

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS AMÉRICAS

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

**TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO
DE LICENCIATURA EN MEDICINA Y CIRUGÍA**

Uso de la tecnología CRISPR para el tratamiento de enfermedades genéticas

Nombre del estudiante:

Luis Felipe Prendas Esquivel

Tutor

Tatiana Vindas Miranda

Sede San José

Diciembre 2025

I- Resumen.

La tecnología CRISPR/ Cas a ganado terreno en la edición genómica por su modelo versátil y económico de emplear. Esta tecnología está basada en el sistema inmune adaptativo de las bacterias y arqueas que la utilizan para adquirir material genético exógeno y adaptarlo al ADN propio. Con base en el sistema CIRSPR se ha desarrollado una serie de aplicaciones médicas en ensayos clínicos y preclínicos que demuestran su eficacia en la edición del ADN para corregir enfermedades genéticas desde trastornos hematológicos hereditarios hasta enfermedades neurodegenerativas.

Este mecanismo inmune posee de tres fases donde un ARN guía forma un complejo la enzima endonucleasa Cas-9 para escindir el ADN del organismo exógeno y evitar la infección. Debido a la sencillez de este mecanismo los investigadores médicos convierten el sistema CRISPR en una herramienta de terapia genética con el propósito de corregir las alteraciones en el ADN que causan enfermedades genéticas desde síndromes hematológicos heredables hasta enfermedades neurodegenerativas.

Los sistemas CRISPR-Cas9 presentan mayores ventajas en comparación con las técnicas ZFN y TALEN como el bajo costo y su facilidad de diseño. Sin embargo, los mecanismos de reparación del ADN, mutaciones tipo Indel y la edición fuera de objetivo son aspectos que ponen en duda la seguridad de las aplicaciones CRISPR y los investigadores deberán de solventar estas dificultades para conseguir la aceptación de esta tecnología como parte de la práctica clínica.

Esta investigación abarca una revisión bibliográfica, que expone las características, herramientas y aplicaciones del sistema CRISPR, así como se compara la eficacia de la tecnología CRISPR con relación a otras formas de tratamientos para enfermedades genéticas. Por último, se recolecta información sobre los últimos avances hasta la fecha; al profundizar en la eficiencia y seguridad presente en los ensayos clínicos para determinar las limitaciones y las barreras que conlleva el desarrollo de técnicas genómicas CRISPR.

II- Summary.

CRISPR/Cas technology has gained ground in genome editing due to its versatile and cost-effective model. This technology is based on the adaptive immune system of bacteria and archaea, which they use to acquire exogenous genetic material and adapt it to their own DNA. This technology has been developed in a series of medical applications in clinical and preclinical trials that demonstrate its effectiveness in DNA editing to correct genetic diseases ranging from inherited hematological disorders to neurodegenerative diseases.

This immune mechanism consists of three phases: a guide RNA forms a complex with the Cas-9 endonuclease enzyme to cleave the DNA of the exogenous organism and prevent infection. Due to the simplicity of this mechanism, medical researchers are converting the CRISPR system into a gene therapy tool with the purpose of correcting DNA alterations that cause genetic diseases ranging from inherited hematological syndromes to neurodegenerative diseases.

CRISPR-Cas9 systems offer significant advantages over ZFN and TALEN techniques, such as their low cost and ease of design. However, DNA repair mechanisms, Indel mutations, and off-target editing are aspects that cast doubt on the safety of CRISPR applications, and researchers must address these challenges to achieve acceptance of this technology as part of clinical practice.

This research includes a literature review, outlining the characteristics, tools, and applications of the CRISPR system, as well as comparing the efficacy of CRISPR technology with other treatments for genetic diseases. Finally, information is gathered on the latest advances to date, delving into the efficiency and safety of clinical trials to determine the limitations and barriers to developing CRISPR genomic techniques.

III- Agradecimientos.

En primer lugar, agradecer a Dios Todopoderoso por permitirme llegar a este punto de mi vida y ayudar a haber concluido esta tesis. En Seguida, a mi padre quien ha sido mi guía y soporte en la vida cuyo esfuerzo y motivación no me permitieron rendirme en la carrera de Medicina. Así mismo, a mi madre por mostrar siempre su amor y compasión incondicional sin importar las circunstancias. Por último, a la Dr. Tatiana Vindas por prestarme su tiempo y paciencia en la revisión de este proyecto.

IV- **Tabla de contenido**

I-	Resumen.....	II
II-	Summary.....	III
III-	Agradecimientos.....	IV
V-	Lista de figuras.....	VII
VI-	Lista de tablas.....	VII
VII-	Lista de abreviaturas en orden alfabético.....	VIII
1.	CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Introducción.....	2
1.2.	Planteamiento del problema.....	3
1.3.	Objetivos.....	6
1.4.	Justificación.....	7
1.5.	Antecedentes.....	11
1.5.1.	Antecedentes históricos.....	11
1.5.2.	Antecedentes internacionales.....	14
1.5.3.	Antecedentes nacionales.....	22
2.	CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	23
2.1.	Qué es y cómo funciona el sistema CRISPR.....	24
2.1.1.	Secuencias repetidas o espaciadores.....	24
2.1.2.	Las enzimas endonucleasas.....	25
2.1.3.	El ARN guía.....	25
2.1.4.	Respuesta inmune de CRISPR-Cas.....	26
2.2.	La tecnología Cas-9.....	28
2.2.1.	Identificar el objetivo e integración.....	29
2.3.	Edición del genoma mediante CRISPR.....	30
2.3.1.	Reparación del ADN.....	30
2.3.2.	Métodos de entrega y vectores del sistema CRISPR/ Cas-9.....	33
2.4.1.	Edición con nucleasa estándar.....	36
2.4.2.	Edición de base.....	37
2.4.3.	Edición principal.....	39
2.4.4.	Edición de epigenoma.....	40
2.5.	Edición fuera del objetivo/ efecto off target.....	41
2.5.1.	Mecanismo de los efectos fuera de objetivo.....	42

2.5.2.	Métodos de detección de edición fuera de objetivo.....	43
3.	CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	46
3.1.	Enfoque metodológico.....	47
3.2.	Fuentes de información.	47
3.3.	Métodos de búsqueda.	47
3.4.	Criterios de inclusión y exclusión	48
3.5.	Proceso de selección de información.....	49
3.6.	Clasificación de la información según niveles de evidencia.	50
4.	CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS.	51
4.1.	Principios y aplicaciones médicas de la edición genética mediante CRISPR.....	52
4.1.1.	Definición e importancia de las endonucleasas.....	52
4.1.2.	Métodos de edición CRISPR	55
4.1.3.	Definición e importancia de las herramientas CRISPR.	57
4.1.4.	Reparación del ADN: NHEJ vs DHR.	60
4.2.	Enfermedades genéticas tratadas con CRISPR y resultados de ensayos clínicos.64	
4.2.1.	Enfermedades hematopoyéticas.	64
4.2.2.	Angioedema hereditario.	66
4.2.3.	Amiloidosis de transtiretina (ATTR).	67
4.2.5.	Distrofias musculares hereditarias.	72
4.2.6.	Otras aplicaciones CRISPR.....	73
4.2.7.	Hallazgos en los ensayos preclínicos.	76
4.3.	Efectividad de CRISPR en comparación con otras terapias.....	79
4.3.1.	CRISPR vs ZFN y TALEN.....	79
4.3.2.	CRISPR vs terapias actuales.	87
4.3.3.	Limitaciones de las aplicaciones CRISPR.	95
4.3.4.	El debate ético.....	105
5.	CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	109
5.1.	Conclusiones.....	110
5.2.	Recomendaciones.	112
	Referencias	114
	ANEXOS	122
	Anexo 1. Clasificación de artículos consultados según nivel de evidencia.....	123

V- Lista de figuras.

Figura 1. Elementos CRISPR.....	26
Figura 2. Mecanismo de acción del sistema CRISPR.....	27
Figura 3. Estructura de la endonucleasa Cas-9.....	28
Figura 4. Pasos de escisión y unión del ADN.	29
Figura 5. Intervención durante la HDR.....	32
Figura 6. Obstáculos y soluciones en la administración del sistema CRISPR.....	35
Figura 7. Edición con nucleasa estándar vs edición de base.	38
Figura 8. Edición principal vs edición epigenética.....	41
Figura 9. Diferencia entre seguridad y eficiencia.....	45
Figura 10. Diagrama de flujo: búsqueda información.....	49

VI- Lista de tablas

Tabla 1. Criterios de búsqueda según objetivo.	47
Tabla 2. Cuadro de Criterios de inclusión y exclusión.	49
Tabla 3. Clasificación de información según evidencia.....	50
Tabla 4. Clasificación y características de CRISPR–Cas.....	54
Tabla 5. Resumen de ensayos clínicos y sus resultados.....	71
Tabla 6. Comparativa de efectividad y tiempo.	86
Tabla 7. Métodos de detección para edición fuera de objetivo.	99

VII- Lista de abreviaturas en orden alfabético.

A: adenosina	INCIENSA: Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud
AAV: vectores virales adenoasociados	
ADN (DNA): ácido desoxirribonucleico	
ARN (RNA): ácido ribonucleico	iPSC: células madre pluripotentes inducidas
ARNcr: ácido ribonucleico CRISPR	Kb: kilo bases
ARNsg: ácido ribonucleico sintético guía	NEJM: <i>New England Journey of Medicine</i>
ARN tracr: ARN transcriptor	NHEJ: unión de extremos no homólogos
AdV: vectores adenovirales	nt: nucleótido
BCL: gen relacionado al linfoma de células B	NUC: lóbulo de nucleasa
BRCA: gen relacionado al cáncer de mama	PAM: motivo adyacente del protoespaciador
C: citosina	pb: pares de bases
Cas: proteína relacionada a CRISPR	REC: lóbulo de reconocimiento
CRISPR: Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Inter-espaciadas	T: timina
DSB: rotura de la doble cadena	TALEN: tecnología de efectores similares a los activadores de la transcripción
G: guanosina	S: fase de síntesis del ciclo celular
HBB: subunidad beta de la hemoglobina	U: uracilo
HbF: hemoglobina fetal	ZFN: nucleasa quimérica de dedos de zinc
HDR: reparación homóloga	
HSC: células madre hematopoyéticas	

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción.

El sistema CRISPR (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas) es un mecanismo inmunológico adaptativo propio de los procariotas que permite incorporar ADN exógeno al material genético propio, para acceder a desarrollar una respuesta contra otros microorganismos (1). La tecnología CRISPR se presenta como una herramienta revolucionaria en el ámbito de la edición genómica, las investigaciones exploran la utilización de este método bacteriano para editar el genoma humano eliminando o sustituyendo genes para aplicar terapias en enfermedades genéticas, infecciosas y oncológicas, con el objetivo de encontrar mecanismos curativos que mejoren la calidad de vida de los pacientes.

Esta investigación pretende ser una revisión bibliográfica, a partir de fuentes médicas de alta confianza, con el fin de analizar, mediante la examinación de resultados encontrados en ensayos clínicos y preclínicos aplicados a modelos celulares humanos, el funcionamiento de la tecnología CRISPR y las aplicaciones terapéuticas que demuestran eficiencia. Así mismo, realizar una comparativa de efectividad entre las herramientas CRISPR, los métodos de tratamiento actuales y otras tecnologías basadas en edición de genes. Esta revisión intenta proporcionar conocimientos relacionados a los avances científicos dentro del ámbito del sistema CRISPR en la medicina genética durante el periodo 2020-2025.

El marco teórico contiene la información respecto a la estructura, análisis de los elementos y características de las herramientas CRISPR-Cas. El marco metodológico incluye los criterios de inclusión necesarios para esta investigación de tipo cualitativa. El capítulo de análisis aborda y ordena la información de investigaciones clínicas nacionales e internacionales para responder a la pregunta investigativa y los objetivos del presente proyecto. Por último, las conclusiones y las recomendaciones al respecto.

1.2. Planteamiento del problema.

Las enfermedades genéticas representan un desafío en el tratamiento e investigación médica, en respuesta a este suceso nacen estrategias centradas en las tecnologías de edición genómica, una tecnología que ha crecido en la última década, donde resalta la edición genética CRISPR que corresponde a una técnica para modificar secuencias en el ADN para corregir alteraciones genómicas. Con el aumento del interés por la edición CRISPR, también incrementado las preguntas sobre la eficacia que puede alcanzar esta tecnología en las aplicaciones terapéuticas.

