



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE MEDICINA

**“AVANCES DE LA TERAPIA CRISPR CAS9 EN FIBROSIS
QUÍSTICA”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MÉDICO**

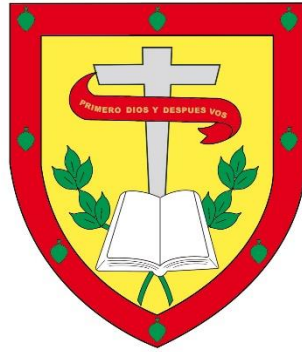
AUTOR: MARÍA DE LOS ÁNGELES VERA MATUTE

DIRECTOR: DANILO GUSTAVO MUÑOZ PALOMEQUE

CUENCA - ECUADOR

2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE MEDICINA

**“AVANCES DE LA TERAPIA CRISPR CAS9 EN FIBROSIS
QUÍSTICA”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MÉDICO**

AUTOR: MARÍA DE LOS ÁNGELES VERA MATUTE

DIRECTOR: DANILO GUSTAVO MUÑOZ PALOMEQUE

CUENCA - ECUADOR

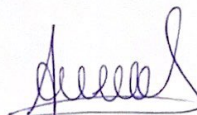
2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

DECLARATORIA DE AUTORÍA Y RESPONSABILIDAD

María de los Ángeles Vera Matute portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0105805774**. Declaro ser el autor de la obra: “Avances de la terapia CRISPR Cas9 en Fibrosis Quística”, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, 15 de marzo de 2024

F: 

María de los Ángeles Vera Matute

C.I. 0105805774

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR

Certifico que el presente trabajo denominado " **Avances de la terapia CRISPR Cas9 en Fibrosis Quística** " realizado por María de los Ángeles Vera Matute con documento de identidad No. **0105805774**, previo a la obtención del título profesional de Médico, ha sido asesorado, supervisado y desarrollado bajo mi tutoría en todo su proceso, cumpliendo con la reglamentación pertinente que exige la Universidad Católica de Cuenca y los requisitos que determina la investigación científica.

Cuenca, 15 de marzo de 2024


F:
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA
DR. DANILO MUNOZ
MEDICINA INTERNA
C.I.: 0103652574

Dr. Danilo Gustavo Muñoz Palomeque

DIRECTOR / TUTOR

DEDICATORIA

A mis amados padres, Teresa y Luis, por su inquebrantable e incondicional apoyo, amor y sacrificio a lo largo de mi vida, su ejemplo de perseverancia y dedicación me han inspirado siempre.

A mis seres queridos, Ana y Freddy, quienes han sido mi red de apoyo y comprensión durante los momentos más difíciles y desafiantes, pues han hecho este camino más llevadero mediante su fortaleza y amor, los cuales me impulsaron a superar cada desafío.

A la Universidad Católica de Cuenca, por proporcionarme los recursos y el entorno propicio para llevar a cabo esta investigación, y por permitirme formar en ella los mejores recuerdos.

Y a todos aquellos que, de una u otra manera, formaron parte de esta gran travesía.

Con amor,

Ángeles Vera Matute

AGRADECIMIENTO

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que contribuyeron de alguna u otra manera durante mi carrera universitaria.

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por regalarme muchas bendiciones y éxitos durante este largo camino recorrido, por ser mi guía y darme sabiduría e inteligencia para la realización de este trabajo.

A mi familia, por celebrar mis éxitos y por demostrar su gran apoyo. Su amor y aliento han sido pilares fundamentales.

A mi director de tesis, Danilo Muñoz por su orientación constante, su paciencia y su invaluable apoyo. Gracias por guiarme y por contribuir a mi desarrollo profesional.

Finalmente, agradezco a todos aquellos que, de una manera u otra, contribuyeron a esta investigación y a mi crecimiento tanto académico como personal.

Este logro no hubiera sido posible sin el apoyo de cada uno de ustedes.

¡Gracias!

1. RESUMEN

Los avances en la terapia de las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas asociada a la proteína 9 han impulsado la investigación en el tratamiento de la fibrosis quística, una enfermedad genética debilitante. Esta técnica de edición genética promete corregir las mutaciones responsables, ofreciendo una perspectiva emocionante para los pacientes.

No obstante, esta tecnología está en ensayos clínicos, pues aún se enfrentan desafíos regulatorios y de seguridad, donde se está tratando de lidiar con sus limitantes mediante la optimización de la eficiencia, la reducción de efectos fuera del objetivo, personalización de enfoques y el desarrollo de métodos de entrega específicos, por ello la investigación continua y la optimización de técnicas son esenciales para llevar los diversos avances obtenidos desde el laboratorio hasta aplicaciones clínicas exitosas, pues durante los últimos años mediante las pruebas realizadas se han tenido buenos resultados, y se ha demostrado que se podrá aplicar en humanos en un lapso de 5 a 10 años.

Palabras clave: Fibrosis quística, investigación genética, proteína 9 asociada a CRISPR, resultado del tratamiento, tecnología de genética dirigida y terapia genética.

2. ABSTRACT

Advances in clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated with protein 9 therapy have boosted forward research of cystic fibrosis, a weakening genetic disease. This gene-editing technique holds promise for correcting the mutations responsible, offering an exciting prospect for patients.

