



TRABAJO DE FIN DE GRADO

Herramientas CRISPR-Cas9 y la posible cura de enfermedades genéticas en humanos: el caso de la anemia falciforme

Julia González Sainz

Tutor: José Francisco Ruiz Pérez

Departamento Bioquímica Vegetal y Biología Molecular

Área Bioquímica y Biología Molecular

Julio de 2023, curso 2022-2023



Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

ÍNDICE

ÍNDICE	2
RESUMEN.....	3
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
Estructura y genes que codifican la Hemoglobina.....	5
Hemoglobinopatías	6
Estructura y función de la Hemoglobina S.....	7
OPCIONES TERAPEÚTICAS PALIATIVAS ACTUALES	9
Tratamiento farmacológico.....	9
Terapia de transfusión sanguínea.....	10
Trasplante de células madre hematopoyéticas.....	11
Terapias de adición génica	11
OPCIONES DE EDICIÓN GENÉTICA CON CRISPR-Cas9	12
Corrección de la mutación puntual de la anemia falciforme.....	15
Edición genética para aumentar los niveles de Hemoglobina F.....	18
Transporte de las herramientas CRISPR-Cas9 al interior celular.....	23
CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	24
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

RESUMEN

Con el avance en el conocimiento de las herramientas de edición génica, la posibilidad de producir modificaciones específicas en el genoma está experimentando progresos significativos en las últimas décadas, permitiendo generar posibles tratamientos curativos para enfermedades genéticas que se consideraban irremediables. El sistema CRISPR-Cas9 identificado en bacterias y constituido por un ARN guía (ARNg) y la nucleasa Cas9, ha revolucionado el campo de la edición génica al ser capaz de modificar el genoma de manera precisa, eficiente y sencilla. En el contexto de la anemia falciforme, una enfermedad monogénica causada por una mutación puntual en el gen *HBB*, el sistema CRISPR-Cas9 muestra un gran potencial como posible tratamiento curativo. Esta tecnología permite abordar directamente la causa de la enfermedad, generando un cambio que devuelve a los glóbulos rojos su función normal. En esta revisión bibliográfica, se analizarán las distintas opciones terapéuticas actuales empleadas en el tratamiento de la anemia falciforme y sus posibles efectos, además de una visión general del estado actual de los ensayos clínicos que utilizan la edición genética CRISPR-Cas9 y las posibilidades que nos ofrecen.

Palabras clave: anemia falciforme, edición genética, CRISPR, Cas9, gen *HBB*, hemoglobina S, hemoglobina F, BCL11A

ABSTRACT

With advancements in the understanding of gene editing tools, the ability to produce specific modifications in the genome has experienced significant progress in recent decades, allowing for the generation of potential curative treatments for genetic diseases that were once considered incurable. The CRISPR-Cas9 system, identified in bacteria and consisting of a guide RNA (gRNA) and the Cas9 nuclease, has revolutionized the field of gene editing strategies by being capable of precisely, efficiently, and simply modifying the genome. In the context of sickle cell disease, a monogenic disease caused by a point mutation in the *HBB* gene, the CRISPR-Cas9 system shows great potential as a possible curative treatment. This technology enables direct targeting of the underlying cause of the disease, inducing a change that restores normal function to red blood cells. In this review, we will analyse the different current therapeutic options employed in the treatment of sickle cell disease and their potential effects, and

provide an overview of the current state of clinical trials using CRISPR-Cas9 gene editing and the possibilities it offers.

Keywords: sickle cell disease, genetic editing, CRISPR, Cas9, *HBB* gene, hemoglobin S, hemoglobin F, BCL11A

INTRODUCCIÓN

Los trastornos heredables de la hemoglobina o hemoglobinopatías son las enfermedades monogénicas más comunes del mundo y afectan a millones de personas globalmente. Dentro de este grupo las más extendidas son las talasemias y la anemia falciforme o drepanocítica. Se estima que del 5-7% de la población mundial es portadora de una variante de la hemoglobina alterada (McGann et al., 2017).

La anemia falciforme o anemia drepanocítica (*Sickle Cell Disease, SCD*) es la hemoglobinopatía más relevante globalmente en términos de frecuencia e impacto en la sociedad y ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como prioridad de salud pública a nivel global. Se estima que cada año nacen 300.000 personas afectadas por esta condición genética (Pinto et al., 2019), y diversos estudios han constatado un crecimiento en el impacto global de la enfermedad a lo largo de los años (Harteveld et al., 2022). Se observa una alta prevalencia de la enfermedad en individuos originarios en África subsahariana, la India, Arabia Saudita y países del Mediterráneo, como señala la OMS. Es endémica de estas regiones subtropicales debido a la presencia de la malaria en las mismas. Existen numerosas evidencias que sugieren que los portadores de una sola copia del gen de la hemoglobina mutado son favorecidos en estas regiones por la selección natural ya que estos tienen más probabilidad de sobrevivir a la infección por *Plasmodium falciparum* que los no portadores (Taylor et al., 2012). En países en vías de desarrollo, la mayoría de los afectados a menudo no son diagnosticados y no superan la infancia (Papizan et al., 2021). Con el acceso a una atención médica adecuada, empleando programas de detección temprana y los servicios médicos pertinentes, la esperanza de vida puede sobrepasar actualmente los 50 años de edad (Park et al, 2017).

Este trabajo bibliográfico se centrará específicamente en la anemia falciforme y sus opciones terapéuticas actuales al ser la hemoglobinopatía más frecuente y patológica.

Estructura y genes que codifican la Hemoglobina

La hemoglobina (Hb) es una hemoproteína globular presente en los glóbulos rojos de la sangre de la mayor parte de vertebrados y algunos invertebrados. Tiene una estructura cuaternaria tetramérica, con cuatro subunidades idénticas dos a dos ($\alpha_2\beta_2$) que se asocian entre sí con una simetría diédrica D₂. Cada subunidad contiene un grupo hemo, esencial para llevar a cabo su principal rol fisiológico: transportar el oxígeno (O₂) de los pulmones a los tejidos periféricos (véase figura 1) (Manning et al., 2020).

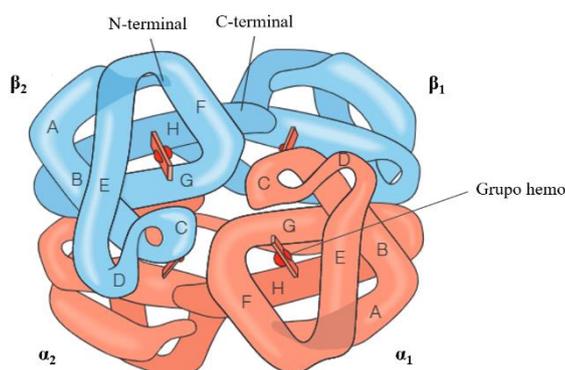


Figura 1. Estructura de la hemoglobina. Contiene dos cadenas α y dos cadenas β idénticas entre sí. Las letras de la A-H señalan las regiones de hélice α . Figura de Mathews et al., 2013.

La hemoglobina es una proteína alostérica que presenta dos estados conformacionales: estado T y R. El estado T (tenso, más contraído y estable debido a la presencia de enlaces salinos más fuertes) es la forma predominante en la proteína desoxigenada, de baja afinidad por el O₂. Cuando se une el ligando al grupo hemo de cada una de las subunidades se produce un cambio conformacional en la estructura cuaternaria pasando a un estado R (relajado, donde los enlaces salinos desaparecen o se atenúan) que es la forma predominante en la hemoglobina oxigenada, de alta afinidad por el O₂. Ambos estados se van alternando, permitiendo así que la hemoglobina se cargue de O₂ en los pulmones y lo libere en los tejidos periféricos desoxigenados de manera eficiente, facilitando el transporte de este gas por la sangre.

Hay varios tipos de hemoglobina en humanos que combinan dos cadenas α (o similares a las α , α -like) y dos cadenas β (o similares a las β , β -like). En humanos las cadenas α están codificadas por dos genes en tándem del locus α (*HBA2*, *HBA1*) en el cromosoma 16, donde también se encuentra el gen *HBZ* que da lugar a las cadenas ζ . Las cadenas β están codificadas por un gen que se encuentra en una agrupación de genes β -like en el cromosoma 11. El clúster contiene los genes ϵ (*HBE1*), $A\gamma$ (*HBG1*), $G\gamma$ (*HBG2*), δ (*HBD*) y β (*HBB*), que se organizan en el orden en el que se expresan durante el

desarrollo embrionario (Thein, 2017). La expresión de estos genes está regulada en los vertebrados por unos elementos *cis* del ADN, llamados LCRs (*locus control region*, en inglés), con unos lugares sensibles a la DNasa I (véase figura 2) (Cui & Douglas, 2017).

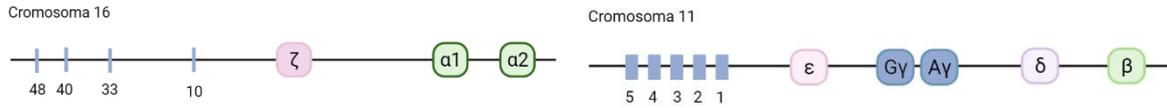


Figura 2. Representación de los loci α y β . Se muestra la organización de los genes y del LCR con sus sitios de hipersensibilidad de la DNasa I. Figura realizada con BioRender.com

HBE1 se expresa en el saco vitelino embrionario y forma un heterodímero con las cadenas ζ (α -like) dando lugar a la hemoglobina embrionaria ($\zeta_2\varepsilon_2$). Con el progreso del desarrollo embrionario el sitio de eritropoyesis pasa a ser el pulmón, y la concentración de cadenas α y γ aumentan al expresarse los genes *HBG2* y *HBG1*, dando lugar a la hemoglobina fetal (HbF, $\alpha_2\gamma_2$). La HbF se deja de producir en el momento del nacimiento donde se reprimen los genes que codifican las cadenas γ y se inicia la expresión del que codifica las cadenas β (gen *HBB*), proceso que se conoce como cambio de la hemoglobina o *hemoglobin switch*. El sitio final donde se producirá la eritropoyesis durante la edad adulta será la médula espinal, donde se produce la hemoglobina adulta (Hb A, $\alpha_2\beta_2$) (Véase figura 3).