Es importante contemplar el enfoque multidisciplinario para comprender la eficacia de las terapias genéticas, entre los cuales se debe considerar: los efectos no deseados, la tasa de indeles, el riesgo biológico para el paciente, el coste económico y las consideraciones éticas de la manipulación del genoma humano. A raíz de este hecho, los estudios en el tema intentan confirmar la seguridad de aplicar terapias basadas en la edición CRISPR en seres humanos y comparan la eficacia de las tres tecnologías principales de edición del genoma (2,3,4). Los estudios CRISPR tienen como objetivo esclarecer como mejorar la precisión de la edición CRISPR para evitar la edición fuera de objetivo y establecer los límites que actualmente enfrenta el desarrollo de las aplicaciones del sistema CRISPR en el ámbito médico investigativo.

El impacto de la tecnología genética CRISPR ha alcanzado varios países con altos recursos como China, donde se han concebido investigaciones en la edición del genoma CRISPR para la corrección de mutaciones oncológicas e inactivación de oncogenes (5). En Estados Unidos, la Universidad de Berkeley y el Instituto Harvard han permitido investigaciones preclínicas y clínicas de los modelos de edición CRISPR, estudios que tienen como objetivo los trastornos hematológicos hereditarios (6,1,7).

En Europa la tecnología CRISPR ha demostrado una alta eficacia en los estudios como Pavani *et al.* (2021) (8), quienes desarrollaron modelos aplicables a enfermedades hematológicas congénitas, por su parte Laurent *et al.* (2024)(3) en su investigación revelaron

la eficacia de múltiples tecnologías CRISPR a través del análisis de ensayos fase I-II. Estos estudios comprueban que puede existir una necesidad en indagar sobre la utilidad del sistema CRISPR como método terapéutico aplicable en la práctica clínica. Así mismo, otros estudios toman como población objetivo las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y las enfermedades degenerativas, donde se pretende modificar secuencias del ADN que favorezcan la limitación de un síntoma o el desarrollo de consecuencias biológicas para ampliar la población objetivo de los estudios CRISPR (9,5).

A diferencia de los ejemplos anteriores, en los países de bajo desarrollo económico las dificultades como la falta de inversión y la brecha ética; dificultan los ensayos clínicos en su población. Sin embargo, de este contexto la edición CRISPR es implementada en otras áreas de la ciencia, principalmente en la agricultura; lo cual podría ser el primer paso para lograr la aceptación de la investigación en edición genómica CRISPR en el ámbito médico.

En el contexto nacional no existe gran variedad de precedentes de estudios en genómica, la mayoría de los estudios médicos en Latinoamérica y Costa Rica solo ha realizado revisión bibliográfica para esclarecer los aspectos teóricos o resumir los ensayos clínicos de otros países. El trabajo de Vaglio *et al.* (2023) (10) es un ejemplo de revisión literaria más reciente procedente de Costa Rica; esta investigación se centra en resumir los avances de aplicaciones CRISPR en medicina y comparar la efectividad entre tecnologías genómicas.

Las enfermedades genéticas representan un 7% de la población global según datos de la OMS, si la tecnología CRISPR se enfoca en la meta de convertirse en terapias clínicas seguras debe tomarse en cuenta las dificultades en la administración *in vivo* de herramientas CRISPR y los factores de riesgo que puedan modificar la eficiencia esperada para las modificaciones del ADN. Se pretende con esta investigación realizar una revisión bibliográfica que analice los resultados de los ensayos científicos con el objetivo de definir la utilidad de las terapias genómicas CRISPR para aumentar el conocimiento sobre los mecanismos de acción del sistema CRISPR, herramientas y aplicaciones de la tecnología

CRISPR con el propósito de efectuar las modificaciones que podrían solucionar enfermedades causadas por alteraciones genéticas.

De momento, no existen técnicas CRISPR aprobadas para iniciar como tratamiento en la práctica clínica, estas limitan al estudio teórico y ensayos científicos. Debido a este motivo se realiza la siguiente pregunta de investigación ¿Cuál es el potencial terapéutico de la tecnología CRISPR en el tratamiento de enfermedades genéticas, según la evidencia científica disponible sobre sus aplicaciones, beneficios y límites?

1.3. Objetivos.

1.3.1. Objetivo general.

Analizar el potencial de la tecnología CRISPR en el tratamiento de enfermedades genéticas, considerando sus avances, riesgos y limitaciones.

1.3.2. Objetivos específicos.

- Describir los principios de la edición genética mediante CRISPR y su aplicación en la medicina.
- Identificar las enfermedades genéticas que han sido objeto de investigación con CRISPR y sus resultados preliminares.
- Comparar la efectividad de CRISPR con otras estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades genéticas.

1.4. Justificación.

La tecnología genómica CRISPR se ubica dentro del marco de posibles tratamientos dirigidos a personas con enfermedades genéticas y se define como una edición de secuencias del ADN al utilizar el sistema de endonucleasas bacterianas dirigidas por ARN sintético que puede ser implementado en células humanas para corregir trastornos genéticos. Este método ha sido objetivo de estudio desde los aspectos terapéuticos y éticos que implica el desarrollo de ciencias avanzadas en la salud humana, donde se ha centrado la atención en la precisión de las herramientas CRISPR y la utilidad de las aplicaciones CRISPR en modelos de investigación *in vivo*.

En la actualidad varios ensayos clínicos en la tecnología de edición genómica CRISPR han alcanzado la Fase II, es decir, implementándose en pacientes con enfermedades genéticas. Yang *et al.* (2024) (11) lograron modificar las secuencias de la hemoglobina en busca de corregir la β -talasemia y demostraron una eficacia del 98%, Por su parte, Fragoul *et al.* (2024) (12) es un estudio de Fase III que desarrolla una terapia para tratar pacientes con anemia falciforme con el sistema CRISPR y comprobaron su eficacia con una tasa de indeles <5% de la población.

El trabajo de Gilmore *et al.* (2021) (13) es un ensayo clínico donde se usó el sistema CRISPR que tuvo éxito en disminuir la proteína transtiretina que causa la amiloidosis hereditaria. Sumado a este, Cohn *et al.* (2024) (14) es un estudio de fase I-II desarrollado para la administración de una aplicación CRISPR/ Cas-9 en pacientes con angioedema hereditario, el cual demostró una mejora de síntomas por más de un año en el 73% de los pacientes.

Estos estudios demuestran que el sistema CRISPR puede tener una alta precisión y mantener la eficacia hasta en ensayos clínicos prolongados. Dado lo anterior, la relevancia de llevar acabo estos estudios radica en las posibilidades que posee la modificación del genoma para tratar enfermedades con un componente causal genético en especial en síndromes catalogados como raros.

En comparación con otros métodos de edición genética como ZFN (nucleasa quimérica de dedos zinc) y TALEN (la tecnología de efectores similares a los activadores de la transcripción) la versatilidad que proporciona el método CRISPR permite crear enfoques más variados, además la tecnología ZFN y TALEN requieren una cantidad significativa de elementos sintéticos para modificar el ADN mientras que el sistema CRISPR-Cas presenta técnicas mejor adaptadas a costes menores, así como mejor rendimiento en tiempo y eficacia (10,2).

Existen estudios dedicados a comparar la eficiencia de las tres técnicas de edición genética, donde se concluye que en cuestión de calidad y flexibilidad la tecnología CRISPR proporciona mejores resultados gracias a la precisión del objetivo genético; por lo tanto, es posible continuar expandiendo los conocimientos del sistema CRISPR brinda mayores oportunidades de aplicar terapias genéticas en comparación a sus predecesoras (2,10,15).

El objetivo de todo estudio del sistema CRISPR es lograr métodos aplicables a personas con trastornos genéticos para buscar un tratamiento basado en la edición del genoma que limite los síntomas o elimine la enfermedad subyacente. En Costa Rica los síndromes genéticos presentan entre 3-5% de los nacidos vivos y más del 10% de los mayores de 1 año de vida según el Ministerio de Salud, este es un valor preocupante para las entidades en salud y la tecnología CRISPR ha comprobado que puede ser utilizada a nivel uterino para prevenir la manifestación de genes desde antes del nacimiento.

Costa Rica enfrenta retos en la atención del paciente pediátrico y de los pacientes adultos con enfermedades raras a causa de las dificultades tecnológicas y la indisponibilidad de tratamientos; así como de médicos especializados en el contexto de la salud pública. Este dato resalta la relevancia clínica que tienen los estudios CRISPR y cómo se podría cambiar el enfoque de las terapias en niños con enfermedades genéticas para ser una posible herramienta de soluciones.

Queda en evidencia que la principal población objetivo de los estudios CRISPR son los pacientes con enfermedades que poseen un componente genético alterado. En Costa Rica

el INCIENSA afirma que el Síndrome de Down, las enfermedades hematológicas y la enfermedad de Huntington son las tres enfermedades genéticas con mayor incidencia, donde existe 1 caso de alteración genética cada 10.000 habitantes. Este es un número importante de personas portadoras de alteraciones genéticas y es una población que, a pesar de mantener una calidad de vida estable; el sistema de salud nacional no ofrece terapias avanzadas que mejoren los síntomas o garanticen una menor tasa de hospitalización causada por las complicaciones propias de cada una.

Aplicar herramientas CRISPR en esta población podría significar una ventana de tratamientos nuevos que solucionen los trastornos genéticos, a pesar de este hecho se debe tener en consideración las implicaciones de seguridad de su implementación, lo cual es un tema que pone en duda la utilidad de la tecnología genómica, las restricciones éticas que cambian de acuerdo con la región del mundo y el manejo de efectos adversos, donde la aparición de mutaciones tipo indel es la más observada (10). Es posible lograr la aceptación de la tecnología CRISPR con la apertura y aprobación de los ensayos preclínicos CRISPR en la población nacional que porta enfermedades genéticas.

Los principales beneficiados no solo podrían ser los pacientes con síndromes genéticos, esta tecnología es adaptable a otras enfermedades como en el silenciamiento de oncogenes, el cual produce la proliferación del cáncer, también para mitigar factores cardiovasculares en la población adulta e incluso en enfermedades neurodegenerativas en el adulto mayor (10). Dado lo anterior, resulta relevante reflexionar sobre la importancia que ha adquirido la investigación CRISPR y si la eficacia de las aplicaciones es adecuada para introducirse en la práctica clínica.

Las implicaciones sociales de la investigación CRISPR abarcan la ética y el ámbito jurídico social, al ser una tecnología con potencial para editar el ADN humano recibe diferentes restricciones sobre la accesibilidad de las terapias en la comunidad Centroamericana, los riesgos de efectos no deseados y la probabilidad de generar una desigualdad social.

Knoppers y Kleiderman (2019) (16) afirman que el contexto internacional plantea preocupaciones éticas sobre la eugenesia y el uso indebido de las ciencias avanzadas para mejorar los rasgos en los bebés; además del desacuerdo en el marco jurídico por la falta de legislación sobre la edición de la línea germinal o el uso de edición del ADN. Este fenómeno genera rechazo de la sociedad tanto en países desarrollados como en Centroamérica, así como el descontento general de las poblaciones marginales hacia las investigaciones médicas.

Las investigaciones CRISPR no dejan de ser una herramienta prometedora para la curación de enfermedades genéticas, no obstante, para mantener una equidad del uso de la tecnología CRISPR y una seguridad social-jurídica es crucial profundizar en los conocimientos del sistema CRISPR en conjunto con la investigación ética para mantener una transparencia y regulación adecuada.

Desde el punto de vista académico, la importancia del tema de la edición genética mediante el sistema CRISPR como medio terapéutico; radica en los pocos precedentes que existen de la investigación genética en Costa Rica y el resto de Latinoamérica en la medicina. Lo anterior, debido a que los departamentos investigativos de ámbito nacional se centran en las estadísticas de enfermedades genéticas o las implicaciones éticas de los estudios del genoma, pero existe una brecha de distancia en el conocimiento y la utilización de terapias genéticas.