However, this technology is still in clinical trials, as regulatory and safety challenges are being faced, and efforts are ongoing to deal with its limitations by optimizing efficiency, reducing off-target effects, customizing approaches, and developing specific delivery methods. Therefore, continuous research and technique optimization are essential to bring advances from the laboratory to successfully apply them in clinical practice, as in recent years, tests have shown promising results, demonstrating that application in humans could be possible within 5 to 10 years.

Keywords: Cystic fibrosis, gene research, CRISPR-associated protein 9, treatment outcome, targeted gene technology, and gene therapy.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	7
2. ABSTRACT.....	8
3. INTRODUCCIÓN.....	10
4. MARCO TEÓRICO.....	12
4.1. Definición de fibrosis quística.....	12
4.1.1 Epidemiología.....	12
4.1.2 Fisiopatología.....	12
4.1.3 Presentación clínica.....	12
4.1.4 Evaluación y diagnóstico.....	13
4.1.5 Tratamiento.....	13
4.2. Estructura básica del sistema CRISPR/Cas9.....	14
4.3. El mecanismo del sistema CRISPR/Cas9.....	16
4.4. Aplicación del sistema CRISPR/Cas9.....	17
4.5. CRISPR/Cas9 en fibrosis quística.....	18
5. RESULTADOS.....	19
6. DISCUSIÓN.....	21
7. CONCLUSIONES.....	24
8. BIBLIOGRAFÍA.....	25

3. INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística (FQ) se define como un trastorno genético, de carácter autosómico recesivo causado por variantes patogénicas en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), provocando una disminución de cantidad y función de la proteína CFTR en las superficies epiteliales (1). Desde su descripción en 1938, avances significativos la han transformado de una enfermedad mortal a una donde la supervivencia media se acerca o supera los 50 años (2).

El fenotipo se caracteriza por enfermedad pulmonar, insuficiencia pancreática exocrina, malabsorción de nutrientes, desnutrición, retraso del crecimiento, manifestaciones hepatobiliares e infertilidad masculina (3), su prevalencia se estima entre 70 y 100 mil casos, de los cuales solo el 12% de la población mundial recibe tratamiento farmacológico debido al infradiagnóstico y acceso limitado (4). La atención coordinada por equipos multidisciplinarios y rápidos avances terapéuticos han mejorado la perspectiva de supervivencia para los pacientes en las últimas décadas (5).

A lo largo de los últimos años, se ha realizado una investigación significativa en busca de terapias efectivas para mejorar la vida de quienes padecen la enfermedad (2). A pesar de los progresos en el tratamiento de los síntomas, no existe una cura definitiva; sin embargo, uno de los avances más prometedores en este campo es la tecnología de edición génica con las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas asociada a la proteína 9 (CRISPR/Cas9), que ha generado un gran interés en la comunidad científica y médica, siendo una técnica de edición genética revolucionaria y prometedora para el tratamiento (6).

Esta técnica permite una edición precisa y específica del genoma, abriendo la puerta a la corrección de genes disfuncionales asociados (6). En estudios ha mostrado promesas en la corrección del gen CFTR, teniendo la capacidad de modificar directamente la

secuencia genómica endógena, así ofrece una alternativa potencialmente más eficiente y específica en comparación con enfoques convencionales. Aunque existen desafíos técnicos y éticos, su uso terapéutico en la FQ representa un emocionante avance hacia tratamientos más precisos y personalizados para enfermedades genéticas (7). Esta revisión bibliográfica tiene como objetivo examinar los avances recientes en la aplicación de esta terapia como potencial tratamiento de la FQ.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Definición de fibrosis quística

Patología genética autosómica recesiva caracterizada por función reducida o ausente de la proteína CFTR (8). Se han identificado más de 2000 variantes de secuencia del gen regulador de la conductancia transmembrana de la FQ, situado en la membrana apical de epitelios de diversos órganos como, hígado, pulmones, tracto gastrointestinal y páncreas (9).

4.1.1 Epidemiología

En el mundo, alrededor de 79,000 personas la padecen, con mayor frecuencia en caucásicos y sexo femenino; en Latinoamérica se presenta entre 23% - 59% (8), sin embargo, en Ecuador al ser una patología subdiagnosticada durante varios años no se ha logrado conocer con certeza la información real, pero la incidencia registrada es de 1: 1252 recién nacidos vivos con una sobrevida de 9,5 años (10).

4.1.2 Fisiopatología

Se caracteriza por disfunción de la proteína CFTR, responsable de una de las vías de transporte de iones cloro en los epitelios apicales, donde la pérdida de función afecta la hidratación y pH en conductos exocrinos, resultando en obstrucción y dilatación de glándulas en diversos órganos (11). La obstrucción de conductos en órganos como páncreas y vías respiratorias lleva a destrucción y fibrosis, infecciones bacterianas y respuestas inflamatorias que contribuyen a complicaciones pulmonares (12).

4.1.3 Presentación clínica

Más del 80% de afectados experimentan insuficiencia pancreática exocrina, manifestada por mala digestión de proteínas y grasas, esteatorrea y crecimiento deficiente. Las manifestaciones respiratorias, incluyen tos, aumento de frecuencia respiratoria, sibilancias y crepitaciones torácicas; las infecciones recurrentes, resultan en

exacerbaciones pulmonares agudas y por ende disminución en la función pulmonar, donde las infecciones crónicas llevan a bronquiectasias (13).

