33(1):25–35. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90331-8](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(83)90331-8)

<sup>4</sup> Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1996;93(3):1156–60. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.3.1156>

<sup>5</sup> Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. Science [Internet]. 2009;326(5959):1509–12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1178811>

<sup>6</sup> Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. J Bacteriol [Internet]. 1987;169(12):5429–33. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>

<sup>7</sup> Mojica FJ, Ferrer C, Juez G, Rodríguez-Valera F. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea Haloferax mediterranei and Haloferax volcanii and could be involved in replicon partitioning. Mol Microbiol [Internet]. 1995;17(1):85–93. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi\\_17010085.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17010085.x)

<sup>8</sup> Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. Mol Microbiol [Internet]. 2000;36(1):244–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>

- 
- <sup>9</sup> Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* [Internet]. 2005;60(2):174–82. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- <sup>10</sup> Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct* [Internet]. 2006;1(1):7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/1745-6150-1-7>
- <sup>11</sup> Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJH, Snijders APL, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* [Internet]. 2008;321(5891):960–4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1159689>
- <sup>12</sup> Garneau JE, Dupuis M-È, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* [Internet]. 2010;468(7320):67–71. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09523>
- <sup>13</sup> Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* [Internet]. 2011;471(7340):602–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09886>
- <sup>14</sup> Doudna JA, Sternberg SH. A crack in creation: gene editing and the unthinkable power to control evolution. Boston, Houghton Mifflin Harcourt; 2017.
- <sup>15</sup> Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* [Internet]. 2012;337(6096):816–21. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1225829>
- <sup>16</sup> Aubrey BJ, Kelly GL, Kueh AJ, Brennan MS, O'Connor L, Milla L, et al. An inducible lentiviral guide RNA platform enables the identification of tumor-essential genes and tumor-promoting mutations in vivo. *Cell Rep* [Internet]. 2015;10(8):1422–32. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.002>
- <sup>17</sup> Feng Y, Sassi S, Shen JK, Yang X, Gao Y, Osaka E, et al. Targeting CDK11 in osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system: CDK11 AND OSTEOSARCOMA. *J Orthop Res* [Internet]. 2015;33(2):199–207. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/jor.22745>
- <sup>18</sup> Wang Y, Zhang T, Kwiatkowski N, Abraham BJ, Lee TI, Xie S, et al. CDK7-dependent transcriptional addiction in triple-negative breast cancer. *Cell* [Internet]. 2015;163(1):174–86. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.063>
- <sup>19</sup> Liu T, Li Z, Zhang Q, Bernstein KDA, Lozano-Calderon S, Choy E, et al. Targeting ABCB1 (MDR1) in multi-drug resistant osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system to reverse drug resistance. *Oncotarget* [Internet]. 2016;7(50):83502–13. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.18633/oncotarget.13148>
- <sup>20</sup> Feng W, Li H-C, Xu K, Chen Y-F, Pan L-Y, Mei Y, et al. SHCBP1 is over-expressed in breast cancer and is important in the proliferation and apoptosis of the human malignant breast cancer cell line. *Gene* [Internet]. 2016;587(1):91–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2016.04.046>
- <sup>21</sup> Lian Y-F, Yuan J, Cui Q, Feng Q-S, Xu M, Bei J-X, et al. Upregulation of KLHDC4 predicts a poor prognosis in human nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One* [Internet]. 2016;11(3):e0152820. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0152820>
- <sup>22</sup> Heckl D, Kowalczyk MS, Yudovich D, Belizaire R, Puram RV, McConkey ME, et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2014;32(9):941–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2951>
- <sup>23</sup> Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2018;378(5):439–48. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1709866>
- <sup>24</sup> Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2017;377(26):2531–44. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1707447>
- <sup>25</sup> Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, et al. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2019;380(1):45–56. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1804980>
- <sup>26</sup> Goodman MA, Moradi Manesh D, Malik P, Rothenberg ME. CRISPR/Cas9 in allergic and immunologic diseases. *Expert Rev Clin Immunol* [Internet]. 2017;13(1):5–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/1744666x.2017.1241711>
- <sup>27</sup> Chu HW, Rios C, Huang C, Wesolowska-Andersen A, Burchard EG, O'Connor BP, et al. CRISPR-Cas9-mediated gene knockout in primary human airway epithelial cells reveals a proinflammatory role for MUC18. *Gene Ther* [Internet]. 2015;22(10):822–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/gt.2015.53>