Por lo tanto, esta investigación procura expandir el conocimiento sobre las terapias basadas en las herramientas CRISPR mediante el análisis de los ensayos clínicos y preclínicos así como de revisiones bibliográficas que involucran a personas con enfermedades genéticas, con el propósito de estimular a los lectores y los investigadores a profundizar en el tema de la edición genómica CRISPR y abrir la oportunidad futura de iniciar investigaciones en Costa Rica, tanto con el sistema CRISPR, como con otras tecnologías genéticas.

Se realiza esta investigación porque, a pesar de la existencia de precedentes sobre el tema de la edición genética CRISPR, se busca aumentar el conocimiento teórico sobre el uso

de las aplicaciones del sistema CRISPR en la terapia de enfermedades genéticas. Este trabajo investigativo es completamente viable, de bajo costo, con facilidad de acceso a la información y contribuye en el desarrollo del estudiante en formación.

1.5. Antecedentes.

1.5.1. Antecedentes históricos.

La historia del descubrimiento del sistema CRISPR tiene dos fases importantes de mencionar: Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna aplicaron por primera vez las tijeras genéticas en células de plantas y microorganismos en 1964 y 1968, respectivamente, lo cual les valió un premio nobel de Química en 2020, pero fue el doctor Francisco Juan Martínez Mojica en 1993 en España quien ya había acuñado el termino CRISPR y las proteínas Cas. Durante el albor de los años noventa las investigaciones del sistema CRISPR eran meramente hipótesis desarrolladas de la observación de grupos bacterianos y archeas porque fue durante el 2000-2010 cuando los experimentos iniciaron en modelos animales y así, los conceptos y el mecanismo de acción del sistema CRISPR adquirieron forma.

Jiang y Doudna (2017)(1), en la Universidad de Berkeley Estados Unidos; proporciona una investigación titulada “CRISPR–Cas9 *Structures and Mechanisms*”, la cual buscaba proporcionar una comprensión avanzada de los mecanismos de la endonucleasa Cas-9 en la escisión del ADN y la formación del espaciador, así como entendimiento de la estructura molecular de Cas-9 y los cambios que experimenta durante el proceso de la activación del sistema CRISPR.

Esa investigación realizo una revisión sobre las funciones de la proteína Cas-9 de *Streptococcus pyogenes* y los investigadores determinaron que los estudios estructurales en Cas-9 permiten explicar la alta eficacia y la especificidad que la convierten en una herramienta de edición genómica importante.

Este antecedente es importante por la información que brinda de la estructura molecular de Cas-9, así como la función de los dominios moleculares y es un precedente de conocimiento en mecanismo de acción CRISPR.

Redman *et al.* (2016) (17) en Reino unido, en su investigación “*What is CRISPR/Cas9?*”; ofrecieron una visión general del sistema CRISPR/Cas-9 y su impacto en la corrección de trastornos genéticos en la población pediátrica y las limitaciones de la herramienta para la época.

La anterior investigación realiza una revisión bibliográfica de 13 ensayos de edición genómica CRISPR en células animales y humanas *in vivo*. Este antecedente afirmó que la principal limitación de las terapias CRISPR es la necesidad de mejorar los vectores para evitar la toxicidad asociada en los procedimientos *in vivo*.

La investigación de Redman y sus colaboradores es relevante para esta investigación puesto que funciona como un precursor de las hipótesis planteadas para el desarrollo de aplicaciones terapéuticas CRISPR en material de enfermedades genéticas hematológicas.

Komor *et al.* (2016) (18), en el instituto Harvard, Estados Unidos, presentaron un estudio denominado “*Programmable Editing of a Target Base in Genomic DNA without Double-stranded DNA Cleavage*”, el cual pretendió desarrollar la técnica conocida como edición de bases, un enfoque que permite sustituir una base de un ADN diana de forma irreversible sin requerir la escisión del ADN o una plantilla donante.

La anterior investigación diseñó una un tipo de componente llamado editor de bases, en conjunto con el sistema CRISPR y se implementó esta técnica en células renales humanas y astrocitos en un modelo *ex vivo*. Los resultados arrojaron una corrección permanente de las bases de 15-75% del ADN total con un indel <1%.

Este antecedente fue primer ensayo preclínico en crear el método de edición de bases para el sistema CRISPR. Así mismo, es un precedente histórico de una de las herramientas CRISPR estudiadas en la actualidad.

Cong *et al.* (2013) (19) en Estados Unidos, desarrollaron una investigación titulada “*Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems*”, la cual propuso comprobar la funcionalidad del sistema CRISPR/ Cas-9 de *S. pyogenes* al aplicarlo en células humanas con el fin inducir una escisión precisa en locus genómicos dirigido por ARNsg. Este ensayo de laboratorio dio como resultado la síntesis del plásmido original de *S. pyogenes* funcional para la edición genómica.

Cong y su equipo transfectaron células renales embrionarias humanas con diferentes combinaciones de componentes CRISPR/Cas-9, lo cual demostró que el sistema CRISPR de *S. pyogenes* puede ser reconstituido en tejidos humanos para facilitar la edición genómica y, posteriormente, se garantizó la existencia del protoespaciador con tecnología de secuenciación.

Este antecedente fue la primera investigación en la cual se creó un plásmido para transferir elementos CRISPR directo a células humanas, por lo tanto, figura como una de las investigaciones pioneras de la aplicación del sistema CRISPR y marca el comienzo de la tecnología CRISPR dirigida a terapias genéticas.

Oost *et al.* (2009) (20), en Países Bajos, hicieron una revisión bibliográfica titulada “*CRISPR-based Adaptive and Heritable Immunity in Prokaryotes*” publicada por la Universidad de Wageningen, donde abordaron estos conceptos desde el punto de vista inmunológico bacteriano profundizando en el mecanismo de acción, la endonucleasa Cas-9 y las secuencias espaciadoras.

El estudio abordó el aspecto teórico del sistema CRISPR revisando la literatura de 46 publicaciones científicas de esa década por medio de un análisis comparativo de los genes Cas y sus variantes en las especies bacterianas, el cual concluyó que faltan muchos

términos y pasos por descubrir del sistema CRISPR, por lo tanto, se debe seguir indagando en el reconocimiento del elemento genético antes convertirse en espaciador CRISPR.

Este antecedente brindó material teórico a la presente investigación porque, es una perspectiva sobre el conocimiento primitivo del sistema CRISPR y las primeras hipótesis sobre la función de los espaciadores y las endonucleasas.

Wiedenheft *et al.* (2009) (21), la Universidad de Berkeley; Estados Unidos, presentaron el estudio denominado “*Structural Basis for DNase Activity of a Conserved Protein Implicated in CRISPR-Mediated Genome Defense*”, cuyo objetivo fue ser uno de los primeros ensayos moleculares de la endonucleasa Cas-1, que tiene como propósito suministrar una base para comprender cómo Cas-1 contribuye a la función CRISPR, este estudio presentó por primera vez un modelo 3D de la proteína Cas-1 en diferentes interacciones y subtipos.

El experimento desarrollado por Wiedenheft y su equipo realizó de la extracción de la endonucleasa Cas-1 de *Pseudomonas aeruginosa* y comparó su estructura con otros tipos de endonucleasa Cas con una reacción a diferentes iones metálicos usando un espectro para cuantificar el experimento. Concluyeron que Cas-1 es un elemento universal en todas las especies bacterianas y podría ser utilizada en modelos eucariotas.

Este antecedente es de suma importancia para la actual investigación porque brindó conocimiento sobre los experimentos rudimentarios primarios sobre los elementos del sistema CRISPR y cómo influye el comprender la estructura para llevar este mecanismo a convertirse en una herramienta genética útil.

1.5.2. Antecedentes internacionales.

A continuación, se mencionarán estudios realizados en distintos países enfocados en ensayos clínicos, revisiones bibliográficas o descriptivos que definen la posición de la tecnología CRISPR a nivel global.

Laurent *et al.* (2024) (3) en la Universidad de Paris-Saclay, Francia, elaboraron una revisión llamada “*CRISPR-Based Gene Therapies: From Preclinical to Clinical Treatments*”. Este estudio trata sobre las diversas aplicaciones de las tecnologías basadas en CRISPR, en estudios preclínicos y clínicos para comparar los avances en ambos campos y destacar los obstáculos actuales.

Esta investigación recolectó los resultados de ensayos en fase 1 y 2 para comparar la efectividad de los métodos CRISPR para concluir que se requiere extender las investigaciones preclínicas y clínicas para conocer los efectos a largo plazo y mejorar los obstáculos de la tecnología.

Esta investigación aportó una comparación de diferentes ensayos de la tecnología CRISPR en el campo de hematología, neurología y la genética al ofrecer información concreta para ayudar a responder los objetivos de la presente investigación.

Yang *et al.* (2024) (11) en China, realizaron un ensayo clínico llamado “*In Situ Correction of Various β -thalassemia Mutations in Human Hematopoietic Stem Cells*”; donde construyeron un método universal de corrección genómica *in situ* de las mutaciones HBB (gen de la beta globina) usando los complejos CRISPR/ARNsg-RNP y la reparación dirigida por homología (HDR) para la corrección de β -talasemias.

El ensayo se llevó a cabo con la recolección de las células madre hematopoyéticas CD34⁺ de sangre de cordón umbilical y sangre periférica de los pacientes del hospital afiliado a la Universidad Médica de Guangzhou. La técnica de administración de la herramienta de edición Cas-9 fue un completo éxito con una alta tasa de escisión del locus HBB y no se encontraron mutaciones indel o escisión fuera del objetivo.

Este antecedente es de suma relevancia para la presente investigación porque es evidencia científica de la eficacia del desarrollo de aplicaciones terapéuticas CRISPR/Cas-9, también presenta una visión de la metodología practicada en los ensayos celulares y los materiales necesarios.

Kiran Musunuru (2023) (9) en la universidad Pennsylvania, Philadelphia; realizó una revisión sistemática de ensayos clínicos y experimentales con el objetivo de demostrar la eficacia de las tecnologías de edición genómica CRISPR, el impacto sobre la investigación y terapias cardiovasculares. Este es uno de los autores más importantes de los últimos 5 años en temática de edición genómica.

Esta investigación se enfocó en analizar los ensayos clínicos y experimentales que utilizaron diferentes tecnologías CRISPR en modelos celulares humanos y animales para comparar su eficacia, edición fuera del blanco y sus componentes necesarios en búsqueda de aclarar cuál de estas tecnologías es la más exacta. Asimismo, Musunuru ofreció una serie de recomendaciones para aplicar las herramientas CRISPR en la prevención de enfermedades cardiovasculares.

Esta investigación fue la fuente de información sobre la teoría base del funcionamiento CRISPR y la aplicación de tecnología CRISPR para la construcción del marco teórico y el entendimiento de mecanismo CRISPR. Además, aporta material comparativo de las tecnologías desarrolladas para la investigación CRISPR.

Congting *et al.* (2023) (4), China, presentaron un estudio denominado “*Off-target Effects in CRISPR/Cas9 Gene Editing*”, donde resumieron los avances tecnológicos en materia de detección de la edición fuera del objetivo al usar el sistema CRISPR para la edición del genoma.

Este antecedente revisó los ensayos preclínicos y clínicos donde se aplicaron los métodos de detección de edición fuera del objetivo, para concluir que la eficiencia y la especificidad son dos parámetros críticos para establecer la seguridad de la edición genómica.

El trabajo de Congting *et al* aportó material referencial sobre los tipos de efectos fuera de objetivo, métodos de detección computarizados y experimentales, lo cual es particularmente útil para la comprensión del sistema CRISPR.

Wienert y Cromer (2022) (22), Estados Unidos, realizaron una revisión bibliográfica denominada “*CRISPR Nuclease Off-target Activity and Mitigation Strategies*” con el objetivo de determinar las fortalezas del sistema CRISPR, las posibles mejoras en la detección del efecto *off target* y describir las posibles estrategias de mitigación de efectos no deseados en la edición genómica CRISPR/Cas-9.

Este antecedente mencionó los estudios *ex vivo* y en *in vivo* en modelos de detección de efectos fuera de objetivo. Wienert y Cromer llegaron a la conclusión que cualquier grado de actividad no intencionada puede ser perjudicial y que los avances en la detección de los efectos no deseados mejoran la posibilidad de que el sistema CRISPR sea un estándar en atención médica.

Esta investigación aportó material referencial sobre los tipos de detección fuera de objetivo para introducir, la metodología de las tecnologías de detección *off target* y cómo afecta los estudios de seguridad de edición genómica.