Los pacientes también pueden desarrollar infertilidad masculina por azoospermia obstructiva y elevación de cloro en sudor, mientras que las comorbilidades en adultos incluyen diabetes, enfermedad hepática con cirrosis y osteoporosis (8).

4.1.4 Evaluación y diagnóstico

En nuestro medio implica la presencia de una o más manifestaciones específicas de órganos, niveles elevados de cloruro en el sudor, confirmación genética de variantes en el gen CFTR y la diferencia del potencial nasal transepitelial (DPNT), cuyo valor inferior a -40 mV se considera patológico (10)(14). No obstante, el Gold estándar es el test de sudor, en Ecuador se lo realiza con el método de conductividad donde concentraciones de 80 Eq NaCl mol/L son positivas y deben confirmarse con un segundo test, valores entre 61-80 Eq NaCl mol/L son limítrofes, necesitan estudios complementarios y < 60 Eq NaCl mol/L negativos (10)(15).

4.1.5 Tratamiento

Al ser una enfermedad sistémica, requiere un tratamiento centrado en prevenir episodios agudos, pero de manera general se trata con inhaloterapia, terapia respiratoria, broncodilatadores, mucolíticos, antiinflamatorios, corticoides e incluso antibióticos, buscando mantener la función pulmonar con control agresivo de infecciones y eliminación de mucosidad, optimizar la nutrición con suplementos, y abordar otras complicaciones (16), que se caracterizan por empeoramiento de la función pulmonar, dificultad respiratoria, tos productiva y fiebre (17).

a) Terapias moduladoras de CFTR

Las terapias moduladoras actúan sobre la proteína CFTR, utilizan dos mecanismos para mejorar su función: potenciadores y correctores. Los potenciadores, como el

ivacaftor, aumentan la apertura del canal CFTR, permitiendo que el cloruro y el bicarbonato fluyan más eficientemente a través de la membrana celular, mientras que los correctores, como lumacaftor, tezacaftor y elexacaftor, mejoran la cantidad de dichos canales en la superficie celular, asegurando que la proteína se pliegue correctamente y se transporte a la superficie celular (10)(18).

b) Sistema CRISPR/Cas9

Las matrices repetitivas en tándem conocidas como CRISPR, identificadas en *Streptococcus pyogenes* en 1987 (19), tienen la capacidad para realizar knockout génico, inserciones génicas y otras modificaciones de la secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) por lo que han sido una gran alternativa para el tratamiento de FQ (20).

En 2002 se descubrió la proteína asociada "Cas", así las secuencias muestran homología con secuencias de fagos, sugiriendo su origen, además se estableció su conexión con la inmunidad microbiana, postulando que utiliza ácido ribonucleico (ARN) antisentido para reconocer ácidos nucleicos exógenos. Se considera que es un "sistema inmune adquirido" evolucionado por bacterias para resistir al ADN extraño de plásmidos o fagos (21).

4.2. Estructura básica del sistema CRISPR/Cas9

Se ha clasificado en tipo (I, II y III), destacando el tipo II de *Streptococcus pyogenes*, que involucra la proteína Cas9, esta presenta seis dominios: Rec I, Rec II, Bridge Helix, RuvC, helicasa (HNH) y motivo adyacente del protoespaciador (PAM), permitiendo la dirección independiente y corte de ADN, tras mejoras, se ha convertido en una gran alternativa en la edición genética (22).

El locus CRISPR/Cas tipo II incluye ARN transactivador (ARNtracr), genes Cas (Cas9, Cas1, Cas2 y Csn2) para la respuesta inmune, y una región con espaciadores y repeticiones. El ARNtracr y el ARN CRISPR (ARNcr) forman el complejo

crRNA:tracrRNA, logrando reconocimiento específico de la secuencia de ADN. Cas9 de *Streptococcus pyogenes* consta de dos lóbulos, el de reconocimiento (REC) y el nucleasa (NUC), siendo este último crucial para la escisión específica del ADN (20).

El dominio HNH divide la cadena complementaria al ARN guía, y el dominio RuvC parte la cadena reconocida, guiados por el ARN de guía única (ARNsg). El reconocimiento de la secuencia de PAM, aguas arriba del sitio de corte, y la activación de Cas9 mediante sgRNA son esenciales. La PAM distingue el ADN propio del extraño, protegiendo el genoma, Cas9 es inactivo en su presencia, pero al unirse con sgRNA, experimenta una conformación que activa la proteína para el corte del ADN-diana (23).