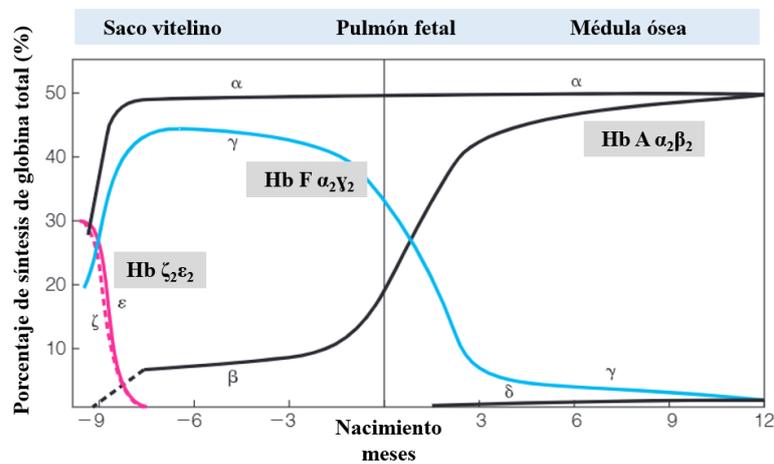


Figura 3. Expresión espaciotemporal de los genes de las cadenas de hemoglobina de los cromosomas 16 y 11 en las distintas fases del desarrollo. De Mathews et al., 2013.

Hemoglobinopatías

Las hemoglobinopatías son trastornos genéticos en los que aparecen defectos cuantitativos o cualitativos en las cadenas de la hemoglobina. Los defectos cuantitativos, conocidos como talasemias, se manifiestan mediante una disminución o ausencia de la

producción de alguna cadena completa que conforma la hemoglobina. Se debe a la herencia de uno o dos alelos patológicos de los genes *HBA1/2* del cromosoma 16 (α -talasemia) o del *HBB* del cromosoma 11 (β -talasemia). En el caso de la α -talasemia, se han descrito más de 120 mutaciones que pueden dar lugar a la síntesis defectuosa de estas cadenas, pero la mayoría de ellas son deleciones que implican longitudes variables del *locus* de α -globina. En cuanto a las β -talasemias se han identificado un total de 250 mutaciones recesivas responsables del trastorno, la mayoría de ellas debidas a mutaciones puntuales como sustituciones de un nucleótido y deleciones o inserciones de un par de bases (Mettananda & Higgs, 2018). Los defectos cualitativos tienen como consecuencia la formación de una estructura anormal en una de las cadenas de la proteína que alteran su función. En este grupo encontramos enfermedades como la anemia hemolítica, policitemia o la anemia falciforme. Una de las variantes de la hemoglobina más relevante desde un punto de vista clínico es la HbS (Harteveld et al., 2022), en la que se produce una mutación puntual en el gen *HBB* del cromosoma 11, que causa anemia falciforme en homocigosis. Otra hemoglobinopatía relevante es la persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal (HPFH, por sus siglas en inglés) en la que se produce una expresión persistente de las cadenas γ y en adultos. No se produce el cambio durante el primer año de vida de cadenas β a γ y mantiene altos niveles de HbF durante toda la vida (Porteus, 2017).

La revisión se centrará en la anemia falciforme y su tratamiento pues se trata de uno de los trastornos heredables de la hemoglobina más comunes y potencialmente más devastador, además de que se están estudiando diversas terapias basadas en herramientas CRISPR-Cas9 muy prometedoras.

Estructura y función de la Hemoglobina S

La configuración usual de la hemoglobina, constituida por dos subunidades α y dos β , es la mayoritaria en individuos adultos (más del 95%, Park & Bao, 2021), de ahí su denominación como hemoglobina A, HbA ($\alpha_2\beta_2$).

Los individuos con anemia falciforme presentan en homocigosis la mutación puntual en el sexto codón del gen *HBB* que será GTG en lugar de GAG, presente en el alelo silvestre. Esto hace que, en la proteína resultante, se reemplace en la sexta posición de las cadenas β un residuo ácido, el Glu, con un residuo hidrofóbico, la Val (Glu6Val). Esta pequeña variación genética resulta en una hemoglobina alterada con respecto a la

original, la hemoglobina S, HbS ($\alpha_2\beta^S_2$). La hemoglobina S presenta unas características bioquímicas particulares: en condiciones de hipoxia, la forma desoxigenada (estado T) del tetrámero de HbS expone al medio acuoso exterior una región conformada por varios residuos de naturaleza hidrofóbica que, en condiciones de normoxia, estarían recluidos en el interior del tetrámero. Las cadenas β^S de diferentes HbS desoxigenadas pueden interactuar entre sí, iniciando una polimerización en el interior de los eritrocitos (Sundd et al., 2019). Los tetrámeros de HbS al polimerizar dan lugar a unas estructuras fibrilares, cuerpos tactoides insolubles, que modifican y deforman por completo la estructura de los glóbulos rojos dándole una forma de hoz, *sickle*, que da nombre a la enfermedad (véase figura 4).

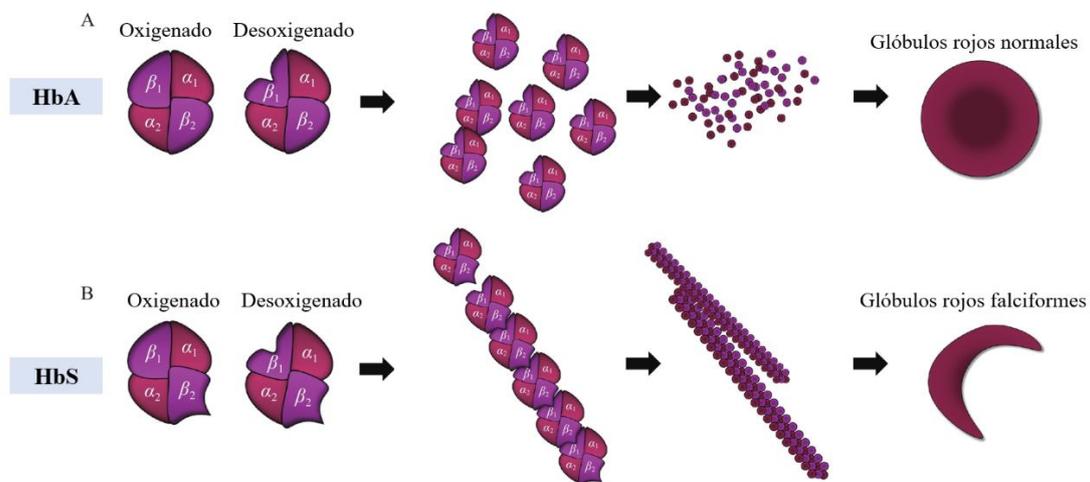


Figura 4. Polimerización de la HbS y formación de los glóbulos rojos con forma de hoz. A: Hemoglobina adulta (HbA) de un individuo sano, que se encuentra en los glóbulos rojos con forma bicóncava. B: Hemoglobina 'sickle' (HbS) de los pacientes con anemia falciforme, se observa una alteración en las cadenas β . Se produce la polimerización de los tetrámeros cuando está desoxigenada, lo que modifica la forma del glóbulo rojo, pasando esta a ser falciforme. Figura modificada de Papizan et al., 2021.

Estos glóbulos rojos alterados en su paso por los capilares sanguíneos sufren hemólisis o provocan una oclusión vascular al adherirse al endotelio y acumularse resultando en multitud de complicaciones clínicas (Papizan et al., 2021). Los pacientes con anemia falciforme sufren con frecuencia crisis por vaso-oclusión (VOCs) (Sundd et al., 2019), lo que lleva a una falta de oxígeno (isquemia) en los tejidos y, por tanto, a una lesión gradual e irreversible de los órganos afectados (riñón, hígado, corazón y pulmón) (Onimoe & Roth, 2020). El daño en el pulmón produce trombocitopenia (disminución de la cantidad de plaquetas circulantes). Los estudios patofisiológicos muestran que los glóbulos rojos alterados deshidratados y densos juegan un papel fundamental en todas estas manifestaciones clínicas que se cronifican y muchas veces producen un daño

irreversible en el organismo (De Franceschi et al., 2011). Debido a la gravedad de la enfermedad y su prevalencia, en los últimos 20 años se han llevado a cabo numerosos esfuerzos con el fin de aliviar la sintomatología de los enfermos, siendo una de las aproximaciones más relevantes la edición genética, que busca restaurar la función habitual de la hemoglobina de los glóbulos rojos en la sangre.