Misganaw (2022) (23) en la universidad de Debre Tabor, Etiopia, ejecutó una revisión bibliográfica llamada “*Viral Vectors for the in Vivo Delivery of CRISPR Components: Advances and Challenges*” con el objetivo de investigar a fondo los vectores virales para la administración de componentes CRISPR en células humanas y plateó una discusión sobre las restricciones y limitaciones del implemento de virus como vector.

Esta publicación revisó 85 artículos en el área de la medicina, botánica, biología animal y microbiología para comparar los beneficios y desventajas de los diferentes vectores virales. Se concluyó que no existe un único vector viral ideal para la administración de componentes CRISPR *in vivo*.

Este antecedente aportó material teórico de la función, síntesis y administración de los vectores virales en las tecnologías CRISPR, las implicaciones de su uso *in vivo* y los obstáculos que afronta la técnica de virus modificados.

Zhang *et al.* (2021) (5) en Shanxi, China; presentaron una investigación llamada “*Application of the CRISPR/Cas9-based Gene Editing Technique in Basic Research, Diagnosis, and Therapy of Cancer*”; con la meta de proporcionar entendimiento al mecanismo y desarrollo de la edición de oncogenes mediante CRISPR/Cas-9. El equipo indagó a fondo en las terapias desarrolladas para corregir oncogenes y métodos de diagnóstico basados en el sistema CRISPR/Cas-9.

Este estudio fue una revisión bibliográfica 206 artículos sobre los avances en China en terapia oncológica donde se utiliza el sistema CRISPR. En conclusión, el estudio afirmó que la tecnología de edición genómica ha impactado de gran forma la terapia para el cáncer, pero se requiere mejorar la precisión de las herramientas para la detección de objetivo genético.

Este antecedente aportó una perspectiva sobre la evolución del silenciamiento de oncogenes mediante la tecnología Cas-9, dentro del marco de los beneficios y limitaciones de la aplicación del sistema CRISPR en el tratamiento del cáncer para demostrar que el país asiático ha tomado la delantera en tecnología genómica.

Cheng *et al.* (2021) (24), en Nanjing, China, realizaron una revisión bibliográfica designada como “*CRISPR/Cas9 Delivery System Engineering for Genome Editing in Therapeutic Applications*”, en el cual ejecutaron una revisión de los vectores no virales incluyendo el ADN plasmídico el ARNm y la ribonucleoproteína. Además de una discusión a detalle de las estrategias derivadas de vectores para abordar los problemas de mutaciones fuera del objetivo como el desarrollo de nanovectores.

Este estudio realizó una revisión de 70 ensayos clínicos y de laboratorio donde aplicaron plásmidos y otros métodos no virales para la transfección de los elementos CRISPR. Se concluyó que el método de plásmidos basados en lípidos es el vector no viral más seguro y con menos expresión fuera del objetivo y resaltaron la posibilidad de mejorar en nanovectores.

Pavani *et al.* (2021) (8) en la universidad de Paris-Saclay, Francia; elaboraron un ensayo clínico llamado “*Correction of β -thalassemia by CRISPR/Cas9 Editing of the α -globin Locus in*”, el cual propuso usar el sistema CRISPR/Cas-9 para corregir el gen HBB que produce las talasemias mediante la combinación de dos técnicas la reducción de la cadena de α -globina para provocar una delección que regrese el rasgo natural α -talasemia y la integración y expresión dirigidas de un transgén HBB. Para realizar la investigación se obtuvo las muestras de sangre de cordón umbilical de pacientes con β -talasemia y se implementó el mecanismo nickasa Cas-9 en medio *ex vivo*.

Este estudio llegó a la conclusión que la regulación negativa y positiva simultánea de la α -globina y la regulación positiva de la β -globina permiten mejorar con éxito el desequilibrio entre α y β -globina en células de talasemia β^+ y β^0 , la edición de las globinas en las células madre de los pacientes mejora el fenotipo de β^+ y β^0 -talasemia y las La nickasa Cas-9 representa una herramienta segura la edición del genoma en células madre.

En la actual investigación este ensayo aportó datos para la metodología que se debe usar para los ensayos clínicos CRISPR y mostró cómo llevar a cabo el proceso y los datos que deben recolectarse, por ejemplo: los valores obtenidos de la Citometría de flujo, el análisis del ADN, número y tipo de delecciones encontradas y la probabilidad de edición fuera del objetivo.

Janik *et al.* (2020) (2) en la universidad de Lodz, Polonia, realizaron el estudio “*Various Aspects of a Gene Editing System—CRISPR–Cas9*”, el cual propuso una revisión al mecanismo de acción CRISPR/ Cas-9 y las aplicaciones de la tecnología tomando en cuenta las limitaciones y preocupaciones de la comunidad científica en cuanto a la implementación de esta tecnología.

El estudio anterior fue una revisión bibliográfica de estudios para comparar los mecanismos de acción del sistema CRISPR en grupos bacterianos y comparar la efectividad de la tecnología CRISPR contra las técnicas TALEN y ZFN; fue un total de 139 ensayos desde 2014 hasta el 2020, en donde se concluyó que el crecimiento de la tecnología CRISPR/

Cas-9 está proporcionando resultados beneficiosos para la ciencia y será una herramienta clave en salud.

Esta investigación aportó conceptos teóricos sobre el mecanismo y tipos de sistemas CRISPR, así como las aplicaciones en el tratamiento de enfermedades genéticas, oncológicas y las implicaciones éticas que arrastra el sistema CRISPR desde los inicios de su descubrimiento hasta el marco de rechazo de la comunidad científica hacia la aplicación de terapias genéticas.

Wu *et al.* (2020) (15) en la Universidad médica de Massachusetts, Estados Unidos, efectuaron una revisión de la literatura denominada “*Advances in CRISPR/Cas-based Gene Therapy in Human Genetic Diseases*” con el objetivo de conceptualizar avances recientes relevantes para las terapias génicas basadas en CRISPR/Cas para enfermedades genéticas humanas monogénicas.

Esta investigación fue una revisión de 15 ensayos en modelos animales y 14 ensayos preclínicos. Se compararon los métodos de reparación celular y la frecuencia de mutaciones indel para concluir; que la utilización de herramientas de focalización de ARN, CRISPR/Cas tipo II y proteínas de fusión bloqueadoras NHEJ mejora la precisión la terapia CRISPR.

Este antecedente internacional es relevante para la presente investigación porque es una fuente de material teórico sobre los métodos de reparación celular al revisar los resultados de ensayos preclínicos y clínicos de fase 1 y 2 para el manejo de talasemias con el método CRISPR/Cas-9 *in vivo*.

Manghwar *et al.* (2020) (25), una colaboración entre Reino Unido y China, presentaron una investigación llamada “*CRISPR/Cas Systems in Genome Editing: Methodologies and Tools for sgRNA Design, Off-Target Evaluation, and Strategies to Mitigate Off-Target Effects*”, con el objetivo de resumir los métodos para detectar la edición fuera del objetivo y las herramientas de diseño de ARNsg.

Este antecedente es una revisión bibliográfica sobre los tipos de efectos fuera de objetivo y cómo mitigar dicho fenómeno. El estudio concluyó que se necesita más investigación para aumentar la especificidad y sensibilidad en el objetivo, así como evitar el efecto fuera del objetivo.

Esta investigación aportó conocimiento referencial sobre el tema del efecto fuera del objetivo y fue sustancial para el desarrollo del marco teórico y el análisis centrado en la eficiencia de la tecnología CRISPR/ Cas-9 en el presente trabajo.

Anzalone *et al.* (2019)(7) en el instituto Harvard, Estados Unidos; realizaron un ensayo científico titulado “*Search-and-replace Genome Editing without Double-strand Breaks or Donor DNA*”, en el cual planteron un nuevo método para la edición del genoma usando el método CRISPR llamado Edición Principal. La meta de este ensayo era desarrollar una técnica que corrija de manera eficiente la falta de precisión y alcanzara una baja tasa de indel con un mayor control de las mutaciones no previstas.

Por medio del uso de la técnica de edición Principal esta investigación realizó 175 ediciones en células humanas; incluyendo inserciones dirigidas, deleciones y los 12 tipos de mutación puntual; sin requerir roturas de doble cadena o plantillas de ADN donante. Como resultado surgió una nueva herramienta de edición CRISPR que posee una menor tasa de indel y una menor tasa de mutaciones no deseadas.

Este antecedente fue una de las investigaciones más importantes de la investigación CRISPR, gracias a su resultado en la creación de una nueva herramienta de edición genómica que presenta una mejora considerable en comparación con sus predecesoras. Esta investigación aportó la teoría de la Edición Principal de manos de sus creadores.

Frangoul *et al.* (2024) (12), realizaron un ensayo Fase II titulado “*Exagamglogene Autotemcel for Severe Sickle Cell Disease*” con el objetivo de administrar a un grupo de pacientes una herramienta CRISPR llamada *Exagamglogene autotemcel* (exa-cel) para corregir la anemia falciforme hereditaria.

Esta investigación corrigió células madre hematopoyéticas con la tecnología CRISPR, posteriormente, fueron reimplantadas en los 44 participantes. En conclusión, el tratamiento con exa-cel eliminó las crisis vaso-oclusivas en el 97 % de los pacientes con anemia de células falciformes durante un período de 12 meses o más.

Este antecedente es un ensayo clínico que funcionó como evidencia de la eficiencia del sistema CRISPR para tratar enfermedades genéticas y será tomado en cuenta para el análisis de resultados.

1.5.3. Antecedentes nacionales.

En el contexto nacional, no se logró encontrar un precedente amplio de investigaciones publicadas en Costa Rica sobre la tecnología CRISPR, sin embargo, a pesar de esta dificultad existe un estudio tipo revisión bibliográfica, el cual se mencionará a continuación.

Vaglio *et al.* (2023) (10), realizaron una revisión de la literatura titulada “Aplicaciones clínicas de la herramienta CRISPR-Cas”, con el objetivo de resumir las aplicaciones clínicas de las herramientas CRISPR-Cas para fomentar la investigación de este campo en Costa Rica. En esta abordaron varios ángulos de los avances de las aplicaciones clínicas internacionales del sistema CRISPR en terapia de enfermedades genéticas, neurodegenerativas y virales como covid-19, VIH y hepatitis.

Esta investigación recopiló 90 ensayos clínicos de la base datos de Pubmed y realizó una comparación entre las herramientas CRISPR, ZFN y TALEN. Como principal conclusión se rescató el hecho de que quedan muchas variables a mejorar para aumentar su eficacia y seguridad si se va a explotar como método terapéutico, además se destacó como la dificultad más grande la alta probabilidad de edición fuera del objetivo.

Este antecedente proporcionó a la presente investigación una perspectiva sobre la visión actual de los investigadores nacionales y los profesionales en salud sobre la herramienta CRISPR; así como un referente teórico y metodológico.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Qué es y cómo funciona el sistema CRISPR.

El sistema CRISPR–Cas (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) es un mecanismo adaptativo inmunitario presente en bacterias y arqueas que provee protección contra ADN exógeno de plásmidos y virus, lo cual le permite incorporar el material genético al locus CRISPR (2).

El sistema CRISPR-Cas se divide en dos partes, el locus CRISPR y los espaciadores que se encuentran dentro del material genético de la bacteria y codifican la segunda parte: las endonucleasas Cas (proteínas asociadas a CRISPR) cuya función es identificar en ADN exógeno y lo incorpora al ADN bacteriano. Existen tres elementos necesarios para que funcione el sistema CRISPR en las bacterias: el locus CRISPR, las endonucleasas y un ARN procedente del locus CRISPR (ARNcr).

2.1.1. Secuencias repetidas o espaciadores.

El primer elemento son las secuencias repetidas, las cuales consisten en genes agrupados idénticos e intercalados por secuencias llamadas espaciadores formados por 20-30 pares de bases (pb). Los espaciadores corresponden con ADN adquirido por el material genético exógeno, en conjunto las secuencias espaciadoras son conocidas como locus CRISPR. Previo al locus se encuentra la secuencia líder que regula la transcripción de los locus CRISPR. Toda la secuencia es precedida por el operón Cas, el cual codifica las proteínas Cas indispensables para cortar y agregar el ADN obtenido (26,27).