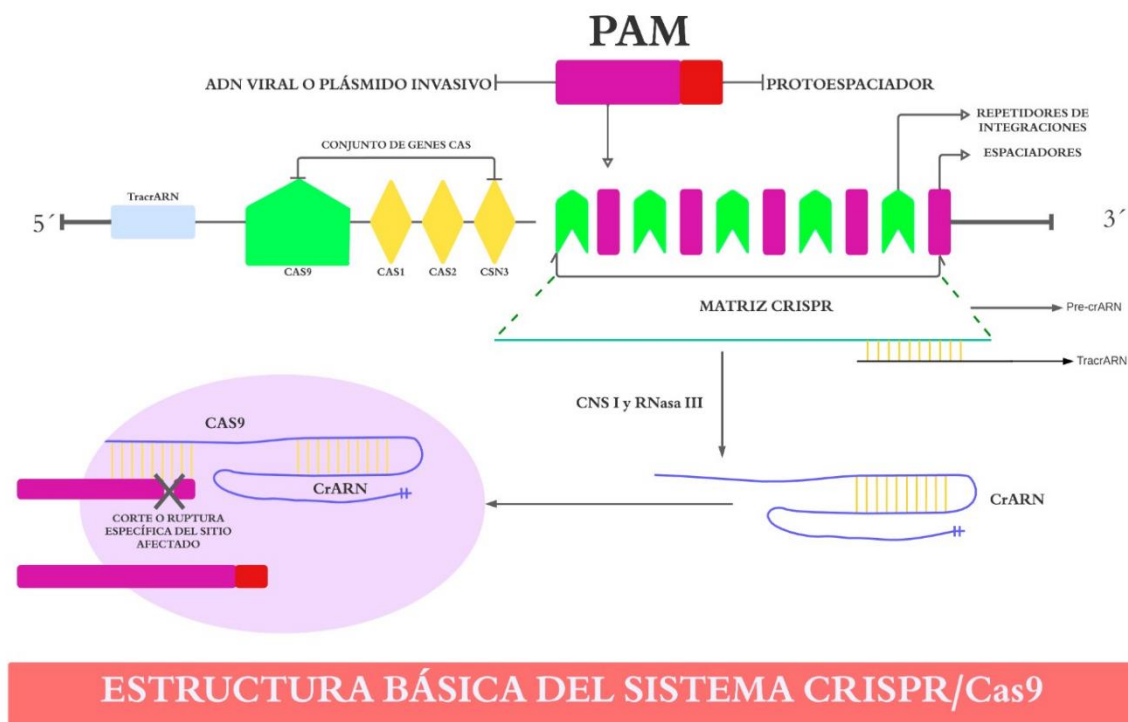


Figura 1: Inmunidad adaptativa bacteriana mediada por CRISPR/Cas9. Autoría propia.

4.3. El mecanismo del sistema CRISPR/Cas9

El proceso de resistencia bacteriana contra la invasión de ácidos nucleicos extraños se desglosa en adaptación, expresión e interferencia. Cuando un virus invade por primera vez, la bacteria integra secuencias espaciadoras del ADN viral en su región espaciadora CRISPR, permitiendo la memorización del virus (19). En sucesivas invasiones, las bacterias transcriben las secuencias espaciadoras en pre-ARNcr, el cual después se procesa en ARNcr maduro con la ayuda de CnsI y ribonucleasa tipo tres (RNaseIII). El ARNcr, también llamado ARNg, reconoce y se une al ADN extraño mediante secuencias complementarias. La nucleasa Cas9, incapaz de cortarlo por sí misma, se activa al combinarse con un tracrRNA maduro y un crRNA, formando el complejo ribonucleoprotéico que la guía para escindir el ADN-invasor mediante el reconocimiento de su sitio PAM, logrando así la autodefensa (24).

El sistema CRISPR/Cas, además de su función inmunológica, posee la capacidad de edición de genes. Tras la producción de roturas de doble cadena (DSBs), las células activan mecanismos de reparación, donde los principales son la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la reparación dirigida por homología (HDR) (25).

La activación de HDR, que utiliza secuencias homólogas, permite diseñar una plantilla de reparación de ADN donante para lograr la integración del fragmento donante, facilitando el knock-in genético. Cuando no hay secuencias homólogas disponibles, las células activan NHEJ, propenso a la generación de mutaciones de cambio de marco génico (knockout génico). En la edición génica, Cas9 y ARNg se construyen en vectores equipados con promotor, terminador, replicador y marcador de selección. El ARNg, un ARN quimérico que combina componentes esenciales de ARNcr y ARNtracr, contiene una parte delantera (ARNsg) responsable del reconocimiento del sitio diana y una parte posterior que sirve como andamio para unirse a Cas9. La simplicidad y versatilidad de

este sistema ha llevado a su rápida adopción como herramienta líder para la edición genética, destacándose por sus éxitos en ratones y humanos (26).

4.4. Aplicación del sistema CRISPR/Cas9

b) Medicina de precisión

La edición genética, particularmente a través de la tecnología CRISPR/Cas9, ha emergido como una herramienta revolucionaria con un potencial significativo en medicina de precisión, su interés se da por abordar defectos genéticos y enfermedades graves que previamente eran intratables. Estos avances han allanado el camino para terapias génicas más efectivas y han presentado nuevas oportunidades de tratamientos (27).

Uno de los logros destacados fue la cura de ratones con cataratas mediante la inyección de Cas9 y sgRNA en óvulos fecundados con mutaciones patogénicas en el gen *crystallin gamma C* (CRYGC) (28), también se ha aplicado en modelos de enfermedades, como el cáncer gástrico humano, enfermedades cerebrales, pulmonares y hepáticas, con posibles aplicaciones en la producción de vacunas (29).