OPCIONES TERAPEÚTICAS PALIATIVAS ACTUALES

Tratamiento farmacológico

A pesar de que la anemia falciforme fue la primera enfermedad molecular de la que se conoció su base genética hace más de 60 años (Ingram, 1957), los tratamientos siguen siendo muy limitados. Hasta 2017, el único tratamiento que se empleaba para la anemia falciforme aprobado por la FDA era la hidroxiurea (HU) (Demirci et al., 2019). Se trata de un inhibidor de la ribonucleótido reductasa (RNR) que provoca varios efectos en el organismo y, en pequeñas dosis, aumenta las concentraciones de HbF, lo que interfiere con la polimerización de la HbS en el eritrocito (Sundd et al., 2019), y, por lo tanto, evita el daño en los glóbulos rojos. Aunque es un tratamiento eficaz para la mayoría de los enfermos, no es capaz de reducir todos los síntomas y el 10-20% de los pacientes no responden al fármaco (Steinberg, 2008). El tratamiento con HU es seguro a corto y largo plazo como demuestra el estudio realizado por Hankins y colaboradores en 2014 donde se realizó un seguimiento de los pacientes con este tratamiento durante 15 años y se observó una reducción de la frecuencia de las crisis de dolor y de las transfusiones sanguíneas (Hankins et al., 2014). Sin embargo, actualmente se limita su uso debido a diversas complicaciones como la mielosupresión y su incapacidad de prevenir la hipertensión pulmonar, principal factor de riesgo que causa muerte temprana en adultos. La L-Glutamina se ha empleado también como tratamiento para la anemia falciforme en pacientes con edades superiores a 5 años. Se ha demostrado que la suplementación con L-Glutamina disminuye la adhesión de los glóbulos rojos alterados al endotelio y la aparición de VOCs, aunque el mecanismo de acción exacto por el que reduce estas crisis de dolor es desconocido (Darbari et al., 2020). Otros tratamientos que han sido aprobados recientemente por la FDA incluyen anticuerpos monoclonales como crizanlizumab. Este anticuerpo reconoce y se une a la glicoproteína P impidiendo su unión al ligando. Esta glicoproteína se expresa en células endoteliales y media la adhesión de los glóbulos rojos al endotelio, por lo que con este tratamiento se reducen las crisis por vaso-oclusión

(Onimoe & Rotz, 2020). Un fármaco alternativo aprobado en 2019 por la FDA es el voxelotor, previamente conocido como GBT440, un modulador alostérico de la hemoglobina que incrementa la afinidad de la proteína por el O₂, estabilizando el estado oxigenado de la misma, e impidiendo la polimerización de la HbS y, por tanto, la producción de glóbulos rojos falciformes (Darbari et al., 2020). Una de las mayores preocupaciones con este tratamiento es que al incrementar la afinidad de la hemoglobina por el O₂, la descarga de este gas en los tejidos desoxigenados también se vea inhibida, lo que podría incrementar el riesgo de accidente cerebrovascular en pacientes crónicos (Glaros et al., 2021). Es por ello que es esencial monitorizar correctamente a los pacientes tratados con voxelotor y no cesar/detener repentinamente el tratamiento.

Todas estas terapias pueden reducir los síntomas que causa la anemia falciforme, pero ninguna de ellas es curativa y los pacientes terminan con un daño en los órganos acumulado. Muchos de los afectados no responden correctamente a estos fármacos y requieren terapias alternativas que permitan paliar los síntomas.

Terapia de transfusión sanguínea

La transfusión sanguínea es el tratamiento principal que se emplea en pacientes con anemia falciforme para reducir el riesgo de complicaciones asociadas a la enfermedad. Esta terapia aumenta los niveles de HbA en los pacientes, haciendo que la concentración de HbS circulante se mantenga inferior al 30% (Chonat & Quinn, 2017). El método de transfusión dependerá del objetivo de la terapia. En un experimento realizado por Adams y colaboradores se demostró que el riesgo de sufrir un primer accidente cerebrovascular se reducía en un 92% con este tratamiento con respecto a un tratamiento estándar en aquellos niños con riesgo de estas complicaciones (Adams et al., 1998). Sin embargo, estas transfusiones no son efectivas con pacientes que ya han tenido previamente algún accidente cerebrovascular (Papizan et al., 2021).

Las transfusiones recurrentes resultan en una serie de complicaciones adicionales como lo son la hemocromatosis por sobrecarga de hierro en la sangre y el riesgo de adquirir infecciones virales, además de tratarse de una terapia costosa. Así mismo, se estima que de un 20% a un 40% de los individuos con anemia que han recibido este tratamiento desarrollan aloanticuerpos contra los antígenos de los glóbulos rojos de donantes (Meier, 2018) y no pueden recibir nuevas transfusiones de las mismas personas. Además, en muchos casos encontrar donantes compatibles es complicado.

Trasplante de células madre hematopoyéticas

El trasplante de médula ósea o trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) era el único procedimiento curativo disponible hasta hace poco. Se trata de un trasplante alógeno donde las células hematopoyéticas del paciente son reemplazadas por las de un donante compatible. Previo al trasplante se administra al paciente receptor un régimen de acondicionamiento como la quimioterapia mieloablativa. El uso de esta terapia se ha visto limitado debido a los riesgos que conlleva como la mortalidad asociada al trasplante (5 al 10%) (Steinberg, 2008), además de complicaciones inmunológicas como enfermedad del injerto contra el huésped o el rechazo del injerto, así como problemas derivados de la quimioterapia mieloablativa como la esterilidad. Aunque con los TCMH la probabilidad de cura puede llegar a ser del 95% (Bernaudin et al., 2017), se reserva únicamente a los pacientes con casos más severos de la enfermedad que no responden a tratamientos alternativos. Además, menos de un 20% de los pacientes tienen un donante histocompatible, solo se han documentado un total de 1000 casos de trasplante de células hematopoyéticas a pacientes con anemia falciforme en todo el mundo (Meier, 2018). Es por este motivo por lo que es esencial explorar terapias alternativas que sean posibles para un espectro más amplio de pacientes y que se enfoquen en curar la anemia falciforme, no solo tratar sus síntomas.

Terapias de adición génica

Se han realizado diversos ensayos preclínicos y clínicos que tratan de introducir por medio de un vector viral una copia funcional del gen de las cadenas β (*HBB*) de la hemoglobina, siendo esta una potencial terapia curativa para pacientes con anemia falciforme. En 2017, se trató el primer paciente con un vector lentiviral, permitiendo la adición estable de un gen *HBB* que no produce los glóbulos rojos falciformes (*anti-sickling*) en células madre hematopoyéticas autólogas (HSCs) (Ribeil et al., 2017). Este gen presenta una sustitución en el residuo 87 de las cadenas β de Thr a Gln ($\beta^{A87}\text{Thr:Gln}$), lo que hace que tenga menos tendencia a contactar con el residuo Val de la posición 6 de las cadenas β de la HbS (Demirci et al., 2018), y por tanto se reduce la polimerización de la HbS. El ensayo clínico de adición génica más exitoso hasta el momento emplea un fármaco llamado LentiGlobin BB305, construido por Kanter et al., y desarrollado por BlueBird Bio (Kanter et al., 2022). El vector lentiviral contiene un plásmido con el gen *HBB anti-sickling* ($\beta^{A87}\text{Thr:Gln}$), que es introducido *ex vivo* en las HSCs extraídas de pacientes con anemia falciforme. Tras la adición del gen, las células modificadas se

introducen de nuevo en los pacientes que previamente han recibido una quimioterapia mieloablativa para contar con suficiente espacio en la médula ósea para las nuevas HSCs. Con este tratamiento se redujo prácticamente por completo la aparición de VOCs, se incrementó la hemoglobina circulante y disminuyó o se eliminó por completo la necesidad de transfusiones sanguíneas (Kanter et al., 2022).

A pesar de las ventajas que ofrece este tratamiento, usar vectores virales tiene unos riesgos asociados, como la posibilidad de generar retrovirus replicativamente competentes (RCR) que puedan infectar otras células o el riesgo de la mutagénesis insercional (Park & Bao, 2021). Además, se debe considerar el costo y la complejidad de una producción a mayor escala de los vectores lentivirales que se requiere para el tratamiento de un alto número de pacientes (Papizan et al., 2021). Es por este motivo por el cual, a pesar de resultar una aproximación prometedora, se requieren estudios de seguimiento de los pacientes para confirmar la seguridad y la durabilidad de la eficacia de este tratamiento como posible cura para pacientes con anemia falciforme.

OPCIONES DE EDICIÓN GENÉTICA CON CRISPR-Cas9

La edición génica es una tecnología que modifica de manera precisa la secuencia del genoma induciendo inserciones, deleciones o sustituciones de bases nitrogenadas. Al estar perfectamente caracterizado el defecto monogénico que causa la anemia falciforme desde su descripción en 1949 (Pauling et al., 1949), este trastorno es un buen candidato para ser tratado con terapias de edición génica. Esta terapia tiene potencial para llegar a ser una cura segura, permanente y disponible para todos los pacientes (Demirci et al., 2019), eliminando dos de los principales inconvenientes de los TCMH: la falta de donantes compatibles y la mortalidad asociada a los trasplantes. Las terapias de edición génica implican la producción de una rotura de doble cadena (DSB, del inglés *double strand DNA breaks*) en un sitio específico del genoma para lo que se emplean nucleasas modificadas mediante ingeniería de proteínas. En un principio, las nucleasas que se empleaban para generar este cambio en el ADN eran las meganucleasas, las nucleasas efectoras activadoras de la transcripción (TALENs) y las nucleasas con dedos de zinc (ZFNs). Programar estas enzimas para que produzcan cortes en puntos concretos del genoma puede ser complejo y requerir de mucho tiempo y experiencia.

En 2012, Doudna y colaboradores presentaron un método de edición génica novedoso basado en un sistema identificado previamente en bacterias al que se denominó

CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* asociado con la nucleasa Cas9) (Wiedenheft et al., 2012; Jinek et al., 2012). El sistema mejor estudiado hasta la fecha se basa en la ribonucleoproteína Cas9. Como su propio nombre indica, el sistema consta de dos componentes: la parte proteica es la nucleasa Cas9 y el ácido nucleico es un ARN guía o *guide RNA* (ARNg). La Cas9 es la proteína multifuncional que forma un complejo con el ARNg y produce en el ADN diana un corte en ambas hebras. En cuanto al ARNg, una fracción de la molécula de unos 20 nucleótidos guía la Cas9 en el genoma al hibridar con la región de interés en el ADN que se encuentra junto a una secuencia PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) cuya secuencia es 5'-NGG-3', donde N es cualquier base nitrogenada seguida de dos guaninas (G), y media la interacción con la proteína Cas9. Otra parte del ARNg presenta una función estructural, al ser la Cas9 una proteína alostérica, la unión con la molécula hace que se active su actividad nucleasa. Hay varios sistemas, que se tratan en apartados posteriores, que permiten el transporte de estas herramientas al interior de las células dependiendo de la aplicación. La revisión se centrará específicamente en el sistema CRISPR-Cas9 de *Streptococcus pyogenes*.