Los genes Cas y su organización varían entre las especies bacterianas, un análisis comparativo revela que la arquitectura del operón-Cas presenta 7 variantes en los genes Cas-1 y Cas-2; también está la existencia de tres genes universales que son Cas-3, 4 y 5, en el resto del genoma se observan 20 genes relacionados al sistema Cas. El gen Cas-1 codifica la endonucleasa Cas-1 encargada de cortar material genético e integrarlo al ADN bacteriano mientras que Cas-2 es una endoribonucleasa que se encarga de sintetizar ARN y cortarlo para iniciar la respuesta adaptativa (26).

2.1.2. Las enzimas endonucleasas.

Las endonucleasas son un elemento completamente necesario para la respuesta adaptativa del sistema CRISPR, estas corresponden a enzimas bilobuladas con una estructura de tres dominios en α -helicoidal y que no comparte similitudes con alguna otra proteína conocida. Incluye dos dominios de nucleasa: RuVC es el dominio que corta cadenas de ADN no complementarios y el dominio HNH se encarga de cortar el ADN en cadenas complementarias y agregarlo al ADN bacteriano. El corte del ADN se realiza en 3pb en la porción 5¹ y 3¹ en una región denominada PAM (Motivo adyacente del protoespaciador) (26).

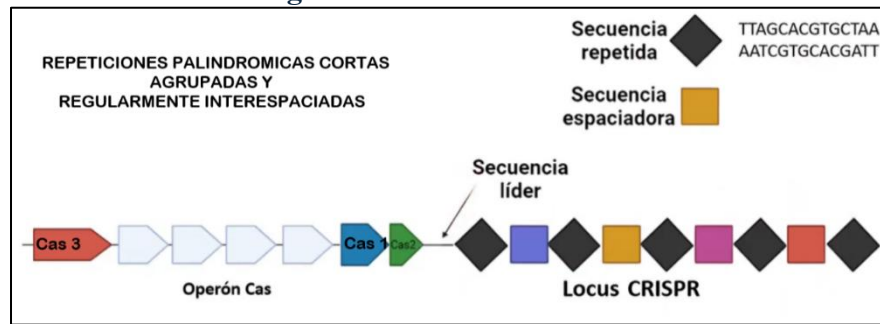
Los sistemas CRISPR se clasifican en dos grupos de acuerdo con las endonucleasas efectoras. La clase 1 se compone de las siguientes endonucleasas: los tipos I que tienen actividad de degradación como Cas-3; tipo III que cortan ADN y ARN; y tipo IV que carecen de genes adaptadores. La clase 2 es igual de abundante en los medios bacterianos y se compone de los siguientes grupos: endonucleasas tipo II que incide el ADN en dos sitios el ejemplo más explorado es Cas-9, tipo V que incluye la subfamilia Cas-12 y tipo VI (26,2).

2.1.3. El ARN guía.

El último miembro del sistema CRISPR es el ARNsg (ARN guía sintético) compuesto por dos partes: el ARNcr (ARN CRISPR), el cual contiene un espaciador complementario a una porción de un genoma viral y durante la función inmunológica del CRISPR participa de reconocer material genético invasor.

El ARNtracr (ARN transcriptor) corresponde a una secuencia que une al ARNcr, posteriormente, actúa como un adaptador para enlazar el ARNsg a la endonucleasa Cas-9 y procederá al paso de escisión el ADN invasor. En las investigaciones CRISPR, el ARNsg es un componente adquirible a partir de plantillas, donde se realizan preajustes que permitan identificar diferentes sitios de unión. (6).

Figura 1. Elementos CRISPR.



Las secuencias palindrómicas significan que se pueden leer los pares de bases de la misma forma hacia la izquierda o hacia la derecha, cortas porque son formadas por 20pb, agrupadas significa que permanecen secuenciadas una tras otra en un solo locus y regularmente interespaciadas puesto que cada secuencia repetida es intercalada por un gen espaciador. Fuente: elaboración propia con base en la referencia (6).

2.1.4. Respuesta inmune de CRISPR-Cas.

El mecanismo de acción del sistema CRISPR a nivel bacteriano consta de tres pasos ordenados denominados la adaptación, expresión y la interferencia; este proceso requiere la actividad de las endonucleasas Cas, en específico, la presencia de Cas-1 y Cas-9. Estas dos proteínas son casi universales en todos los sistemas bacterianos, además se requiere un complejo Cas-3 y la síntesis de un ARNcr.

La adaptación inicia cuando un plásmido o virus inyecta su material genético en la bacteria huésped con el fin de replicarse. En este punto el mecanismo CRISPR moviliza su motor de vigilancia e interviene antes de que el daño comience. Un complejo formado por las endonucleasas Cas-1 y Cas-2 analiza el ADN invasor y encuentra la región PAM, una vez identificado Cas-1 escinde un fragmento de 20pb para ser llevado a la región del citoplasma donde está el ADN bacteriano (2,27).

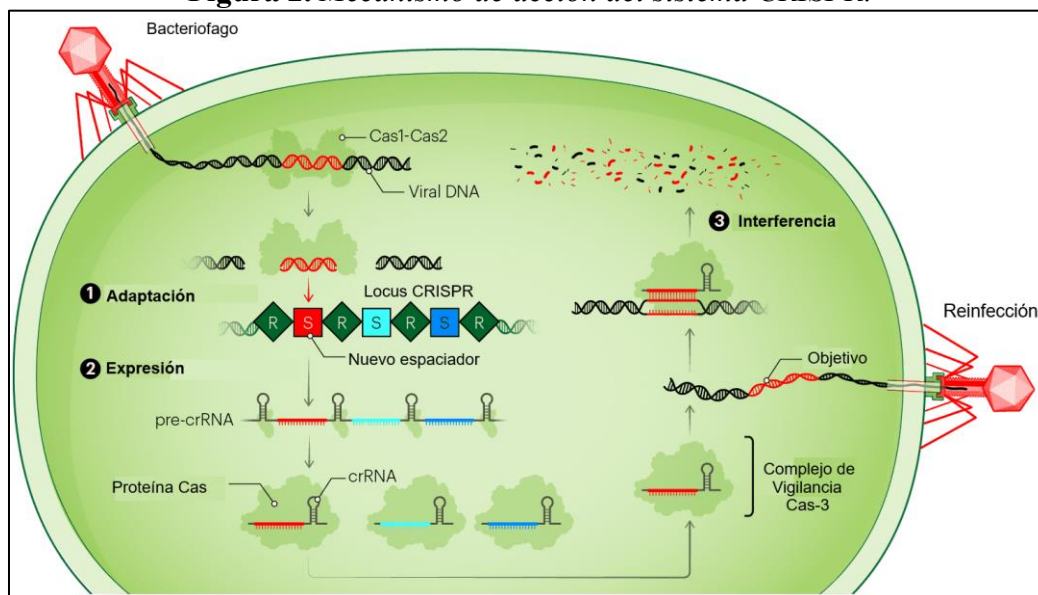
En el locus CRISPR comienza la fase de expresión, Cas-9 realiza una superposición de estructuras, donde el dominio HNH integra la cadena de ADN exógeno y lo convierte en un nuevo espaciador; si el material es ARNsg la endonucleasa Cas-9 transcribe del ARN a pares de base del ADN que se integra en el dominio HNH, una vez emparejados los 20pb con el

ADN huésped los dominios HNH y RuVC cortan el ADN a 3 nucleótidos de la secuencia PAM y el genoma extranjero se transforma en parte del locus CRISPR (2,27).

Durante la interferencia en una segunda invasión por el mismo virus, este introduce su material replicante al citoplasma, pero la bacteria está adaptada para evitar el progreso de la infección, se transcribe el locus CRISPR y las nucleasas Cas-6 separan los espaciadores para transcribir ARNcr que viajará y se unirá Cas-3 (2).

Esta endonucleasa Cas-3 es un vigilante del citoplasma bacteriano, su función es captar el material genético invasor que reconoce gracias a la unión del ARNcr anteriormente sintetizado y procede a fragmentar el material replicante ya sea ADN o ARN del virus, para terminar con la infección. La bacteria contará con un grupo de espaciadores que heredar a cada nueva generación, por lo tanto, cada cepa será resistente a todos los virus con los que se tuvo contacto previamente (2).

Figura 2. Mecanismo de acción del sistema CRISPR.

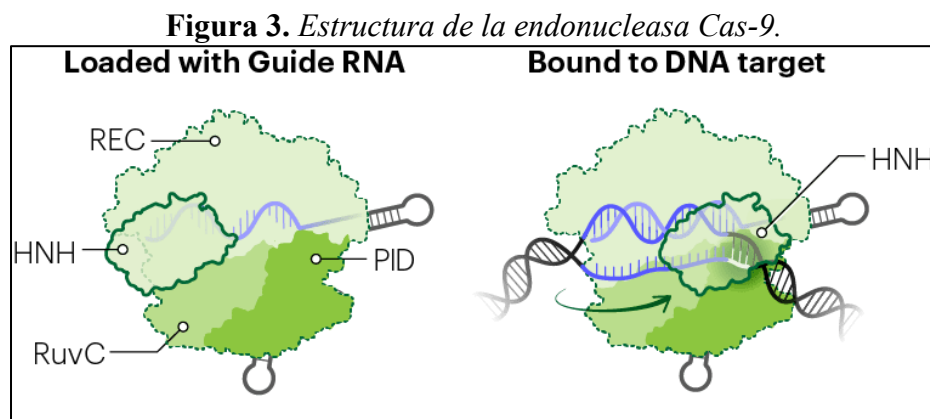


Algunos autores dividen en dos fases el mecanismo de acción, la primera fase es la inmunización que abarca desde la activación de Cas-1 hasta la integración del nuevo espaciador y la última fase se compone de la transcripción del ARNcr hasta la activación de Cas-3. Fuente: tomado de referencia (6).

2.2. La tecnología Cas-9.

La tecnología Cas-9 es la herramienta de edición genómica mediante CRISPR empleada en los estudios de células eucariotas. La proteína Cas-9 se compone de tres partes moleculares esenciales, el lóbulo NUC (lóbulo de nucleasa) que contiene los dominios RuVC y HNH denominadas tijeras moleculares porque cortan la hebra de ADN, el segundo lóbulo transporta y transcribe el ARNsg; y REC, el cual es llamado lóbulo de reconocimiento (27).

Los modelos de edición genómica Cas-9 están basados en su mayoría en *Streptococcus pyogenes* perteneciente al tipo II, este es el mecanismo más comprendido y desentrañado, así como fue el primer sistema adaptado para la edición genómica en células humanas y animales. Existen otros sistemas CRISPR procedentes de otros tipos de bacterias que actualmente están siendo estudiadas como: *Pseudomonas aeruginosa* y sus endonucleasas Cas-1 y 9 aplicado en la medicina antimicrobiana y en la agricultura genética (27). A su vez, las endonucleasas Cas-9 de *Staphylococcus aureus* y de *Neisseria meningitidis* son de menor tamaño, pero igualan la eficacia del sistema Cas-9 de *S. pyogenes*, además son mucho más fáciles de administrar en métodos *in vivo* (15).



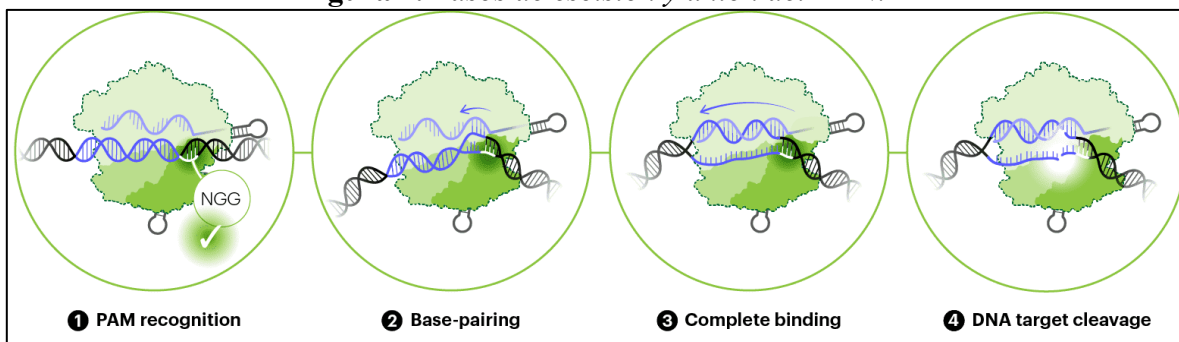
La proteína Cas9 (verde) está cargada con un ARN guía (ARNsg, negro/púrpura pálido). Una vez que Cas9 encuentra su objetivo de ADN (azul profundo) sufre una transformación. El cambio más notable es el dominio HNH que rota y se balancea más cerca del PAM (nucleótidos blancos), PID es el dominio de interacción con PAM, el cual corresponde a la parte que identifica la secuencia PAM. Fuente: tomado de referencia (27).