- 
- <sup>28</sup> Chang C-W, Lai Y-S, Westin E, Khodadadi-Jamayran A, Pawlik KM, Lamb LS Jr, et al. Modeling human severe combined immunodeficiency and correction by CRISPR/Cas9-enhanced gene targeting. *Cell Rep* [Internet]. 2015;12(10):1668–77. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.013>
- <sup>29</sup> Long C, McAnally JR, Shelton JM, Mireault AA, Bassel-Duby R, Olson EN. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science* [Internet]. 2014;345(6201):1184–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1254445>
- <sup>30</sup> Jarrett KE, Lee C, De Giorgi M, Hurley A, Gillard BK, Doerfler AM, et al. Somatic editing of Ldlr with adeno-associated viral-CRISPR is an efficient tool for atherosclerosis research. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2018;38(9):1997–2006. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1161/atvaha.118.311221>
- <sup>31</sup> Musunuru K. CRISPR and cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2023;119(1):79–93. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvac048>
- <sup>32</sup> Gillmore JD, Gane E, Taubel J, Kao J, Fontana M, Maitland ML, et al. CRISPR-Cas9 in vivo gene editing for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2021;385(6):493–502. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa2107454>
- <sup>33</sup> Gabriel GC, Devine W, Redel BK, Whitworth KM, Samuel M, Spate LD, et al. Cardiovascular development and congenital heart disease modeling in the pig. *J Am Heart Assoc* [Internet]. 2021;10(14):e021631. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1161/JAHA.121.021631>
- <sup>34</sup> Ma H, Marti-Gutierrez N, Park S-W, Wu J, Lee Y, Suzuki K, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* [Internet]. 2017;548(7668):413–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature23305>
- <sup>35</sup> Lebek S, Chemello F, Caravia XM, Tan W, Li H, Chen K, et al. Ablation of CaMKII $\delta$  oxidation by CRISPR-Cas9 base editing as a therapy for cardiac disease. *Science* [Internet]. 2023;379(6628):179–85. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1126/science.adc1105>
- <sup>36</sup> Shin JW, Kim K-H, Chao MJ, Atwal RS, Gillis T, MacDonald ME, et al. Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2016;25(20):4566–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddw286>
- <sup>37</sup> Stepanichev M. Gene editing and Alzheimer's disease: Is there light at the end of the tunnel? *Front Genome Ed* [Internet]. 2020;2. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fgeed.2020.00004>
- <sup>38</sup> Poon A, Schmid B, Pires C, Nielsen TT, Hjermind LE, Nielsen JE, et al. Generation of a gene-corrected isogenic control hiPSC line derived from a familial Alzheimer's disease patient carrying a L150P mutation in presenilin 1. *Stem Cell Res* [Internet]. 2016;17(3):466–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2016.09.018>
- <sup>39</sup> VanLith C, Guthman R, Nicolas CT, Allen K, Du Z, Joo DJ, et al. Curative ex vivo hepatocyte-directed gene editing in a mouse model of hereditary tyrosinemia type 1. *Hum Gene Ther* [Internet]. 2018;29(11):1315–26. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2017.252>
- <sup>40</sup> Shao Y, Wang L, Guo N, Wang S, Yang L, Li Y, et al. Cas9-nickase-mediated genome editing corrects hereditary tyrosinemia in rats. *J Biol Chem* [Internet]. 2018;293(18):6883–92. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.ra117.000347>
- <sup>41</sup> Geurts MH, de Poel E, Pleguezuelos-Manzano C, Oka R, Carrillo L, Andersson-Rolf A, et al. Evaluating CRISPR-based prime editing for cancer modeling and CFTR repair in organoids. *Life Sci Alliance* [Internet]. 2021;4(10):e202000940. Available from: <http://dx.doi.org/10.26508/lsa.202000940>
- <sup>42</sup> Schwank G, Koo B-K, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2013;13(6):653–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2013.11.002>
- <sup>43</sup> Wen J, Tao W, Hao S, Zu Y. Cellular function reconstitution of offspring red blood cells cloned from the sickle cell disease patient blood post CRISPR genome editing. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2017;10(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13045-017-0489-9>
- <sup>44</sup> Hoban MD, Lumaquin D, Kuo CY, Romero Z, Long J, Ho M, et al. CRISPR/Cas9-mediated correction of the sickle mutation in human CD34+ cells. *Mol Ther* [Internet]. 2016;24(9):1561–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2016.148>
- <sup>45</sup> Ye L, Wang J, Tan Y, Beyer AI, Xie F, Muench MO, et al. Genome editing using CRISPR-Cas9 to create the HPFH genotype in HSPCs: An approach for treating sickle cell disease and  $\beta$ -thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2016;113(38):10661–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1612075113>
- <sup>46</sup> Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell* [Internet]. 2015;6(5):363–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13238-015-0153-5>
- <sup>47</sup> Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, Chen Y-S, Domm J, Eustace BK, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and  $\beta$ -thalassemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2021;384(3):252–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa2031054>