En el ámbito de las enfermedades virales, se la identifica como promisoría para el tratamiento del virus de inmunodeficiencia adquirido (VIH), donde la eliminación del receptor de quimiocinas CC tipo 5 (CCR5) en células T humanas infectadas redujo los niveles virales (30).

La inmunoterapia antitumoral se ha utilizado para las células T receptoras de antígenos quiméricos (CAR-T), mejorando su capacidad para reconocer y combatir células tumorales, asimismo la supresión de la expresión de genes reguladores inmunitarios, como el ligando 1 de muerte programada (PD-1), ha mejorado la actividad antitumoral,

se ha utilizado en tipos de cáncer como linfoma difuso de células B grandes y cáncer ginecológico (30).

En enfermedades hereditarias, ha demostrado su eficacia en la corrección de mutaciones haploides de células madre embrionarias humanas (31), se ha explorado su potencial en el tratamiento de enfermedades infecciosas crónicas, como herpesvirus y hepatitis B, y se ha aplicado para corregir anomalías musculares y cardíacas asociadas a la distrofia muscular de Duchenne (32).

c) Modificaciones de Cas9

La proteína Cas9 esencial para la edición génica, exhibe funciones diversas dependiendo de la actividad de sus dominios HNH y RuvC. En la forma típica, provoca roturas de doble hebra en el genoma. Sin embargo, cuando uno de los dominios está inactivo, se convierte en Cas9 nickase (Cas9n), generando incisiones de una sola hebra. Cas9n es valioso para la edición heterocigótica y puede emplearse como editor de bases al fusionarse con deaminasas y ADN polimerasa, facilitando la introducción de mutaciones específicas. La forma inactiva de ambos dominios, conocida como dCas9, se emplea en técnicas de activación o inhibición de la transcripción, contribuyendo al cribado funcional de genes y la identificación de implicaciones genéticas en enfermedades específicas (27).

4.5. CRISPR/Cas9 en fibrosis quística

Dada la base genética de la enfermedad, las terapias genómicas pueden dirigirse a alteraciones específicas y corregirlas, ofreciendo tratamientos a largo plazo. Su aparición junto con los avances en la tecnología de nucleasas, ha creado oportunidades para la corrección precisa del genoma siendo prometedora para tratar la FQ (33). Anna Cereseto et al. (34) utilizaron una estrategia de edición de bases de adenina (EBA) basada en CRISPR para corregir mutaciones sin inducir roturas de doble cadena en el ADN. Su

investigación reveló una eficacia de modificación celular de hasta el 70%, esta terapia génica se ha utilizado en varios modelos animales.

En un estudio individual, Katarina et al. (35) intentaron mejorar la eficacia de administración de Cas9-RNP, con una estrategia basada en la unión no covalente de EBA al péptido lanzadera anfifílico S10. Además, desarrollaron S315 como péptido penetrante para facilitar la formación de vectores EBA8e-Cas9 RNP y S315 para una administración eficaz en epitelios de vías respiratorias de Rhesus, logrando una eficacia de hasta el 5,3%.

Por su parte Alexandra McCarron y sus colegas desarrollaron con éxito un modelo viable en roedores, que ofrece un evaluación longitudinal de la fisiopatología y las intervenciones terapéuticas (36).

El modelo sencillo ha demostrado ser valioso en experimentos de edición genética, en este contexto, los investigadores utilizaron el modelo de FQ para CFTR en células basales de las vías respiratorias de hurones mediante el uso del vector de virus adenoasociados (AAV), y la clasificación por fluorescencia verde de las células editadas con el gen CFTR reveló una tasa de edición exitosa del 70,4% entre las células, mientras que la tasa de corrección del CFTR fue del 3% (37).

5. RESULTADOS

CRISPR-Cas9 aplicada en FQ, muestra avances notables en la corrección de CFTR, sin embargo, su aplicación clínica en humanos enfrenta desafíos de eficacia y seguridad a largo plazo (38).

Para entender mejor la patogénesis de la FQ, se han creado modelos en varias especies, entre ellos un modelo ovino en el que se ha efectuado la interrupción del gen CFTR, desarrollando una enfermedad severa consistente con la FQ humana, siendo este modelo animal valioso para avances individualizados (39).

Como primer punto tenemos la estrategia propuesta para abordar los desafíos asociados con la administración in vivo de CFTR a las células de las vías respiratorias la cual es corregir las células ex vivo seguido del trasplante para repoblar el pulmón del paciente con células con CFTR, logrando así optimización de resultados, pues avances recientes demostraron correcciones exitosas restaurando niveles casi normales de función de CFTR, aunque estas tecnologías al ser específicas para mutaciones deben individualizarse (38), por ello se está optimizando para reducir efectos fuera del objetivo y de igual manera se aborda la exposición a nucleasas (40).

Otro avance notable son las mejoras en vectores de entrega mediante el uso de los lentivirus en lugar de virus adenoasociados, los cuales han sido reconocidos como un vector eficaz pues tienen una mayor capacidad de empaquetado y en diversas pruebas en ratones ha demostrado que podría corregir el defecto de CFTR in vivo y proporcionar una expresión, asimismo ha demostrado actividad del canal parcialmente restaurada después de la administración en aerosol (41), siendo vehículos que muestran bajos niveles de efectos fuera de los deseados pero requieren esfuerzos adicionales para mejorar la eficacia y especificidad (38) (42).