La nucleasa Cas9 presenta dos sitios activos, lo que le permite realizar una rotura de doble cadena en una diana concreta del genoma. Esta lesión activa la maquinaria de reparación endógena de la célula que puede realizarse mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ, *non-homologous end-joining*) o la reparación dirigida por homología (HDR, *homology direct repair*) (véase figura 5). La NHEJ une los extremos libres del ADN creando en el sitio de rotura pequeñas inserciones y deleciones (in/dels). Este mecanismo es impreciso, pero es útil para alterar genes, sitios de unión de otras macromoléculas o motivos específicos del ADN (Papizan et al., 2021), modificando así su expresión. En cambio, la HDR requiere una secuencia no dañada con homología al sitio de corte como molde para guiar la reparación del ADN y recombinar la molécula de nueva síntesis con el sitio de corte. Como resultado de la misma se produce un cambio preciso de los nucleótidos del genoma en una región concreta. El molde puede ser sintetizado con la modificación genética deseada, por lo que nos permite corregir mutaciones puntuales en el genoma. Las secuencias molde pueden ser tanto circulares como lineales, las más empleadas son oligodesoxinucleótidos de cadena simple (ssODNs, del inglés *single-stranded oligodeoxynucleotides*) libres o una secuencia molde empaquetada en vectores adenovirales.

El resultado de la edición genética depende de la elección de la vía de reparación ante la rotura de doble cadena. Los genes editados por HDR son más deseables cuando se requiere la corrección de una mutación de los mismos, ya que garantizan modificaciones precisas y un uso clínico más seguro, pero las células de mamíferos emplean preferentemente NHEJ sobre HDR (Yang et al., 2020). Se están investigando distintas estrategias para favorecer un aumento de la frecuencia de las HDR como introducir más cantidad de ADN molde en la célula (Porteus, 2017). En otras terapias en las que se requiera alterar genes o sitios de unión de factores será preferible la activación de la vía de reparación NHEJ, que no requiere el transporte de un molde exógeno, además de estar activa durante todas las fases del ciclo celular excepto la mitosis, a diferencia de la HDR, solo activa en las fases S y G2 (Métais et al, 2019).

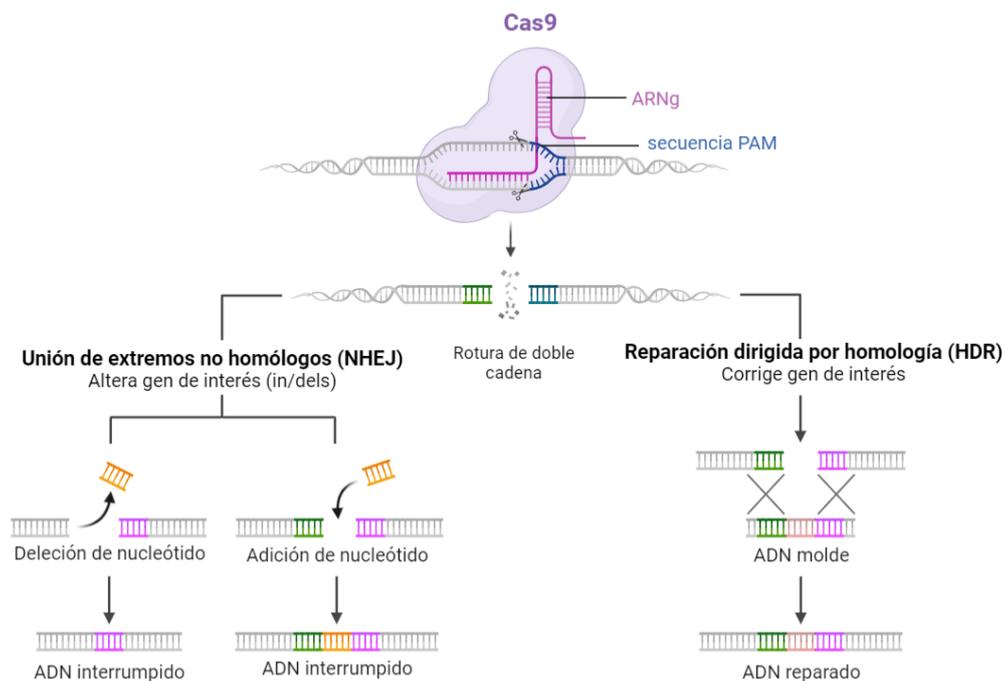


Figura 5. Terapia génica con CRISPR-Cas9. Tras los cortes generados en un punto concreto del genoma por la Cas9 se activa el mecanismo de NHEJ que produce in/dels o el HDR que repara el gen de interés empleando un ADN molde. Creado con BioRender.com

Otra herramienta de edición genética que ha surgido como una extensión del sistema de edición genética con CRISPR-Cas9 son los editores de bases (*base editors*). A diferencia del sistema CRISPR-Cas9 convencional, que emplea nucleasas para producir un corte de doble cadena, los *base editors* permiten una modificación introduciendo mutaciones puntuales en el ADN sin generar ningún corte. Se han desarrollado dos clases principales: los *base editors* de citosina (CBEs, por sus siglas en inglés), que permiten una conversión de C>T y los *base editors* de adenina (ABEs, por sus siglas en inglés),

que generan un cambio A>G. Los CBEs están compuestos por una Cas9 catalíticamente inactiva (dCas9, *catalytically dead Cas9*) o una Cas9 *nickasa* (nCas9) que reconoce la secuencia PAM, un ARNg que hibrida con una de las cadenas y una citosina deaminasa que convierte la C diana en U. Además, fusionado a la Cas9 encontramos un inhibidor de la uracil glicosilasa (UGI), que impide que se produzca la reparación por escisión de bases (BER), permitiendo que el U modificado se mantenga hasta que se produzca la replicación del ADN, donde se reemplaza por una T. Los ABEs están compuestos por una dCas9 o nCas9 junto con el ARNg y un heterodímero de adenosina deaminasa compuesto por dos TadA, una que edita la A del ADN (TadA*) y otra en la versión silvestre (TadA) (Antoniou et al., 2021). Por cuestiones de extensión y al ser la herramienta que se ha desarrollado más recientemente, la revisión no se centrará en esta terapia.

Varias estrategias de terapias génicas empleando la herramienta CRISPR-Cas9 para curar la anemia falciforme han mostrado buenos resultados en estudios preclínicos, como lo son: 1) la corrección de la mutación puntual del gen *HBB*, 2) la inducción la síntesis de la HbF inhibiendo la expresión de los represores de cadenas γ o modificando los sitios de unión de los mismos al ADN. En la revisión se analiza cada una de estas terapias, su fundamento y posibles ensayos que se hayan realizado.

Corrección de la mutación puntual de la anemia falciforme

Al estar el defecto molecular que causa la anemia falciforme tan bien caracterizado, corregir la mutación puntual que causa la enfermedad parece ser el enfoque potencialmente más factible y prometedor de todos. Esta terapia se basa en la posibilidad de la Cas9 de cortar en un punto concreto del genoma dirigida por el ARNg, en concreto sitios cercanos a la mutación del gen *HBB* del cromosoma 11 (Cradick et al., 2013). Esta mutación será reparada por la maquinaria celular tomando como molde la secuencia normal del gen que debe ser aportada exógenamente, dando lugar a una hemoglobina sana. Para asegurar que la corrección que se produzca sea la adecuada, múltiples investigadores han empleado la tecnología CRISPR/Cas9 en diferentes tipos celulares. Como se mencionó anteriormente, El fenotipo de la enfermedad se manifiesta en los glóbulos rojos de los afectados. Los glóbulos rojos sanos tienen una vida media de 120 días, pero los falciformes perduran 20 días aproximadamente, además de no tener ADN

para corregir en su interior. Es por eso que las modificaciones se realizan en las células que se diferencian a los glóbulos rojos.

Se ha tratado de corregir la mutación de las cadenas β *ex vivo*, tanto en células madre hematopoyéticas (HSCs) del paciente como en células madre pluripotentes inducidas (iPSC), que se diferencian en HSCs que puedan injertarse en el paciente. Las HSCs del paciente que se emplean para la edición génica expresan el factor CD34 y pueden ser aisladas de distintas fuentes, como la médula ósea o la sangre periférica (Park & Bao, 2021). Estas células CD34⁺ pueden ser modificadas introduciendo la maquinaria del sistema CRISPR/Cas9 junto con la secuencia molde como ssODN o rAAV6 por electroporación. La Cas9 cortará sitios cercanos al sexto codón del gen *HBB* (GTG) dirigida por el ARNg, donde se encuentra la mutación puntual de la HbS. El corte activará mecanismos de reparación como la HDR, que toma el ssODN o el rAAV6 con la secuencia silvestre (GAG) como molde para guiar la reparación del ADN y revertir la mutación (véase figura 6). Una vez modificadas, las HSCs son inoculadas de nuevo en el paciente, previamente sometido a una quimioterapia mieloablativa. La corrección de la mutación puntual depende de la activación de mecanismos de reparación endógenos, como el HDR ante la rotura de doble cadena producida por la Cas9, y la limitación de las reparaciones mediadas por NHEJ que puedan dar lugar a nuevas mutaciones.

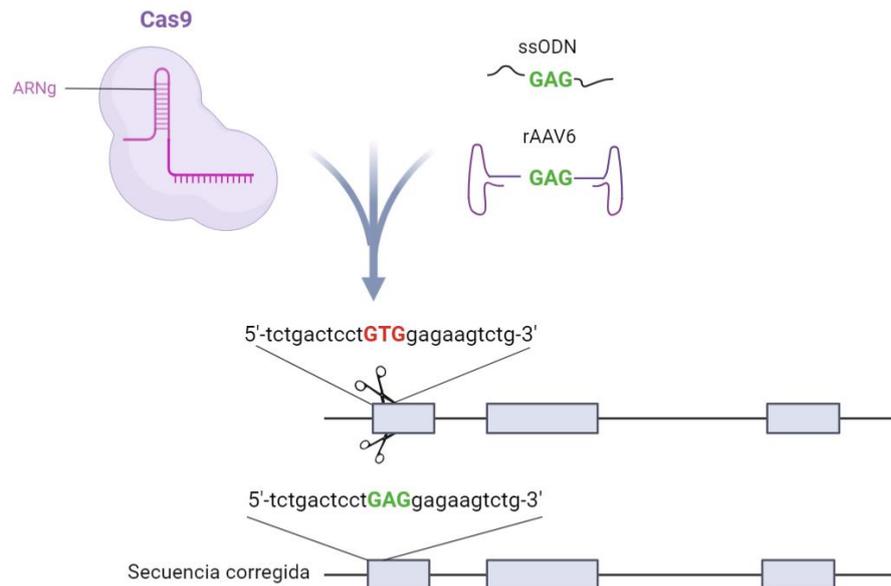


Figura 6. Corrección de la mutación puntual mediante con la herramienta CRISPR-Cas9. Se muestra la región en la que se produce el corte del cromosoma 11 y el molde con la secuencia correcta (ssODN o rAAV6) que se requiere en la reparación via HDR. Se produce un cambio de GTG a GAG. Figura realizada con BioRender.com, modificada de Papizan et al., 2021.