2.2.1. Identificar el objetivo e integración.

La endonucleasa Cas-9 lleva consigo un ARNsg en su lóbulo REC, este complejo buscará una secuencia de ADN que coincida y localiza la región PAM de 3 nucleótidos, en el caso de *S. pyogenes* la Cas-9 reconoce la secuencia “NGG”. Se procede a desenrollar la doble hélice de ADN adyacente y el ARNsg coincide con el ADN objetivo para cerrar y formar pares de bases complementarias a la hebra de ADN y siempre en la misma dirección se inicia en las bases junto a la secuencia PAM y avanzan hasta el final del ARNsg en sentido 5¹-3¹. En este momento la hebra de ADN y el ARNsg apareados se ubican en un espacio virtual entre el lóbulo REC y NUC sin mezclar la superposición de estructuras manteniendo separadas las hebras de ADN hasta el finalizar la fase de expresión (27).

La escisión del ADN se dará hasta que los 20 nucleótidos del ARNsg se aparen con el ADN objetivo, en los ensayos de modelo celular se ha observado que Cas-9 puede ignorar el apareo de nucleótidos y cortar antes de tiempo o incluso ignorar los preajustes realizados al ARNsg; más adelante se profundizará en la precisión de Cas-9 como herramienta CRISPR. Una vez completado el apareo de pares de base la hebra de ADN se coloca en el dominio HNH y el nuevo espaciador se ubica en RuVC para realizar el corte al mismo tiempo en la región PAM de 3 nucleótidos una vez terminado; Cas-9 no tiene más acciones que realizar y el ADN exógeno queda integrado al ADN objetivo, la brecha entre hebras de ADN es reparada por los mecanismos de reparación celular (27).

Figura 4. Pasos de escisión y unión del ADN.



El complejo Cas9-ARNsg sigue una serie de pasos para garantizar encontrar el objetivo de ADN correcto antes de realizar cortes en ambas cadenas. Si no hay PAM o el ADN adyacente no coincide completamente con el ARN guía, Cas-9 seguirá adelante y buscará en otro lugar. Fuente: tomado de referencia (27).

2.3. Edición del genoma mediante CRISPR.

Otras herramientas de edición genética como ZFN (nucleasas dedos de zinc) y TALEN (nucleasas efectoras activadoras de transcripción) requieren rediseñar nuevas proteínas para reconocer cada sitio de ADN que se desea modificar y la ingeniería de proteínas es una herramienta costosa y compleja de utilizar. La ventaja del sistema Cas-9 es que funciona como un *plug and play* porque solo necesita un ARNsg el cual es más fácil de sintetizar que las herramientas de proteínas.

Para iniciar a editar genes con CRISPR/ Cas-9 en células eucariotas primero se debe programar la nucleasa Cas-9 con un ARNsg diseñado en el laboratorio. El complejo Cas-9/ARNsg buscará en el ADN objetivo una secuencia de 20 nucleótidos complementaria al ARNsg y procederá a la escisión de la misma forma que sucede en células bacterianas, las células pueden morir por la ruptura del ADN, pero existen complejos proteicos que reparan el ADN. La reparación subsecuente del ADN tiene 2 formas en las células humanas: la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación por homología (HDR) (27).

2.3.1. Reparación del ADN.

La reparación de la ruptura de la doble cadena (DSB) es necesaria para evitar la destrucción de la célula eucariota y dependerá de la fase del ciclo celular en la que se encuentre. Durante la fase S1 (duplicación del ADN) se activa la vía de reparación de la unión de extremos no homólogos (NHEJ), el cual es un mecanismo de reparación rápido, pero con probabilidades altas de producir mutaciones tipo indel (inserción o delección) (27).

El proceso de reparación comienza con las proteínas Ku 70 y 80, ambas moléculas se unen a los extremos rotos de la doble cadena de ADN. En seguida, este desenreda la doble hebra en los dos extremos rotos permitiendo la superposición de las hebras, posteriormente las secuencias homologas coinciden y se unen. Los extremos 5' pueden quedar simples (sin apareo de bases) y serán eliminados por una exonucleasa. La acción del complejo ligasa-IV/ Xrcc4 permite la unión de las hebras de ADN homologas, esta reparación carece de precisión

y redundante en una alta tasa de mutaciones como deleciones donde se pierden varios nucleótidos (27).

En el caso de que las mutaciones indels se produzcan en exones codificantes pueden ocasionar codones de parada que terminan silenciando el gen o produciendo proteínas anómalas. En este punto, los investigadores han desarrollado diferentes medios para intervenir a favor de efectos beneficiosos en el tratamiento de enfermedades.

El grupo Bauer aplicó la escisión usando CRISPR/Cas en el sitio de unión GATA1 del potenciador eritroide para desactivar el gen y disminuir la expresión eritroide γ -globina BCL11A causante de la anemia falciforme. En concreto, tres ensayos en pacientes con anemia falciforme se aplicaron extrayendo HSC (células madre hematopoyéticas) y, posteriormente, se editaron con la herramienta Cas-9 para reinsertarlas en el paciente mediante transfusiones. Los resultados fueron prometedores con una reducción de la expresión de BCL11A al 54,6% (27).

La reparación dirigida por homología (HDR) consiste en agregar nuevas secuencias de ADN que coinciden con los extremos rotos del ADN. Para este proceso el investigador puede insertar secuencias, como plantillas modificadas, para producir una mutación específica que corrija los síntomas o modifique efectos negativos del gen (15).

En este mecanismo operan diferentes grupos de reparación como: los ERCC-1, 4, 5 y 6 (*Excision Repair Cross-complementation group*); el complejo XRcc4/ ligasa III/ ADN polimerasa, PARP-1 (poli[ADP-ribosa] polimerasa 1); complejo FANC (complejo de la vía de anemia de Fanconi) y los genes BRCA 1-2; y el polipéptido catalítico activado por el ADN (PRKDC). Este aparato requiere una cromátida molde o hermana para llevarse a cabo, sucediendo en la fase G2 o S1 del ciclo celular. Los dos ADN homólogos se acercan y se utilizan las regiones sin daños como molde para sustituir la región dañada del otro ADN (15).

Este proceso inicia con resección de los extremos 5' en la cromátida lesionada mediante la acción de una helicasa, seguido de la invasión catenaria en la cromátida intacta para formar

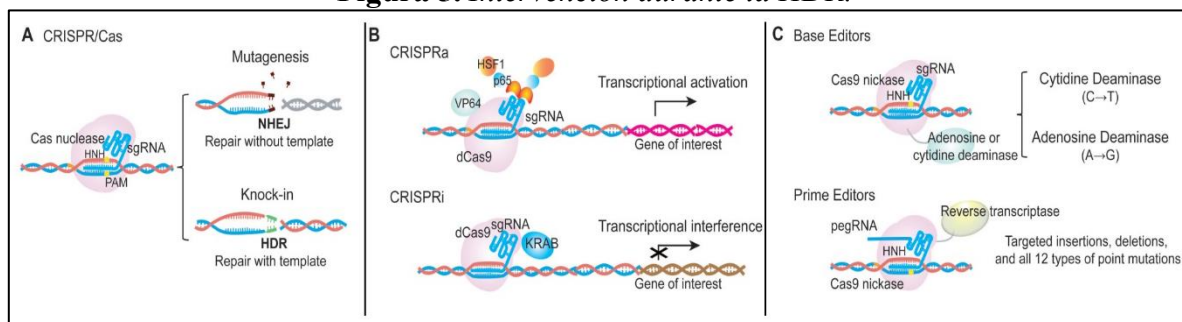
una estructura intermediaria llamada *Hollyday* (estructura de ácidos nucleicos ramificados formado durante la recombinación genética). Para este punto, una serie de proteínas forma distintos bucles que termina en corte, el intercambio de hebras y la ligadura (15).

En la vía de recombinación homóloga se puede intervenir para generar mutaciones específicas basadas en la reparación de bases. Algunos investigadores implementan el sistema CRISPR junto a editores de bases ligados a Cas-9, un ejemplo son los editores de bases establecidos como una combinación de la nickasa-Cas-9-D10A con citidina o adenina desaminasa para que durante la reparación HDR se induzca la transición guanina a timina o adenosina a guanina (2).

Este método es empleado en los ensayos clínicos de supresión de células cancerígenas mutadas en los genes BRCA 1 y 2 (proteína relacionada al cáncer de mama tipo 1 y 2) o en la reparación de genes en enfermedades monogénicas tales como: anemia falciforme resultado de la mutación del gen HBB, fibrosis quística causada por una mutación en el gen CFTR, corregir alteraciones metabólicas congénitas como fenilcetonuria o causar una inserción de fragmentos de exones mediada por HDR que corrijan la Enfermedad de Huntington (15).

La reparación por la vía de recombinación homóloga presenta menores probabilidades de generar efectos fuera de objetivo y permite un mayor control de la mutación inducida, en contraste, esta ruta de reparación del ADN permite un perfil de seguridad amplio para una herramienta CRISPR (24).

Figura 5. Intervención durante la HDR.



En la imagen **(a)** Cas-9 es dirigida por ARNsg para realizar una escisión en una secuencia diana. **(b)** la endonucleasa Cas-9 es unida a proteínas activadoras (CRISPRa) o inhibidoras de la transcripción (CRISPRi). En este caso Cas-9 no cortará el ADN solo funcionará como un mensajero que identifique la secuencia que se quiere bloquear o transcribir. **(c)** durante la HDR se puede editar las bases agregadas durante la reparación con el método nickasa-Cas-9-D10A o editar el primer usando el complejo nickasa-Cas-9-H840A y la transcriptasa inversa. Fuente: tomado de referencia (15).

En la práctica la vía de reparación mediante NHEJ prevalece sobre la HDR incluso en presencia de ADN molde, debido a dos motivos, por una parte, la HDR necesita la aproximación de las cromátidas hermanas, un proceso que depende enteramente de las cohesinas, las cuales deben migrar hasta el sitio de reparación del ADN. Por otra, HDR está presente en las fases del ciclo S y G2, al igual que NHEJ, permanece activa en la fase S del ciclo celular por lo que compiten en la reparación del ADN, a pesar de la existencia de una cromátida hermana (15). En ese caso, aunque estén activadas las nucleasas programadas, la edición genómica por la vía HDR puede fallar por la intervención de la vía NHEJ.

Se han estudiado formas de contrarrestar la prevalencia de NHEJ sobre HDR de forma química o genética, esta manipulación puede ser difícil de estudiar y de aplicar a modelos celulares. Una de las estrategias puede ser provocar una nucleofección en la endonucleasa Cas-9, la nucleofección es un método donde se emplea un pulso eléctrico para introducir ácidos nucleicos en el ADN durante la fase G2 del ciclo celular. Los métodos de intervención se aplicaron en ensayos muy antiguos mayores a 15 años, los cuales en la actualidad no han quedado obsoletos por completo, pero convenientemente han sido modificados a técnicas de proteínas activadoras o inhibidoras (24).

2.3.2. Métodos de entrega y vectores del sistema CRISPR/ Cas-9.

Los vectores son el vehículo que transporta todo el mecanismo CRISPR hacia la célula objetivo, estos pueden ser virales, plásmidos o técnicas químico-físicas. Debido a la alta captación celular, los vectores virales son los preferidos en la administración *in vivo* porque el virus no porta material replicante, por lo tanto, no causará una infección y tampoco sobrevivirá más de lo necesario.

Algunos estudios han revelado mejores resultados con los vectores virales adenoasociados (AAV), los cuales son virus miembros de la familia *Parvoviridae* y sin envoltura, su baja citotoxicidad e inmunogenicidad los coloca como los vectores con menores reacciones adversas en la administración *in vivo* (28).