Progresos en CRISPR/Cas9 también han permitido diversas aplicaciones de Cas9 deficientes en nucleasas, que pueden unirse a una región específica del genoma sin crear DSB, pues Cas9 muerta (dCas9) se puede fusionar con varios dominios reguladores de la transcripción para crear activadores CRISPR (CRISPRa) o inhibidores (CRISPRi) que activan o silencian la expresión de un gen diana sin cortar (44), incluso se puede utilizar como herramienta de visualización mediante la fusión con una proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) para visualizar secuencias de ADN repetitivas usando un sgRNA, o loci no repetitivos usando múltiples sgRNA (38).

De igual forma se puede mencionar un gran avance, de cierta forma controversial, el cual es la terapia génica in útero (IUGT), donde se han desarrollado estrategias para modificar genes endógenos, reemplazar genes ausentes o modificar productos de la transcripción génica, utilizando un sistema indicador fluorescente CRISPR que sincroniza con precisión la administración intraamniótica de componentes CRISPR/Cas9 (43).

Asimismo, se han usados proteínas Cas9 más pequeñas derivadas de *Staphylococcus aureus* llamadas SaCas9 y *Neisseria meningitidis* llamadas Nme2Cas9, estas exhiben una eficiencia de edición de genes comparable a la de SpCas9, por su menor tamaño son más adecuadas para la administración in vivo, también la nickasa Cas9 fusionada con transcriptasa inversa para crear editores principales (PE), pueden lograr todas las conversiones, inserciones y eliminaciones específicas, al cortar solo una hebra, sin plantillas de ADN de donantes (44).

6. DISCUSIÓN

En este contexto, la aplicación de CRISPR/Cas en la terapia génica para FQ ha avanzado de manera significativa, ofreciendo nuevas perspectivas para el tratamiento a largo plazo. Experimentos respaldan la posibilidad de corregir alteraciones genéticas específicas en pacientes con FQ, destacando la eficacia de la coedición génica y la mejora de la eficiencia especialmente por la reparación guiada por homología (40). A pesar de limitaciones en aplicaciones in vivo la aprobación de numerosos ensayos clínicos la convierten en un tratamiento prometedor. Mejoras continuas en los vectores de entrega acercan la edición génica a la práctica clínica, ofreciendo perspectivas para de cura en los próximos 5 a 10 años (41).

Esta tecnología en diferentes especies, como ratas y ovejas, permite un entendimiento más completo de la enfermedad y abre oportunidades para la investigación

de terapias potenciales. El estudio en ratas proporciona información detallada sobre la actividad de CFTR y los efectos de la mutación específica, mientras que el modelo ovino refuerza la utilidad de CRISPR/Cas en la creación de modelos, ofreciendo plataformas valiosas para un enfoque integral acercando a la comunidad científica y médica a soluciones terapéuticas más precisas e individualizadas (39).

Sin embargo, lo que se pretende con este tratamiento genético es mejorar el aclaramiento pulmonar y las funciones de defensa de la inmunidad innata que se complican aún más en las vías respiratorias debido al aumento y viscosidad del moco, por ello se han realizado grandes avances, no obstante, la gran limitante es su llegada a las vías respiratorias humanas (38), y que es para mutaciones específicas, por ello deben corregirse individualmente, siendo algunas más susceptibles a esta estrategia que otras (39).

La entrega in vivo de moléculas CRISPR enfrenta complicaciones, siendo los virus adenoasociados comúnmente utilizados, pero con limitaciones en empaquetado y tropismo. Alternativas como nanopartículas lipídicas (LNPs) y partículas similares muestran promesa (42). De igual forma, la terapia génica in útero con CRISPR-Cas9 representa un avance tecnológico, aunque enfrenta desafíos éticos en la transición de modelos animales a humanos, ofrece ventajas como una entrega más efectiva y la prevención del inicio fenotípico de enfermedades genéticas (43).

CRISPR/Cas9 en FQ ha evolucionado desde la inserción específica del gen CFTR hasta correcciones exitosas en células basales respiratorias (44). Tecnologías como nucleasa de dedos de zinc (ZFNs) y nucleasa de actividad similar a activador de transcripción (TALENs) respaldan la esperanza de corregir mutaciones específicas y restaurar la expresión y funcionalidad de CFTR, empero la reprogramación, la expansión y la edición aumentan la probabilidad de tumores, aunque sigue siendo un objetivo

ambicioso, ofrece una promesa futura de cura independiente de las mutaciones estando fuera del alcance de enfoques tradicionales (38).

Esta técnica en comparación con fármacos correctores y potenciadores, tiene varias limitantes, principalmente los costos, disponibilidad clínica, aprobación por agencias reguladoras, la entrega efectiva a células afectadas, acción en lugares no deseados del genoma, y sobre todo el establecer con precisión la secuencia exacta a cortar y la posibilidad de heredar las modificaciones realizadas a generaciones siguientes, complicando el acceso y seguridad del proceso para los pacientes (38), en contraparte estos fármacos son efectivos solo en presencia de mutaciones específicas de la CFTR, lo que limita su utilidad a ciertos subtipos de fibrosis quística, además de que su respuesta es variable en cada individuo incluso con la misma mutación y aunque alivian los síntomas (18-44), no corrigen el problema base como lo hace CRISPR/Cas9 brindando una solución definitiva a una amplia gama de mutaciones.