Desde la publicación de un protocolo que permite generar iPSCs a partir de células somáticas adultas en 2006 (Takahashi & Yamanaka, 2006), muchos investigadores han conseguido aplicar estos métodos para obtener HSCs. En las HSCs que provienen de iPSCs los niveles de corrección de la rotura de doble cadena empleando la HDR son muy altos. Para ello es necesario generar HSCs trasplantables que puedan generar nuevos eritrocitos en la médula espinal del paciente con anemia que contengan la HbA con las cadenas β sin alterar. A pesar de los esfuerzos de los estudios de las últimas décadas, no se ha conseguido obtener un método reproducible para generar HSCs que puedan injertarse en el paciente de manera exitosa (Cai et al., 2017). Por el protocolo de diferenciación de las iPSCs a HSCs se producen pocas células, estas realizan una hematopoyesis primitiva que serán diferenciadas en eritrocitos con hemoglobina con cadenas ϵ y γ , con poca cantidad de cadenas β (Demirci et al., 2019). Es por esto por lo que se requiere el desarrollo de un protocolo diferente que permita producir células que se puedan injertar en organismos modelos, con las que además se conseguirían superar problemas asociados a los trasplantes, como el rechazo por parte del paciente o la enfermedad del injerto contra el huésped.

La corrección de esta mutación puntual en HSCs y iPSCs parecen ser enfoques prometedores y se están realizando avances, pero se requieren estudios a largo plazo de los organismos modelos con estos trasplantes para poder determinar el potencial real de estas aplicaciones.

Además, se pueden emplear los *base editors* como los ABEs para modificar la mutación que causa la anemia falciforme del gen *HBB* en células HEK293T, como se realizó en un experimento por Miller y colaboradores (Miller et al., 2020). Con esta tecnología no se puede revertir la mutación que causa la anemia falciforme, ya que no se puede realizar la conversión A>T con los ABEs. Se han estado investigando otras aplicaciones que implican convertir el codón GTG mutado, que codifica una Val, en GCG, que codifica una Ala. Esta modificación produciría un alelo Makassar, con HbG que no es patogénica en individuos homocigotos ni heterocigotos (Antoniou et al., 2021). Esta línea de investigación podría ser interesante, pero se requieren estudios adicionales para evaluar su eficacia y seguridad.

Edición genética para aumentar los niveles de Hemoglobina F

Como se mencionó anteriormente, la HbF es el tipo de hemoglobina predominante en la sangre tras el primer trimestre de gestación y es reemplazada poco después del nacimiento por la HbA. Se produce un cambio en la expresión de los genes que hace que se detenga la producción de cadenas γ , y por tanto de HbF, y se inicie la síntesis de cadenas β , que formarán parte de la HbA, en un proceso conocido como *hemoglobin switch*. Hace más de 70 años, Janet Watson y colaboradores (Watson, 1948) observaron que los recién nacidos con anemia falciforme no mostraban complicaciones durante un periodo de tiempo, fenómeno que se relacionó con los elevados niveles de HbF en la sangre de estos niños. El rol de la HbF en la condición se confirmó con posteriores estudios, que demostraron una disminución de la gravedad de los síntomas asociados a la anemia falciforme en adultos con persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal (HPFH), con niveles elevados de HbF (Topfer et al., 2022). Es por ello por lo que se han realizado múltiples esfuerzos para crear estrategias de edición genética que consigan desreprimir los genes que dan lugar a las cadenas γ , aumentando así los niveles de HbF en pacientes con anemia falciforme y atenuando los síntomas de la enfermedad.

Para comprender la regulación transcripcional de los genes γ y descubrir potenciales dianas terapéuticas, se han empleado varios métodos complementarios, como análisis genéticos de individuos adultos con altos niveles de HbF (HPFH) y estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés). Con los GWAS se identificó en 2008 por primera vez un *locus* fundamental que controla la síntesis de esta hemoglobina, el *BCL11A*, en el cromosoma 2 (Uda et al., 2008). *BCL11A* es un represor transcripcional crucial para el desarrollo del cerebro y el sistema hematopoyético, entre otras funciones. Con respecto al *hemoglobin switch*, este factor interactúa con GATA1, FOG1, SOX1 y el complejo represor NuRD (Antoniani et al., 2018) y se une directamente al motivo TGACCA de los promotores de los genes *HBG1* y *HBG2* (véase la figura 7) (Yin et al., 2019; Shen et al., 2021). Al interactuar con este motivo, silencia los genes *HBG1/2*, por lo que es esencial para el cambio de cadenas γ a β durante la transición de eritropoyesis fetal a adulta. Es por eso que la manipulación genética de este motivo TGACCA impide la unión de *BCL11A* y desreprime los genes *HBG1* y *HBG2*, induciendo la producción de HbF en el adulto (Liu et al., 2018). Es importante señalar que el gen *BCL11A* es un protooncogén cuyas mutaciones causan múltiples leucemias de

linfocitos B, por lo que cualquier aplicación que requiera su modificación debe ser investigada rigurosamente para asegurar su seguridad.

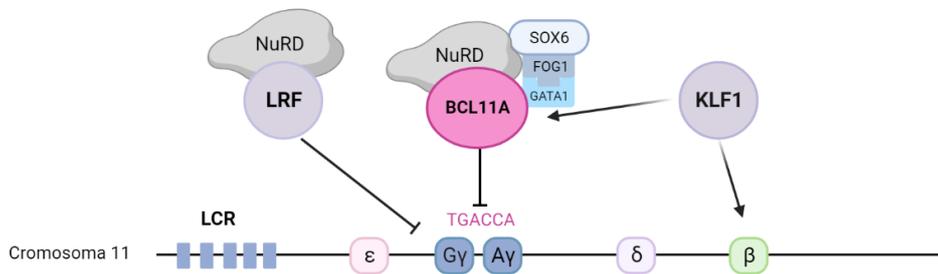


Figura 7. Representación esquemática de la regulación transcripcional de la hemoglobina fetal en el cromosoma 11. El BCL11A interactúa con los factores GATA1, FOG1, SOX1 y el complejo NuRD y se une al motivo TGACCA impidiendo la producción de HbF. Creado con BioRender.com.

Se han desarrollado distintas aproximaciones para inducir la síntesis de HbF en el adulto como lo son: 1) Evitar que los represores transcripcionales se unan a elementos de regulación *cis* del ADN dentro del promotor de las cadenas γ e ϵ 2) inhibir la expresión de BCL11A específicamente en la línea de los eritrocitos.

Con respecto a la primera aplicación, la tecnología CRISPR-Cas9 se puede emplear para producir mutaciones en los promotores de los genes que codifican las cadenas γ que afecten a los sitios de unión de los represores e impidan su interacción. En 2016, Traxler y colaboradores realizaron un ensayo *ex vivo* en el que emplearon la electroporación y un vector lentiviral para transportar la nucleasa Cas9 y dos ARNg diferentes (ARNg-1 y ARNg-2) al núcleo celular. El complejo ribonucleoproteico produce una delección de 13 pb en los promotores de los genes *HBG1* y *HBG2*, reproduciendo mutaciones conocidas que ocurren naturalmente en pacientes con HPFH (Traxler et al., 2016). La Cas9 crea una rotura de doble cadena en los genes *HBG1* y *HBG2* que se repara por medio de la vía NHEJ causando la delección de una región promotor e interrumpiendo el motivo TGACCA, al que se asociaba el represor BCL11A, por lo que impide su unión e induce la síntesis de las cadenas γ (véase figura 8). Esta mutación se realizó en células control y en HSPCs que expresaban CD34 de pacientes con anemia falciforme que se diferenciaron en eritrocitos, y se sometieron a condiciones de hipoxia para inducir la formación de los polímeros de HbS. Se observó un incremento de células F (glóbulos rojos que expresan HbF) del 65% al 90% y se redujo la formación de glóbulos rojos falciformes de un 24% a un 4%. Con esto se demostró que se podían

obtener células CD34⁺ que incrementaran la expresión de cadenas γ en glóbulos rojos *ex vivo*, pero aún debían ser probados en pacientes (Traxler et al., 2016).

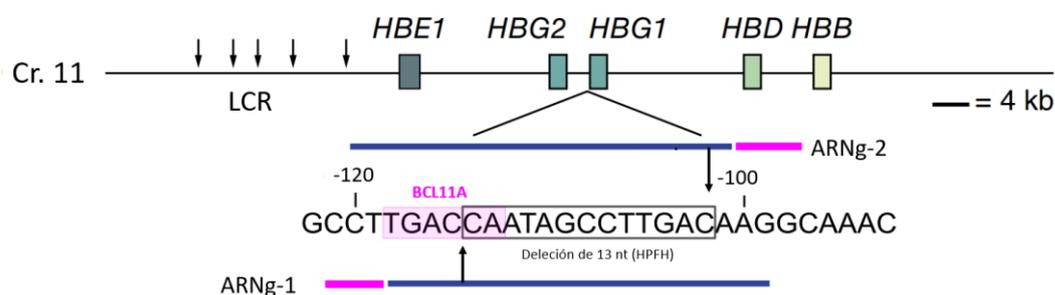


Figura 8. Edición genética de los promotores de los genes *HBG1* y *HBG2* para inducir la síntesis de HbF. Se representa el locus de los genes β con el LCR y los genes de las distintas cadenas de la hemoglobina. Se observan los dos ARNg que forman parte de la RNP con la secuencia PAM (rosa) y los sitios de corte (flechas). La región de 13 nt que se elimina está recuadrada en negro y se representa el sitio de unión del represor *BCL11A* (rosa). Figura modificada de Traxler et al., 2016.