- 
- <sup>48</sup> Chiu W, Lin T-Y, Chang Y-C, Isahwan-Ahmad Mulyadi Lai H, Lin S-C, Ma C, et al. An update on gene therapy for inherited retinal dystrophy: Experience in Leber Congenital Amaurosis clinical trials. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021;22(9):4534. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22094534>
- <sup>49</sup> Bakondi B, Lv W, Lu B, Jones MK, Tsai Y, Kim KJ, et al. In vivo CRISPR/Cas9 gene editing corrects retinal dystrophy in the S334ter-3 rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Ther* [Internet]. 2016;24(3):556–63. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2015.220>
- <sup>50</sup> Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, Wu J, Zhu J, Kim EJ, et al. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature* [Internet]. 2016;540(7631):144–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature20565>
- <sup>51</sup> Qin H, Zhang W, Zhang S, Feng Y, Xu W, Qi J, et al. Vision rescue via unconstrained in vivo prime editing in degenerating neural retinas. *J Exp Med* [Internet]. 2023;220(5). Available from: <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20220776>
- <sup>52</sup> Wu Y, Liang D, Wang Y, Bai M, Tang W, Bao S, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2013;13(6):659–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2013.10.016>
- <sup>53</sup> Shah S, Alexaki A, Pirrone V, Dahiya S, Nonnemacher MR, Wigdahl B. Functional properties of the HIV-1 long terminal repeat containing single-nucleotide polymorphisms in Sp site III and CCAAT/enhancer binding protein site I. *Virol J* [Internet]. 2014;11(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422x-11-92>
- <sup>54</sup> Kang X, He W, Huang Y, Yu Q, Chen Y, Gao X, et al. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2016;33(5):581–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-016-0710-8>
- <sup>55</sup> Herrera-Carrillo E, Gao Z, Berkhout B. CRISPR therapy towards an HIV cure. *Brief Funct Genomics* [Internet]. 2020;19(3):201–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/bfgp/elz021>
- <sup>56</sup> Gupta RK, Abdul-Jawad S, McCoy LE, Mok HP, Peppa D, Salgado M, et al. HIV-1 remission following CCR5Δ32/Δ32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature* [Internet]. 2019;568(7751):244–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1027-4>
- <sup>57</sup> Martinez MG, Combe E, Inchauspe A, Mangeot PE, Delberghe E, Chapus F, et al. CRISPR-Cas9 targeting of hepatitis B virus covalently closed circular DNA generates transcriptionally active episomal variants. *MBio* [Internet]. 2022;13(2). Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.02888-21>
- <sup>58</sup> Sampson TR, Saroj SD, Llewellyn AC, Tzeng Y-L, Weiss DS. A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature* [Internet]. 2013;497(7448):254–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12048>
- <sup>59</sup> Ashraf MU, Salman HM, Khalid MF, Khan MHF, Anwar S, Afzal S, et al. CRISPR-Cas13a mediated targeting of hepatitis C virus internal-ribosomal entry site (IRES) as an effective antiviral strategy. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2021;136(111239):111239. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111239>
- <sup>60</sup> Kennedy EM, Kornepati AVR, Goldstein M, Bogerd HP, Poling BC, Whisnant AW, et al. Inactivation of the human Papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells by using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided endonuclease. *J Virol* [Internet]. 2014;88(20):11965–72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01879-14>
- <sup>61</sup> Yoshioka T, Saga Y, Urabe M, Uchibori R, Matsubara S, Fujiwara H, et al. CRISPR/Cas9-mediated cervical cancer treatment targeting human papillomavirus E6. *Oncol Lett* [Internet]. 2018; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2018.9815>
- <sup>62</sup> Cai Z-M, Zhang X-J, Liu Y-C. Reprogrammed CRISPR-Cas9 targeting the conserved regions of HPV6/11 E7 genes inhibits proliferation and induces apoptosis in E7-transformed keratinocytes. *Asian J Androl* [Internet]. 2016;18(3):475. Available from: <http://dx.doi.org/10.4103/1008-682x.157399>
- <sup>63</sup> Yuen K-S, Chan C-P, Wong N-HM, Ho C-H, Ho T-H, Lei T, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of Epstein-Barr virus in human cells. *J Gen Virol* [Internet]. 2015;96(3):626–36. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.000012>
- <sup>64</sup> Tang W-F, Tran A-T, Wang L-Y, Horng J-T. SARS-CoV-2 pandemics: An update of CRISPR in diagnosis and host-virus interaction studies. *Biomed J* [Internet]. 2023;46(2):100587. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bj.2023.02.007>
- <sup>65</sup> Xiao H, Hu J, Huang C, Feng W, Liu Y, Kumblathan T, et al. CRISPR techniques and potential for the detection and discrimination of SARS-CoV-2 variants of concern. *Trends Analys Chem* [Internet]. 2023;161(117000):117000. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2023.117000>
- <sup>66</sup> Niu D, Wei H-J, Lin L, George H, Wang T, Lee I-H, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science* [Internet]. 2017;357(6357):1303–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.aan4187>
- <sup>67</sup> Wang W, He W, Ruan Y, Geng Q. First pig-to-human heart transplantation. *Innovation (Camb)* [Internet]. 2022;3(2):100223. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.xinn.2022.100223>