7. CONCLUSIONES

En base a lo expuesto previamente se denota que los avances en CRISPR/Cas abren un panorama prometedor para la terapia génica, especialmente para la fibrosis quística, la cual se consideraba posiblemente incurable, hasta la aparición de este tratamiento, que ofrece tratar el problema desde la raíz, regresando a los pacientes calidad de vida y mejoría de sus síntomas. En conjunto, todos los avances destacan el potencial de CRISPR/Cas9 en la investigación y tratamiento, así pues, a medida que se superan desafíos técnicos y éticos, se vislumbra un futuro prometedor con terapéuticas personalizadas, disminuyendo de igual manera el impacto en la sociedad, pues es una patología que va incrementando y trae consigo costes altos en atención médica debido también a sus complicaciones.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Kim J, Lyman B, Savant A. Cystic fibrosis year in review 2022. *Pediatr Pulmonol.* 2023;58(11):56-62.
2. Bell S, Mall M, Gutierrez H, et al. The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *Lancet Respir Med.* 2020;8(1):65–124.
3. Ratjen F, Bell S, Rowe S, et al. Cystic fibrosis. *Nat Rev Dis Prim.* 2015;1(1):150-56.
4. Stephenson A, Swaleh S, Sykes J, et al. Contemporary cystic fibrosis incidence rates in Canada and the United States. *J Cyst Fibros.* 2023;22(3):443–9
5. Guo J, Garratt A, Hill A. Worldwide rates of diagnosis and effective treatment for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2022;21(3):456–62
6. Zhang B. CRISPR/Cas gene therapy. *J Cell Physiol.* 2021;236(4):2459–81.
7. Shaikh S, Bhandary Y. CRISPR/Cas9 Genome Editing Tool: A Promising Tool for Therapeutic Applications on Respiratory Diseases. *Curr Gene Ther.* 2020;20(5):333–46
8. Foundation Cystic Fibrosis. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry, 2021 Annual Data Report. 2022
9. Gentsch M, Mall M. Ion Channel Modulators in Cystic Fibrosis. *Chest.* 2018;154(2):383–93
10. Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Fibrosis quística. Guía de Práctica Clínica (GPC) y Manual de Procedimientos. Ecuador: MSP; 2013.
11. Farrell P, White T, Ren C, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr.* 2017;181(8):15-9

12. Sly P, Gangell C, Chen L, et al. Risk Factors for Bronchiectasis in Children with Cystic Fibrosis. *N Engl J Med.* 2013;368(21):1963-70.
13. Shteinberg M, Haq I, Polineni D, et al. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2021;397(10290):2195–211
14. Martiniano S, Croak K, Bonn G, et al. Improving outcomes for Colorado’s IRT-IRT-DNA cystic fibrosis newborn screening algorithm by implementing floating cutoffs. *Mol Genet Metab.* 2021;134(2):65–7.
15. Rueegg C, Kuehni C, Gallati S, et al. Comparison of two sweat test systems for the diagnosis of cystic fibrosis in newborns. *Pediatr Pulmonol.* 2019;54(3):264–72
16. Pawlaczyk T, Borysewicz M, Śniatała R, et al. Dental and periodontal manifestations in patients with cystic fibrosis - A systematic review. *J Cyst Fibros.* 2019;18(6):762–71
17. Lapp V, Chase S. How Do Youth with Cystic Fibrosis Perceive Their Readiness to Transition to Adult Healthcare Compared to Their Caregivers’ Views? *J Pediatr Nurs.* 2018;43(7):104–1
18. Clancy J, Cotton C, Donaldson S, et al. CFTR modulator theratyping: Current status, gaps and future directions. *J Cyst Fibros.* 2019;18(1):22–34
19. Yang H, Wang H, Shivalila C, et al. One-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell.* 2013;154(6):1370–9.
20. Leonova E, Gainetdinov R. CRISPR/Cas9 Technology in Translational Biomedicine. *Cell Physiol Biochem.* 2020;54(3):354–70.

21. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 2005;151(8):2551–61.
22. Xu R, Qin R, Xie H, et al. Genome editing with type II-C CRISPR-Cas9 systems from *Neisseria meningitidis* in rice. *Plant Biotechnol J*. 2022;20(2):350–9.
23. Jinek M, Jiang F, Taylor D, et al. Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation. *Science* (80-). 2014;343(6176):58–66.
24. Jiang W, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*. 2013;31(3):233–9.
25. Jo D, Kim J, Kim J. Employing nonhomologous end joining and homology-directed repair for treatment of Leber congenital amaurosis and inherited retinal degeneration. *Cris Genome Surg Stem Cells Dis Tissues*. 2022;52(2):101–10.
26. Cho S, Kim S, Kim J. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*. 2013;31(3):230–2.
27. Zhu Y. Advances in CRISPR/Cas9. *Biomed Res Int*. 2022;2025(2):1–13.
28. Yin H, Xue W, Chen S, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*. 2014;32(6):551–3.
29. Chang Y, Shao J, Gao Y, et al. Reporter gene knock-in into Marc-145 cells using CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination. *Biotechnol Lett*. 2020;42(8):1317–25.
30. Shademan B, Masjedi S, Karamad V, et al. CRISPR Technology in Cancer Diagnosis and Treatment: Opportunities and Challenges. *Biochem Genet*. 2022;60(5):1446–70.