Crear estas deleciones requiere un corte simultáneo en dos zonas separadas del genoma, lo que no es tan eficiente como tener una única diana en el ADN (Demirci et al., 2021). Por este motivo se realizaron posteriormente nuevos ensayos que requirieran un solo corte. En 2019, en un ensayo con un solo ARNg se consiguió realizar un corte *ex vivo* en el ADN e interrumpir el motivo TGACCA del promotor de los genes *HBG1* y *HBG2* (Métais et al., 2019). Las células CD34⁺ de pacientes con anemia falciforme editadas se trasplantaron a ratones inmunodeficientes. Pasadas 16-17 semanas de este proceso se mantuvieron elevados los niveles de HbF y la capacidad de diferenciación de las HPSCs no se vio afectada (Métais et al., 2019; Li et al., 2018). Además, no se detectaron roturas de doble cadena fuera de la diana, la edición no impide la hematopoyesis y como resultado de la misma se produce la inducción de HbF a niveles potencialmente terapéuticos (Métais et al., 2019). Estos estudios preclínicos resultan prometedores al ser seguros y potencialmente eficaces, pero se requieren estudios estrictos a largo plazo en primates no humanos para garantizar la seguridad de la edición de HSPC con herramientas CRISPR/Cas9.

En cuanto a la segunda aplicación, es posible emplear la herramienta CRISPR-Cas9 para generar un modelo *knockout* en los represores de la HbF, en lugar de interrumpir las regiones del promotor a las que se unen estos factores. Varios factores de transcripción son esenciales para la regulación de la expresión de la HbF, como el *BCL11A*, *SCA/TAL1*, *GATA1*, *LRF* o *KLF1* (véase figura 7). Los factores *LRF* o el

KLF1 son importantes represores de las cadenas γ (Ma et al., 2023), pero modificarlos podría dar lugar a otras problemáticas asociadas ya que tienen papeles fundamentales en la eritropoyesis normal (Demirci et al., 2019). Por otra parte, un buen candidato podría ser el BCL11A ya que con los estudios de secuenciación masiva (GWASs) se identificaron una serie de polimorfismos (SNPs) en el gen *BCL11A* que están asociados a una mayor expresión de la HbF (Uda et al., 2008). Aunque al silenciar este gen se pueden obtener elevados niveles de esta proteína, su expresión es también fundamental en otros linajes celulares como los linfocitos B, células pancreáticas y células del sistema nervioso central. En humanos, se observa en individuos con haploinsuficiencia o deleciones en el gen *BCL11A* una elevada expresión de HbF, pero viene acompañada de otras problemáticas como retraso en el desarrollo, poca coordinación motora y el síndrome de Dias-Logan, caracterizado por una discapacidad intelectual (Papizan et al., 2021). Es por esto que la terapia ideal para curar a pacientes con anemia falciforme sería aquella que se enfoque en impedir la expresión del represor BCL11A en la línea eritroide específicamente, respetando sus roles en las otras líneas celulares.

En 2013, Bauer et al. realizaron una investigación exhaustiva del locus del *BCL11A* y encontraron una región concreta en el intrón 2 del gen *BCL11A* que es un potenciador específico de eritrocitos, que supone una diana ideal para la ingeniería genética (Bauer et al., 2013). Posteriormente, se confirmó que esta región se expresaba únicamente en la línea eritroide, ya que al eliminar el potenciador en eritrocitos de ratón se inducía la producción de HbF, y al eliminarlo en una línea celular de pre-linfocitos B la expresión de *BCL11A* permanecía constante (Papizan et al., 2021; Bauer et al., 2013). En 2021, se realizó por primera vez la terapia autóloga CTX001, en la que la herramienta CRISPR-Cas9 actúa sobre el potenciador específico de eritrocitos del gen *BCL11A* de HSPCs extraídas de pacientes con anemia falciforme (Frangoul et al., 2021). La Cas9 crea un corte que será reparado por la vía NHEJ por lo que se generan in/dels en el sitio de unión del factor GATA1, lo que disminuye la expresión del BCL11A exclusivamente en los eritrocitos (véase figura 10). Las células modificadas se trasplantaron a los pacientes previamente sometidos a una terapia mieloablativa y se realizó un seguimiento durante 15 meses, con el que se observó un incremento de HbF, y por tanto de las células F periféricas, y una disminución de HbS a lo largo de los meses (véase figura 9). Además, el injerto era duradero, se detectaron elevados niveles de expresión de HbF y la eliminación de VOCs y la necesidad de transfusiones sanguíneas.

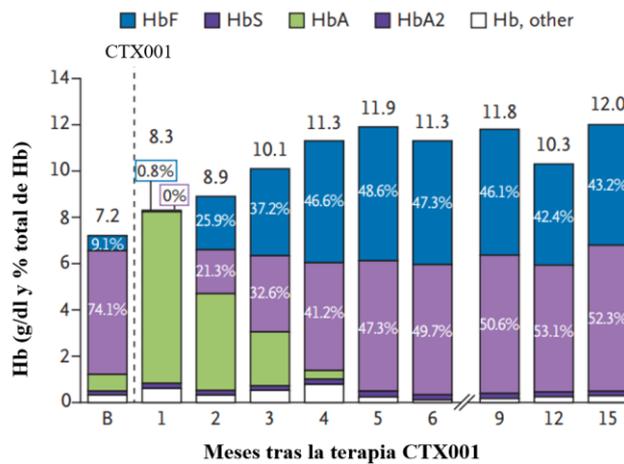


Figura 9. Variación de los niveles de hemoglobina con el tratamiento CTX001. Con respecto a la referencia (B) se observa un aumento gradual y mantenido en la proporción de HbF y una disminución de la HbS tras la edición con CRISPR-Cas9.

Es una terapia que ha sido desarrollado por Vertex Pharmaceuticals y CRISPR Therapeutics y se encuentra en fase I-II de los ensayos clínicos. A pesar de que esta aproximación parece ser muy prometedora, requiere la producción de una lesión en el intrón 2 del *BCL11A* en ambos alelos, lo que puede ser difícil de conseguir y conllevar problemas de seguridad, al existir la posibilidad de causar translocaciones potencialmente oncogénicas. Se requiere un análisis más completo del empleo de la terapia CTX001 con un seguimiento a largo plazo para caracterizar el tratamiento (Frangoul et al., 2021).

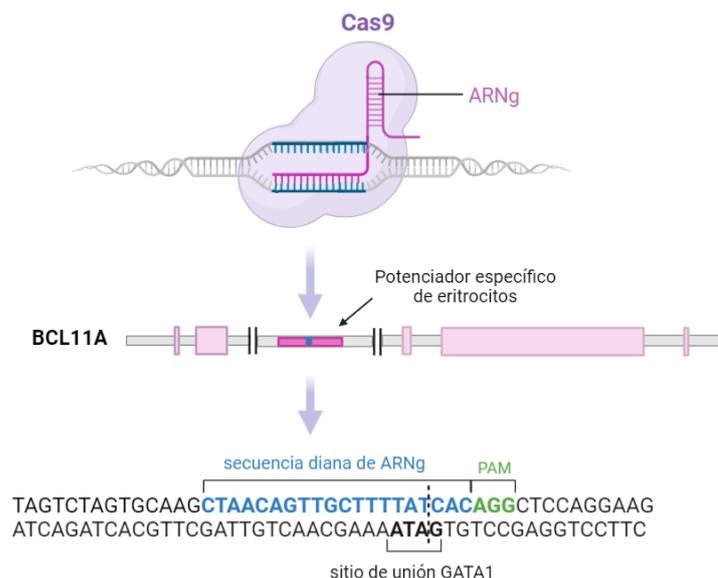


Figura 10. Inducción de la HbF a través del corte del potenciador específico de eritrocitos empleando CRISPR-Cas9. Se observa el gen *BCL11A*, sus cinco exones (cuadrados rosas) y la diana con la que se hibrida el ARNg que guía a la Cas9 al potenciador. Se representa la secuencia PAM y el sitio de unión del factor GATA1, donde se genera el corte. Figura realizada con BioRender.com, modificada de Frangoul et al, 2021.

También se podría conseguir interrumpir el potenciador del *BCL11A* empleando los *base editors*. En un estudio reciente se ha empleado una variante de la ABEs, que se introduce células embrionarias de riñón humano generando dos conversiones de A>G en el potenciador del *BCL11A*. Como resultado, se observó en las células modificadas elevados niveles de expresión de HbF (de hasta un 32%). Este estudio demuestra que, en cultivos de células *in vitro*, los editores de base pueden producir de manera eficiente mutaciones naturales que aumenten los niveles de HbF en células humanas (Richter et al., 2020).

En resumen, el uso de la herramienta de edición genética CRISPR-Cas9 para inducir la síntesis de HbF en adultos muestra un gran potencial como posible enfoque clínico para tratar la anemia falciforme y otras hemoglobinopatías. Se requiere una mayor investigación de la regulación de la expresión esta hemoglobina y un mayor número de ensayos clínicos e investigaciones para asegurar su capacidad curativa.