Los lentivirus del género retrovirus representan un tema controversial ya que el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es utilizado como vector porque tiene una alta tasa de clonación mayor a los AAV y su amplio tamaño le permite transportar la endonucleasa Cas-9 y el ARNsg juntos en una sola unidad vírica. El único problema que presentan es la integración del ADN exógeno fuera del objetivo que induce la activación de oncogenes (23).

Los Vectores adenovirales (AdV) son virus muy pequeños y solo pueden transportar ADN exógeno de 8Kb (Kilobases), este vector se observa en estudios de silenciamiento de genes *in vivo*, el cual es ampliamente usado en el silenciamiento del gen de la α 1-antitripsina y en estudios de oncogenes (23). No existe un vector viral único que posea todas las cualidades y ninguna desventaja, a pesar de este inconveniente, estos siguen representando los vectores mejor adaptados a la tecnología CRISPR.

Las investigaciones demuestran que, para mejorar la eficiencia de la aplicación de herramientas CRISPR, se debe combinar las técnicas de vectores diferentes en específico cuando los componentes son grandes, superiores a 20Kb, por lo tanto, los investigadores siguen buscando nuevos métodos de transporte para los componentes CRISPR (23).

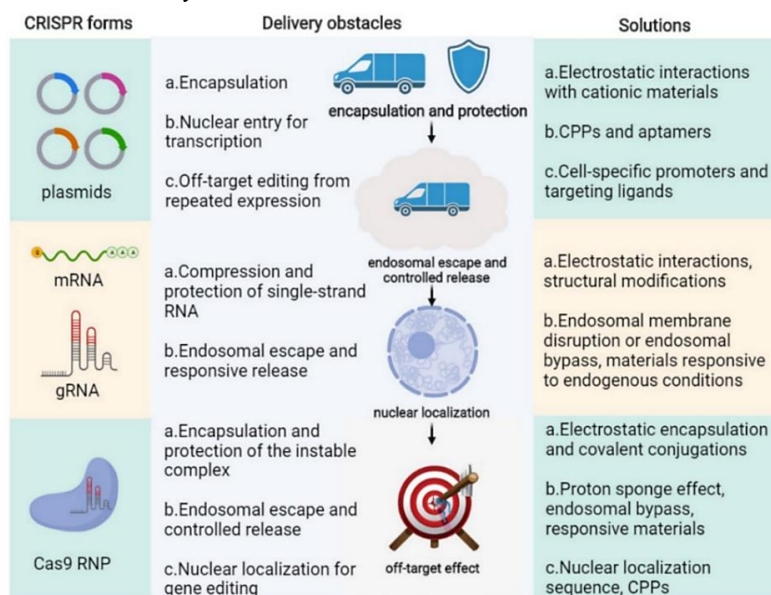
Los métodos físicos se basan en fuerzas dirigidas a las células *ex vivo* para alterar la permeabilidad de la membrana celular. La microinyección es una herramienta muy conocida y empleada desde los inicios de la edición genómica, otro método es la sonoporación que consiste en usar el ultrasonido para alterar la permeabilidad y la electroporación que radica en enviar impulsos eléctricos para obligar a la membrana a crear electroporos que permitan la entrada de moléculas cargadas (27). Los métodos físicos son rápidos y fáciles de aplicar, el único inconveniente es su alta asociación con la destrucción celular.

Los métodos químicos son herramientas *in vivo*; los cuales consisten en usar moléculas absorbibles y compatibles con la membrana como lipasas, polímeros y péptidos, pero han demostrado una baja tasa de transfección y altos costos de producción (27).

Los plásmidos son herramientas para integrar elementos CRISPR de gran tamaño mayores a 30Kb en medios *ex vivo*. Estos plásmidos proceden de colonias bacterianas controladas, como cepas de *Echerichia coli* o *Staphylococcus aureus*. Los primeros casetes de plásmidos fueron desarrollados por Cong *et al.* (2013) (19) con el objetivo de transportar la Cas-9 en modelos celulares animales. En la actualidad se observa la formación de nanovectores basados en plásmidos, estos son formados por moléculas en medios sintéticos que forman una capsula o envoltura sobre los elementos CRISPR en tamaño nanométrico (24).

La nucleolina, lipomasas y nanotubos de carbono son algunos materiales que estructuran nanovectores basados en plásmidos; los estudios demuestran que este tipo de vectores tienen una mejor absorción por parte de células eucariotas y una menor tasa de edición fuera del objetivo en comparación con los plásmidos comunes o los AAV (24).

Figura 6. *Obstáculos y soluciones en la administración del sistema CRISPR.*



RNP: ribonucleoproteína corresponde a una endonucleasa unido aun ARNsg. Fuente: tomado de referencia (24).

2.4. Aplicaciones y herramientas CRISPR.

Las aplicaciones del sistema CRISPR pueden ser utilizadas para corrección de mutaciones, modificación de secuencias, inactivar genes o simplemente estudiar componentes genéticos. Sumando a lo anterior, las herramientas CRISPR funcionan mediante un sistema dependiente de dos elementos: las endonucleasas y el ARNsg; donde cada investigador brinda un enfoque propio al desarrollo de herramientas para la edición del genoma.

2.4.1. Edición con nucleasa estándar.

Es el enfoque original del sistema CRISPR aplicado en organismos eucariotas donde, por medio de un vector, se administra nucleasas que cortan la doble cadena de ADN, se incluye el material genético y finaliza con la reparación de la DSB por el mecanismo NHEJ. Los resultados obtenidos en la edición estándar son dependientes de la cantidad de ARNsg utilizados, la proporción de una plantilla de reparación de ADN o los efectos adversos de la reparación mediante NHEJ, esta reparación es propensa a mutaciones tipo indel que puede desactivar el gen o provocar nuevas mutaciones no controladas.

La nucleasa más usada para provocar la DSB es Cas-9 de *S. pyogenes* (SpCas-9), su popularidad es debido al fácil uso y eficiencia mostrada en la edición génica. SpCas-9 permite ser programada con un ARNsg de hasta 100 nucleótidos de longitud. La endonucleasa SpCas-9 identifica la secuencia PAM NGG (N= cualquier base), en promedio se encuentra 1 de cada 16 posiciones en cualquier ADN, la endonucleasa separa la hebra de ADN y se emparejan los 20 nucleótidos del extremo 5¹ del ARNsg arriba de la PAM. Una vez finalizado el apareo de bases la Cas-9 corta el ADN provocando una DSB, en este punto se pueden utilizar proteínas bloqueadoras de la vía NHEJ para obligar la activación de la reparación mediada por HDR (9,2,28).

Otro ejemplo es la Cas-9 de *S. aureus* (SaCas-9) esta endonucleasa prefiere reconocer la PAM NNGRRT (R= G o A). Con la ingeniería de proteínas se puede provocar variantes en las endonucleasas Cas-9 para identificar otra secuencia PAM. La Cas-12 es otra endonucleasa

capaz de cortar el ADN, solo tiene un dominio catalítico que corta ambas cadenas ADN en una configuración escalonada. Los estudios respectivos han sintetizado variantes de esta proteína y las más eficaces son Cas12a/Cpf1, Cas12a/C2c1 y Cas12e/CasX. (9,2,28).

La edición estándar conlleva riesgos de genotoxicidad, esto quiere decir que el indel provocado puede ser pequeño, formado por pocas bases, o de gran escala y la edición fuera de la diana se relaciona con mutagénesis de oncogenes, este suceso es causado porque existen otras secuencias muy similares al sitio objetivo del ADN (9,2,28).

2.4.2. Edición de base.

La edición de base es el método que proporciona una conversión directa de una base por otra en el locus objetivo, su principal ventaja frente a la edición estándar es que no requiere causar una DSB, reparación HDR o plantilla de ADN donante. Desde el punto de vista terapéutico la edición de base es eficaz en la corrección de mutaciones puntuales. Para llevar a cabo una edición de base se necesita causar una mutación en Cas-9 para inactivar uno de los dominios catalíticos, ya que, mediante este proceso, la Cas-9 solo podrá cortar una hebra de ADN, la proteína resultante es conocida como Nickasa Cas-9 (9,2).

La nickasa es fusionada con una enzima modificadora del ADN monocatenario (desaminasa) también conocidos como editores de bases, el editor de base de citosina convierte Citocina en Uracilo; el sistema de replicación no reconoce el cambio a Uracilo y lo interpreta como una Timina provocando el cambio de C-G a T-A. Los editores de base de Adenina convierten Adenina en Inosina, estos presentan una menor eficacia en células humanas, así como una respuesta negativa de la célula al editor de Adenina (2).

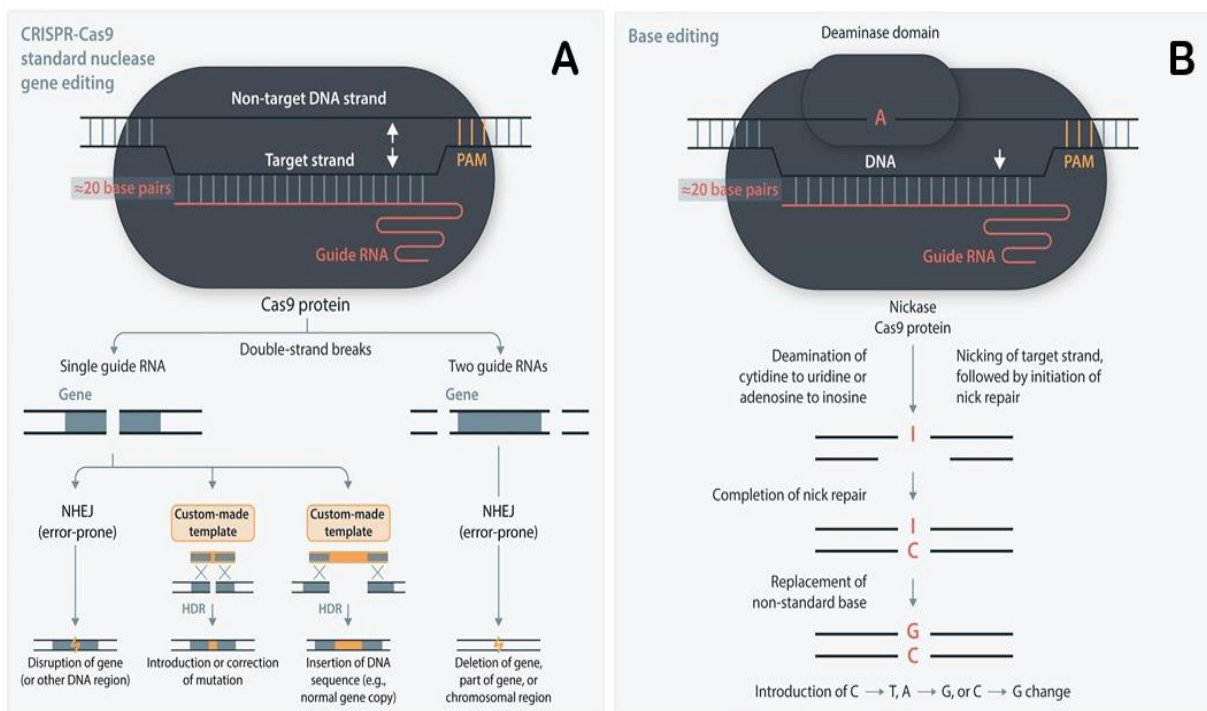
Existe la posibilidad que el cambio de Citosina a Uracilo active la vía de reparación de bases, en ese caso la enzima uracil-ADN-glicosilasa normaliza la secuencia y restablece la Citosina, para impedir este suceso los investigadores diseñan antagonistas de la uracil-ADN-glicosilasa o realizan reprogramación en la nickasa para garantizar la conservación del cambio de bases. Los resultados demuestran un incremento en la eficacia de sustitución de

base junto con una ampliación de la tasa de indeles, la cual se mantiene inferior a lo observado en métodos que inducen una DSB (2).

Según el tipo de mutación que se quiera provocar, la edición de base puede ser útil a pesar del indel esperado. Para silenciar genes al introducir una mutación sin sentido, como el caso del gen PSK-9, que codifica una proteína que disminuye la captación y degradación de los hepatocitos hacia el LDL. También se estudia la posibilidad de introducir una mutación sin sentido y activar el gen SOD1 que codifica la superoxidasa dismutasa-1; un antioxidante neuronal cuya ausencia es culpable del desarrollo de esclerosis amiotrófica lateral (28).