31. Safier L, Zuccaro M, Egli D. Efficient SNP editing in haploid human pluripotent stem cells. *J Assist Reprod Genet.* 2020;37(4):735–9.
32. Ledford H. CRISPR treatment inserted directly into the body for first time. *Nature.* 2020;579(7798):185–8.
33. Suzuki S, Crane A, Anirudhan V, et al. Highly Efficient Gene Editing of Cystic Fibrosis Patient-Derived Airway Basal Cells Results in Functional CFTR Correction. *Mol Ther.* 2020;28(7):1684–95.
34. Amistadi S, Maule G, Ciciani M, et al. Functional restoration of a CFTR splicing mutation through RNA delivery of CRISPR adenine base editor. *Mol Ther.* 2023;31(6):1647–60.
35. Krishnamurthy S, Wohlford C, Kandimalla S, et al. Engineered amphiphilic peptides enable delivery of proteins and CRISPR-associated nucleases to airway epithelia. *Nat Commun.* 2019;10(1):4906–9.
36. McCarron A, Cmielewski P, Reyne N, et al. Phenotypic Characterization and Comparison of Cystic Fibrosis Rat Models Generated Using CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Am J Pathol.* 2020;190(5):977–93.
37. Yan Z, Vorhies K, Feng Z, et al. Recombinant Adeno-Associated Virus-Mediated Editing of the G551D Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Mutation in Ferret Airway Basal Cells. *Hum Gene Ther.* 2022;33(19–20):1023–36.
38. Allan KM, Farrow N, Donnelley M, Jaffe A, Waters SA. Treatment of Cystic Fibrosis: From Gene- to Cell-Based Therapies. Vol. 12, *Frontiers in Pharmacology.* Frontiers Media S.A.; 2021.

39. Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad R, Benedetti E, Grompe M, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol.* 2014;32(6):551–3.
40. Liu X, Li G, Liu Y, Zhou F, Huang X, Li K. Advances in CRISPR/Cas gene therapy for inborn errors of immunity. Vol. 14, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2023.
41. Lu X, Zhang M, Li G, Zhang S, Zhang J, Fu X, et al. Applications and Research Advances in the Delivery of CRISPR/Cas9 Systems for the Treatment of Inherited Diseases. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
42. Chavez M, Chen X, Finn PB, Qi LS. Advances in CRISPR therapeutics. *Nature Reviews Nephrology* 2022;19(1):9–22.
43. Yung NK, Maassel NL, Ullrich SJ, Ricciardi AS, Stitelman DH. A narrative review of in utero gene therapy: Advances, challenges, and future considerations. Vol. 10, *Translational Pediatrics*. AME Publishing Company; 2021. p. 1486–96.
44. Wu SS, Li QC, Yin CQ, Xue W, Song CQ. Advances in CRISPR/Cas-based Gene Therapy in Human Genetic Diseases. Vol. 10, *Theranostics*. Ivyspring International Publisher; 2020. p. 4374–82.

GLOSARIO

FQ: Fibrosis quística

CFTR: Regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística

CRISPR/Cas9: Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespariadas asociada a la proteína 9

DPNT: Diferencia del potencial nasal transepitelial

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

RuvC: Dominio nucleasa

HNH: Dominio helicasa

PAM: Motivo adyacente del protoespaciador

ARNtracr: Ácido ribonucleico transactivador

REC: Lóbulo de reconocimiento

NUC: Lóbulo de nucleasa

ARNsg: Ácido ribonucleico de guía única

RNasaIII: Ribonucleasa tipo 3

DSBs: Roturas de doble cadena las células

NHEJ: Unión de extremos no homólogos

HDR: Reparación dirigida por homología

CRYGC: Gen crystallin gamma C

CCR5: Receptor de quimiocinas CC tipo 5

CAR-T: Células T receptoras de antígenos quiméricos

PD-1: Ligando 1 de muerte programada

EBA: Edición de bases de adenina

Cas9-RNP: Ribonucleoproteína Cas9

CRISPRa: Activadores de las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas

CRISPRi: inhibidores de las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas

EGFP: Proteína fluorescente verde mejorada

AAV: Virus adenoasociados

LNPs: Nanopartículas lipídicas

IUGT: Terapia génica in útero

PE: Editores principales

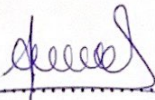
ZFNs: Nucleasa de dedos de zinc

TALENs: Nucleasa de actividad similar a activador de transcripción

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL
REPOSITORIO INSTITUCIONAL**

María de los Ángeles Vera Matute portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **01058055774**. En calidad de autor/a y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación **“Avances de la terapia CRISPR Cas9 en Fibrosis Quística”** de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de éste trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 15 de marzo de 2024

F: 

María de los Ángeles Vera Matute
C.I. 0105805774