Transporte de las herramientas CRISPR-Cas9 al interior celular

Muchas de las aproximaciones comentadas pueden suponer una opción terapéutica para los pacientes con anemia falciforme, pero cada uno de los métodos requieren un transporte eficiente y seguro de los componentes del sistema CRISPR-Cas9 al interior de las HSCs. La elección del método de transporte depende en gran medida del propósito de la edición genética y el tipo de célula en la que se quiera introducir. Las terapias que emplean como medio de reparación la NHEJ son más simples y solo requieren el transporte de la Cas9 y el ARNg, pero las mediadas por HDR también requieren del transporte de un molde como el ssODN, lo que puede incrementar el coste y dar lugar a una respuesta inmune (Papizan et al., 2021). Las tecnologías que permiten el transporte se pueden clasificar en físicas, vectores virales o vectores no virales. Para el transporte podemos optar por introducir: 1) plásmidos que expresen los ARNm para el ARNg y la Cas9, 2) ARNm de la Cas9 y del ARNg, o 3) complejos ribonucleoproteicos (RNP) que contengan la proteína Cas9 y el ARNg.

Los vectores empleados en un inicio eran principalmente constructos virales, que son relativamente estables y poco costosos. Estos vectores proporcionan una expresión continua de los ARNs y la Cas9, lo que puede resultar beneficioso, pero también puede aumentar la posibilidad de que se produzcan efectos *off-target*, además de mutagénesis insercional y una elevada inmunogenicidad en muchos casos (Demirci et al., 2019). Se

están realizando múltiples esfuerzos para conseguir superar estas problemáticas como modificaciones por ingeniería para conseguir que sus dianas sean más específicas y que tengan menores problemas de toxicidad. En cuanto al empleo de vectores no virales, su eficiencia es inferior a la de los vectores virales, pero tiene ventajas como que son métodos más seguros, con mayor capacidad de transporte y con posibilidad de transporte específico a la célula diana *in vivo* (Ma et al., 2023). Algunos de los ejemplos de vectores no virales son los polímeros catiónicos, los liposomas (LNPs), exosomas, partículas similares a virus (VLPs) y nanopartículas de oro (AuNPs). Sin embargo, al igual que los vectores virales, estos vectores pueden causar reacciones inmunes que limitan su eficacia produciendo efectos adversos. Con respecto a los métodos físicos de transporte al interior celular, encontramos algunos como la microinyección o la electroporación. La microinyección permite introducir un plásmido de ADN directamente al núcleo de las células o el complejo ribonucleoproteico con el ARNg y la Cas9 al citoplasma. La electroporación es un método de transporte no selectivo que nos sirve para introducir ADN, ARN y/o proteínas en las células produciendo unos poros en la membrana plasmática al someterla a un pulso eléctrico. Este método es muy eficiente transfiriendo la RNP a las HSPCs para corregir la mutación puntual que causa la anemia falciforme. Frangoul y colaboradores, en la terapia CTX001 emplearon la electroporación para transportar el sistema CRISPR-Cas9 que tiene como diana el potenciador específico de eritrocitos del *BCL11A* en pacientes con anemia falciforme y β -talasemia (Fragoul et al., 2021). Este método puede ser eficiente pero también tiene sus riesgos como la posibilidad de dañar la membrana lipídica disminuyendo la actividad celular (Ma et al., 2023).

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS FUTURAS

En esta revisión bibliográfica se han analizado diversas estrategias para el tratamiento de la anemia falciforme y su potencial curativo para mejorar la calidad de vida de los pacientes afectados por esta condición genética.

La herramienta CRISPR-Cas9 es una de las más atractivas en el tratamiento de la anemia falciforme considerando que se trata de una enfermedad monogénica causada por una mutación puntual. A pesar de que se trata de una terapia prometedora, eficaz y relativamente sencilla, en muchos aspectos de la misma hay un amplio margen de mejora, como la eficacia y especificidad de corte y reparación, o los métodos de transporte al interior celular. Una de las mayores limitaciones en la aplicación del sistema CRISPR-

Cas9 es su dependencia de la secuencia PAM junto a la diana. Por ese motivo se deben seguir realizando esfuerzos para producir diferentes tipos de proteínas Cas que reconozcan distintas secuencias PAM (Demirci et al., 2019). Por otra parte, una de las mayores problemáticas de la herramienta es la posibilidad de generar efectos fuera de la diana, *off-target*, ya que se ha detectado que el complejo ribonucleoproteico puede reconocer secuencias con hasta 5 bases nitrogenadas que no correspondan con la diana (Fu et al., 2013) y generar cortes fuera de la misma. Por este motivo, es esencial aumentar la especificidad del sistema CRISPR-Cas, generando nuevas nucleasas modificadas. Es esperable que las limitaciones técnicas mencionadas se superen, de hecho, ya se observan ensayos clínicos en pacientes que son muy prometedores y parecen ser una apuesta segura, como el CTX001.

Es esencial profundizar en el conocimiento de las estrategias de edición génica y los factores implicados en la anemia falciforme para predecir la respuesta del paciente y diseñar terapias más efectivas y seguras. Si estas terapias consiguen avanzar, estos tratamientos podrían llegar a ser más accesibles en las áreas con recursos más limitados donde esta enfermedad supone una mayor amenaza. La cura de la anemia falciforme empleando la edición genética está cada vez más cerca de convertirse en una realidad, pero aún existen algunos desafíos que deben ser superados para asegurar una terapia factible, segura y curativa a largo plazo.

Este trabajo ejemplifica una de las miles de enfermedades monogénicas conocidas en el ser humano actualmente. Es importante resaltar los esfuerzos que se están realizando para buscar una posible cura de las mismas gracias al estudio de la anemia falciforme, cuyas conclusiones podrían extrapolarse a muchas otras enfermedades genéticas en el futuro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams R.J., McKie V.C., Hsu L., Files B., Vichinsky E., Pegelow C. et al. (1998). Prevention of a First Stroke by Transfusions in Children with Sickle Cell Anemia and Abnormal Results on Transcranial Doppler Ultrasonography. *The New England Journal of Medicine*, 339 (1): 5 – 11. doi: <https://doi.org/10.1056/NEJM199807023390102>
- Antoniani C., Meneghini V., Lattanzi A., Felix T., Romano O., Magrin E. et al. (2018). Induction of fetal hemoglobin synthesis by CRISPR/Cas9-mediated editing of the human β -globin locus. *Blood* 131 (17): 1960 – 1973. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-10-811505>
- Antoniou P., Miccio A., Brusson M. (2021). Base and Prime Editing Technologies for Blood Disorders. *Frontiers in Genome Editing* 28 (3): 618406. doi: <https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.618406>
- Bauer D.E., Kamran S.C., Lessard S., Xu J., Fujiwara Y., Lin C. et al. (2013). An Erythroid Enhancer of *BCL11A* Subject to Genetic Variation Determines Fetal Hemoglobin Level. *Science* 242: 253 – 257. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1242088>
- Bernaudin F., Pondarré C., Galambrun C., Thuret I. (2017). Allogeneic/Matched Related Transplantation for β -Thalassemia and Sickle Cell Anemia. Ed. por Malik P., Tislade J. En *Gene and Cell Therapies for Beta-Globinopathies. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer 1013: 88-122. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7299-9_4
- Cai L., Bai H., Mahairaki V., Gao Y., He C., Wen Y. et al. (2017). A Universal Approach to Correct Various *HBB* Gene Mutations in Human Stem Cells for Gene Therapy of Beta-Thalassemia and Sickle Cell Disease. *Stem Cells Translational Medicine* 7 (1): 87-97. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/sctm.17-0066>
- Chonat S., Quinn C.T. (2017). Current Standards of Care and Long Term Outcomes for Thalassemia and Sickle Cell Disease. Ed. por Malik P., Tislade J. En *Gene and Cell Therapies for Beta-Globinopathies. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer 1013: 59-87. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7299-9_3
- Cradick T.J., Fine E.J., Antico C.J., Bao G. (2013). CRISPR/Cas9 systems targeting β -globin and *CCR5* genes have substantial off-target activity. *Nucleic Acids Research* 41 (20): 9584-9592. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt714>
- Cui S., Engel J.D. (2017). Reactivation of Fetal Hemoglobin for Treating β -Thalassemia and Sickle Cell Disease. Ed. por Malik P., Tislade J. En *Gene and Cell Therapies for Beta-Globinopathies. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer 1013: 177- 202. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7299-9_7

- Darbari D.S., Sheehan V.A., Ballas S.K. (2020). The vaso-occlusive pain crisis in sickle cell disease: Definition, pathophysiology, and management. *European Journal of Haematology* 105 (3): 237-246. doi: <https://doi.org/10.1111/ejh.13430>
- De Franceschi L., Cappellini M.D., Olivieri O. (2011). Thrombosis and Sickle Cell Disease. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis* 37 (3): 226-236. doi: <https://doi.org/10.1055/s-0031-1273087>
- Demirci S., Leonard A., Essawi K., Tisdale J.F. (2021). CRISPR-Cas9 to induce fetal hemoglobin for the treatment of sickle cell disease. *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development* 23: 276 – 285. doi: <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.09.010>
- Demirci S., Leonard A., Haro-Mora J.J., Uchida N., Tisdale J.F. (2019). CRISPR/Cas9 for Sickle Cell Disease: Applications, Future Possibilities, and Challenges. Ed. por Turksen K. En *Cell Biology and Translational Medicine. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer 1144 (5): 37-52. doi.: https://doi.org/10.1007/5584_2018_331
- Demirci S., Uchida N., Tisdale J.F. (2018). Gene Therapy for Sickle Cell Disease: An Update. *Cytherapy* 20 (7): 899-910. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.04.003>
- Frangoul H., Altshuler D., Cappellini M.D, Chen Y.S., Domm J., Eustace B.K. et al. (2021). CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *New England Journal of Medicine* 384: 252 - 260. doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031054>
- Glaros A.K., Razvi R., Shah N., Zaidi A.U. (2021). Voxelotor: alteration of sickle cell disease pathophysiology by a first-in-class polymerization inhibitor. *Therapeutic Advances in Hematology* 12: 1-16. doi: <https://doi.org/10.1177/20406207211001136>
- Hankins J.S., Aygun B., Nottage K., Thornburg C., Smeltzer M.P., Russell E. et al. (2014). From Infancy to Adolescence: Fifteen Years of Continuous Treatment with Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *Medicine* 93 (28): 215. doi: <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000215>
- Harteveld C.L., Achour A., Arkesteijn S.J.G., Huurne J., Verschuren M., Bhagwandien-Bisoenet S. et al. (2022). The hemoglobinopathies, molecular disease mechanisms and diagnostics. *International Journal of Laboratory Hematology* 44 (S1): 28 - 36. doi: <https://doi.org/10.1111/ijlh.13885>
- Huang X., Wang Y., Yan W., Smith C., Ye Z., Wang J. et al. (2015). Production of Gene-Corrected Adult Beta Globin Protein in Human Erythrocytes Differentiated from Patient iPSCs After Genome Editing of the Sickle Point Mutation. *Stem Cells* 33 (5): 1470-1479. doi: <https://doi.org/10.1002/stem.1969>

- Ingram V. M. (1957). Gene Mutations in Human Hæmoglobin: the Chemical Difference Between Normal and Sickle Cell Hæmoglobin. *Nature* 180: 326-328 doi: <https://doi.org/10.1038/180326a0>
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A (2012). Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337 (6096): 816 - 821. doi.: <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Kanter J., Walters M.C., Krishnamurti L., Mapara M.Y., Kwiatkowski J.L., Rifkin-Zenenberg S. et al. (2022). Biologic and Clinical Efficacy of LentiGlobin for Sickle Cell Disease. *The New England Journal of Medicine* 386 (7): 617-628. doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2117175>
- Lamsfus-Calle A., Daniel-Moreno A., Antony J.S., Epting T., Heumos L, Baskaran P. et al. (2020). Comparative targeting analysis of *KLF1*, *BCL11A*, and *HBG1/2* in CD34⁺ HSPCs by CRISPR/Cas9 for the induction of fetal hemoglobin. *Scientific Reports* 10: 10133. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66309-x>
- Li C., Psatha N., Sova P., Gil S., Wang H., Kim J. et al. (2018). Reactivation of γ -globin in adult β -YAC mice after ex vivo and in vivo hematopoietic stem cell genome editing. *Blood* 131(26):2915 - 2928. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-838540>
- Liu N., Hargreaves V.V., Zhu Q., Kurland J.V., Hong J., Kim W. et al. (2018). Direct Promoter Repression by BCL11A Controls the Fetal to Adult Hemoglobin Switch. *Cell* 173(2): 430 – 442. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.016>
- Lomova A., Clark D.N., Campo-Fernández B., Flores-Bjurström C., Kaufman M.L., Fitz-Gibbon S. et al. (2019). Improving Gene Editing Outcomes in Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells by Temporal Control of DNA Repair. *Stem Cells* 37 (2): 284-294 doi: <https://doi.org/10.1002/stem.2935>
- Ma L., Yang S., Peng Q., Zhang J., Zhang J. CRISPR/Cas9-based gene-editing technology for sickle cell disease. *Gene* 874: 147480. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147480>
- Manning J.M., Manning L.R., Dumoulin A., Padovan J.C., Chait B. (2020). Embryonic and Fetal Human Hemoglobins: Structures, Oxygen Binding, and Physiological Roles. Ed. por Hoeger U., Harris J.R. En *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins*. Springer 94: 275-296 doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7_11
- Mathews C.K., Van Holde K.E., Appling D.R., Anthony-Cahill S.J. (2013). Función y evolución de las proteínas. Ed. por Martín-Romo M., Vázquez M. En *Bioquímica 4 ED*. Pearson 1376: 262-313.

- McGann P.T., Nero A.C., Ware R.E. (2017). Clinical Features of β -Thalassemia and Sickle Cell Disease. Ed. por Malik P., Tislade J. En *Gene and Cell Therapies for Beta-Globinopathies. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer 1013: 1-26. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7299-9_1
- Meier E.R. (2018). Treatment Options for Sickle Cell Disease. *Pediatric Clinics of North America* 65 (3): 427-443. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2018.01.005>
- Métais J.Y., Doerfler P.A., Mayuranathan T., Bauer D.E., Fowler S.C., Hsieh M.M. et al. (2019). Genome editing of *HBG1* and *HBG2* to induce fetal hemoglobin. *Blood Advances* 3 (21): 3379 - 3392 doi: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000820>
- Mettananda S., Higgs D.R. (2018). Molecular Basis and Genetic Modifiers of Thalassemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 32 (2): 177-191. doi: <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.11.003>
- Miller S.M., Wang T., Randolph P.B., Arbab M., Shen M.W., Huang T.P., et al. (2020). Continuous evolution of SpCas9 variants compatible with non-G PAMs. *Nature Biotechnology* 38: 471-481. doi: <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0412-8>
- Niihara Y., Miller S.T., Kanter J., Lanzkron S., Smith W.R., Hsu L.L. et al. (2018). *The New England Journal of Medicine* 379: 226-235. doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1715971>
- Onimoe G., Rotz S. (2020). Sickle cell disease: A primary care update. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 87 (1): 19-27. doi: <https://doi.org/10.3949/ccjm.87a.18051>
- Organización Mundial de la Salud. (2006). *Anemia falciforme: informe de la Secretaría*. Asamblea Mundial de la Salud, 59. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/24412>
- Papizan J.B., Porter S.N., Sharma A., Pruett-Miller S.M. (2021). Therapeutic gene editing strategies using CRISPR-Cas9 for the β -hemoglobinopathies. *Journal of Biomedical Research*, 35 (2): 115-134. doi: <https://doi.org/10.7555/JBR.34.20200096>
- Park S., Gianotti-Sommer A., Molina-Estevez F.J., Vanuytsel K., Skvir N., Leung A. et al. (2017). A Comprehensive, Ethnically Diverse Library of Sickle Cell Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 8: 1076-1085. doi: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.12.017>
- Park S.H., Bao G. (2021). CRISPR/Cas9 gene editing for curing sickle cell disease. *Transfusion and Apheresis Science* 60: 103060. doi: <https://doi.org/10.1016/j.transci.2021.103060>
- Pauling L., Itano H.A., Singer S.J., Wells I.C. (1949). Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. *Science* 110 (2865): 543 - 548. doi: <https://doi.org/10.1126/science.110.2865.543>

- Pinto V.M., Balocco M., Quintino S., Forni G.L. (2019). Sickle cell disease: a review for the internist. *Internal and Emergency Medicine*, 14 (7): 1051-1064. doi: <https://doi.org/10.1007/s11739-019-02160-x>
- Porteus M.H. (2017). Genetic Editing for the β -Hemoglobinopathies. Ed. por Malik P., Tislade J. En *Gene and Cell Therapies for Beta-Globinopathies. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer 1013: 203-217. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7299-9_8
- Ribeil J.A., Haccin-Bey-Abina S., Payen E., Magnani A., Semeraro M., Magrin E. et al. (2017). *The New England Journal of Medicine* 376: 848-855. doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609677>
- Richter M.F., Zhao K.T., Eton E., Lapinaite A., Newby G.A., Thuronyi B.W. et al. (2020). Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity. *Nature Biotechnology* 38: 883 – 891. doi: <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0453-z>
- Shen Y., Verboon J.M., Zhang Y., Liu N., Kim Y.J., Marglous S. et al. (2021). A unified model of human hemoglobin switching through single-cell genome editing. *Nature Communications* 12: 4991. doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25298-9>
- Steinberg M.H. (2008) Sickle Cell Anemia, the First Molecular Disease: Overview of Molecular Etiology, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. *The Scientific World Journal* 8: 1295-1324. doi: <https://doi.org/10.1100/tsw.2008.157>
- Stoddard B.L. (2011). Homing endonucleases: from microbial genetic invaders to reagents for Target DNA modification. *Structure* 19 (1): 7-15. doi: <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.12.003>
- Sundd P., Gladwin M.T., Novelli E.M. (2019). Pathophysiology of Sickle Cell Disease. *Annual Review of Phytopathology* 14: 263-292. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012838>
- Takahashi K., Yamanaka S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined F actors. *Cell* 126 (4): 663-76. doi.: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Taylor S.M., Parobek C.M., Fairhurst R.M. (2012). Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 12 (6): 457- 468. doi.: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70055-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70055-5)
- Thein S.L. (2017). Genetic Basis and Genetic Modifiers of β -Thalassemia and Sickle Cell Disease. Ed. por Malik P., Tislade J. En *Gene and Cell Therapies for Beta-Globinopathies*.

- Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer 1013: 27-57.
doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7299-9_2
- Topfer S.K., Feng R., Huang P, Ly L.C., Martyn G.E., Blobel G.A., et al. (2022). Disrupting the adult globin promoter alleviates promoter competition and reactivates fetal globin gene expression. *Blood* 139 (14): 2107 - 2118. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.2021014205>
- Traxler E.A., Yao Y., Wang Y.D., Woodard K.J., Kurita R., Nakamura Y. et al. (2016). A genome-editing strategy to treat β -hemoglobinopathies that recapitulates a mutation associated with a benign genetic condition. *Nature Medicine* 22: 987 – 990. doi: <https://doi.org/10.1038/nm.4170>
- Uda M., Galanello R., Sanna S., Lettre G., Sankaran V.G., Chen W. et al. (2008). Genome-wide association study shows *BCL11A* associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of β -thalassemia. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105 (5): 1620-1625. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0711566105>
- Wiedenheft B, Sternberg S.H, Doudna J.A. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482 (7385): 331–338. doi: <https://doi.org/10.1038/nature10886>
- Yang H., Ren S., Yu S., Pan H., Li T., Ge, S. et al. (2020). Methods Favoring Homology-Directed Repair Choice in Response to CRISPR/Cas9 Induced-Double Strand Breaks. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (18): 6461. doi.: <https://doi.org/10.3390/ijms21186461>
- Yin J., Xie X., Ye Y., Wang L. Che F. (2019). BCL11A: a potential diagnostic biomarker and therapeutic target in human diseases. *Biosciences Reports* 39 (11): BSR20190604 doi: <https://doi.org/10.1042/BSR20190604>
- Watson J. (1948). The significance of the paucity of sickle cells in newborn Negro infants. *The American Journal of the Medical Sciences* 215 (4): 419-423. doi: <https://doi.org/10.1097/00000441-194804000-00008>