Los editores de base están limitados por la ubicación en donde se realiza el cambio de base; ya que, al solo existir dos versiones de esta enzima, esta ejerce cambios muy específicos con poco espacio para desarrollar variantes de este mecanismo. No existe garantía que la edición de base no ocurra en un lugar del ADN distinto al objetivo, a pesar de este obstáculo, todavía queda mucho sitio para mejorar en la edición de base.

Figura 7. Edición con nucleasa estándar vs edición de base.



A) edición estándar. B) edición de base. Fuente: Tomado de referencia (9).

2.4.3. Edición principal.

El investigador Anzalone y su equipo desarrollaron, la técnica conocida como Edición principal; la meta era disminuir los errores no predecibles. Este método necesita la creación de un ARN principal (ARNpeg); el cual es más largo (170-190nt) que el ARNsg y una nickasa fusionada con la transcriptasa inversa sintética (RT) (2,7).

Los elementos necesarios para llevar a cabo la edición Principal son los siguientes: Secuencia objetivo de 20nt, la cual dirige la nickasa al sitio de ADN específico (PAM); secuencia de andamiaje, la parte del ARN unida a la nickasa Cas-9; secuencia plantilla de transcripción inversa (RT), una secuencia de 25-40nt que codifica la síntesis de ADN para la RT, por último, el sitio de unión del cebador (PBS), 10-15nt que sirven como punto de anclaje a la RT (7).

El proceso inicia cuando el extremo 3¹ ARNpeg se hibrida con la cadena de ADN no objetivo abriendo la doble cadena forzosamente y efectúa un emparejamiento de 20pb. El extremo 5¹ del ARNpeg actúa como un molde para que RT sintetice una nueva cadena de ADN ligada a la cadena objetivo. En el momento que se termina la transcripción inversa del ARN, el extremo 3¹ es cortado por el dominio catalítico y la cadena nueva desplaza la cadena no objetivo provocando una escisión, esto da paso a la ligadura del ADN bicatenario al tomar en cuenta la hebra nueva (2,7).

La edición principal permite eficiencia y precisión; objetivos de PAM más amplios; inserciones de gran tamaño que disminuyen la posibilidad de indels; y por último una flexibilidad moderada en la longitud sintetizable por la RT.

Una investigación relacionada a la enfermedad de Tay-Sachs (una lipodosis degenerativa del sistema nervioso central autosómico recesivo), aplicó una inserción de 4 pb en el gen HEXA (Hexosaminidasa A) para obligar a la activación del gen y logró una eficacia del 30% y un indel 0.8%. Asimismo, otro estudio preclínico corrigió la mutación HBB

(hemoglobina β) causante de anemia falciforme y la β -talasemia introduciendo una secuencia nueva con resultado de eficacia al 44% e indel de 4.8% (2,7).

Respecto a los efectos negativos de la edición principal, existe mucho por discernir, las investigaciones determinan que la principal adversidad de esta herramienta es la edición fuera de objetivo, por lo tanto, se debe comparar la seguridad de la técnica con otras prácticas de edición genómica y esclarecer los sucesos que involucra la cadena de ADN saliente.

2.4.4. Edición de epigenoma.

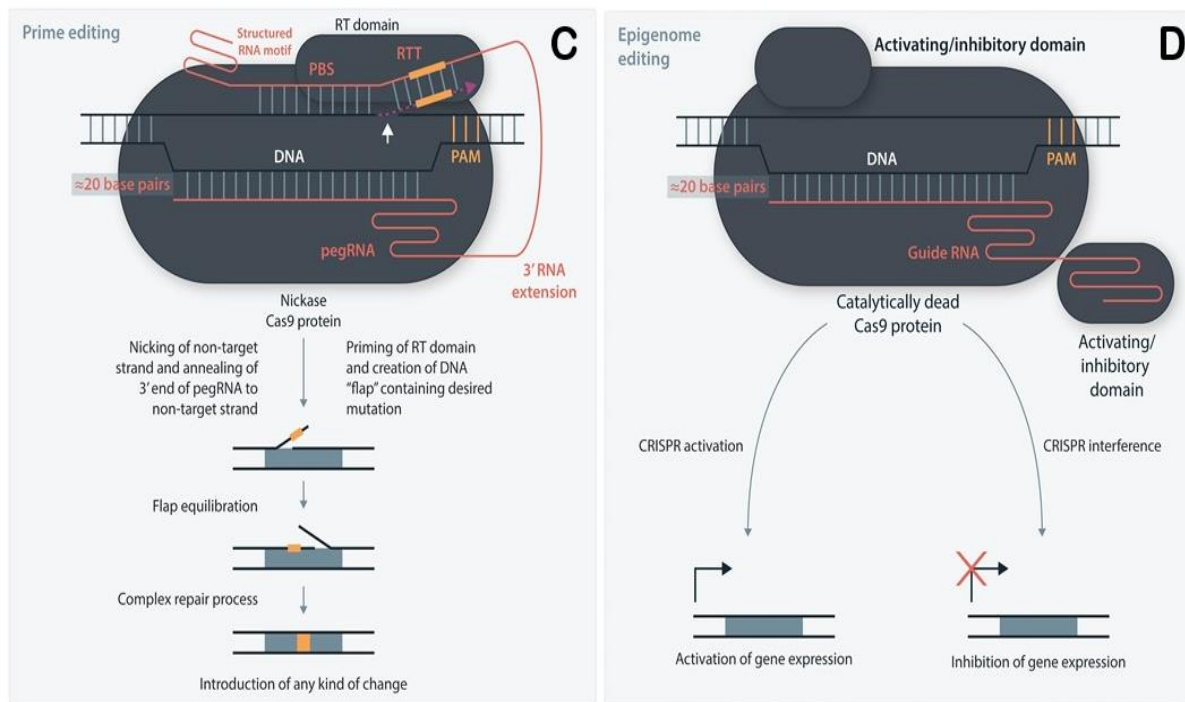
La epigenética es el estudio de los cambios de función de los genes heredables no atribuible a alteraciones en las secuencias de ADN, por lo tanto, la herramienta de edición de epigenoma no ejerce cambios en las secuencias de ADN objetivo, sino que se modifica la expresión del gen alterando su reacción con los elementos del genoma. Para efectuar la regulación epigenética se adquiere una Cas-9 con los dominios catalíticos inactivados o ausentes (dCas-9), por lo que esta no tiene la posibilidad de incidir el ADN, su función es ser un motor de búsqueda. La dCas-9 es unida a un dominio activador o inhibidor de la transcripción conocido como epifector (2,9).

En este mecanismo dCas-9, unido al epiefector, puede ser programado con un ARNsg para buscar la secuencia PAM correcta y que pueda unirse al ADN, ya que como no posee dominios catalíticos no cortará el ADN y el resto del trabajo lo ejerce el epiefector. Un estudio *ex vivo* de células humanas utilizó la proteína KRAB (dominio efector de la caja asociada Kruppel) para metilar la histona del gen HS2 que codifica la hemoglobina fetal (HbF) causante de una variante de anemia drepanocítica. Inducir este efecto sobre la histona disminuye la disponibilidad de la cromatina y, por ende, se sintetizará menos cantidad de HbF mutada (28).

En el síndrome del cromosoma X frágil (SXF) una condición genética que causa discapacidad intelectual y retraso del desarrollo con un fenotipo tipificado. La causa genética se ubica en la expansión de trinucleótido CGG en la región no traducida (UTR) 5¹ del gen FMR1.

El investigador Wang et al (2020) (28), realizó una revisión bibliográfica, en la cual analizaron el método de fusionar la dCas-9 con un dominio catalítico de desmetilación del ADN, se puede hipermetilar las histonas H3k27Ac y HK4me3 que termina en una inhibición de las repeticiones de CGG. En los modelos *ex vivos* se observó la reactivación de las neuronas SXF, sin embargo, este tipo de estudios todavía no avanzan a las fases clínicas, pero son resultados prometedores de posibles terapias.

Figura 8. Edición principal vs edición epigenética.



Fuente: tomado de referencia (9).

2.5. Edición fuera del objetivo/ efecto off target.

Los efectos *off target* son mutaciones resultado de la edición de las secuencias provocan una DSB en un sitio del ADN no objetivo. La edición fuera del objetivo puede provocar inactivación de un gen o la formación de una mutación nueva. En general, los efectos fuera de objetivo son efectos secundarios preocupantes para los investigadores porque afectan la seguridad de las aplicaciones CRISPR (25).

Las investigaciones en la materia demuestran dos tipos de causas que provocan la edición fuera de objetivo. La primera es las regiones homólogas del ARNsg con las regiones no objetivo del ADN; la segunda son los efectos de Cas-9 inesperados en otra región del genoma. Otra forma de clasificar la edición fuera de la diana es en dos tipos: los efectos *off target* esperados por similitud en la secuencia PAM y los efectos fuera de objetivo inesperados en regiones genómicas no relacionadas.

2.5.1. Mecanismo de los efectos fuera de objetivo.

La endonucleasa Cas-9 puede inducir mutaciones fuera del objetivo indeseables y no previstas. Cas-9 puede ignorar hasta 3-5pb sin aparearse con el ADN objetivo al realizar un corte en la doble cadena de ADN, lo cual da lugar a espacios vacíos que incurren en errores de reparación de ADN, a su vez, la reparación NHEJ introduce o elimina nucleótidos en la DSB, posteriormente, une los extremos causando interrupciones en la secuencia que más tarde traducirá proteínas ineficientes (2).

El complejo Cas-9/ ARNsg debe producir una DSB en el sitio diana, una vez realizada la escisión el ADN debe ser reparado por la ruta de reparación dirigida por homología (HDR) o unión de extremos no homólogos (NHEJ). La vía NHEJ tiene una tasa indel demasiado alta, causada por la inserción o eliminación de nucleótidos en las regiones codificantes, por el contrario, la reparación HDR es precisa y proporciona una plantilla de ADN para copiar la cadena rota y conservar la mutación inducida (4).

En otras palabras, durante la edición CRISPR acceder a la reparación NHEJ es causante de mutaciones fuera de objetivo si la Cas-9 realizó una escisión en un sitio no diana, pero al incorporar mecanismos inhibidores de la ruta NHEJ puede garantizarse una reparación correcta HDR, no obstante, si la edición es fuera del objetivo no existe un factor que confirme que los mecanismos inhibidores funcionarán en una región no diana del ADN (4).

El ARNsg y las similitudes entre regiones se estudia como la causa de indeles no deseados. Cuando se administra la endonucleasa Cas-9, la interacción inicial con el ADN aparece al unirse a la secuencia PAM, seguidamente Cas-9 realiza un sondeo aguas arriba de la secuencia PAM para emparejar los pares de bases de ARNsg y el ADN objetivo (25).

Una unión estable necesita 7 a 9 pares de bases que coincidan con el ARNsg. Se puede discernir que la unión a una PAM similar no objetiva producirá una escisión en el ADN si la endonucleasa Cas-9 logra emparejar al menos 7 pares de bases. Desde otra perspectiva, si el ARNsg reconoce desajustes parciales fuera de la secuencia PAM, Cas-9 se unirá regiones no diana (25).

Las translocaciones se observan con poca frecuencia en los estudios de seguridad, pero su aparición puede dificultar la eficiencia de las herramientas CRISPR. La translocación se refiere al intercambio de un fragmento de un cromosoma que se desprende y se une otra región del ADN. De acuerdo con Wienert y Cromer *et al.* (2022) (22) se presentan tres situaciones en las cuales se forman las translocaciones: reparación del ADN por HDR; escisión múltiple de secuencias fuera del objetivo, por último, durante una escisión de múltiples regiones diana.

Para evitar esta situación se recomienda no realizar ediciones múltiples que aumenten los fragmentos libres de ADN, especialmente durante la reparación HDR puesto que la translocación todavía es impredecible (22).

2.5.2. Métodos de detección de edición fuera de objetivo.

La necesidad de predecir los efectos *off target* permitió la creación de herramientas que determinan la edición fuera de la diana o translocaciones producidas por la actividad de Cas-9 en el ADN. Las herramientas *in silico* se refieren a *software* disponible en línea que permite predecir sitios fuera del objetivo en el genoma de referencia para ajustar los parámetros de la PAM (22).

Utilizar el método computacional es parte de la primera fase de detección, aunque son implementados durante el estudio preclínico y no son completamente viables sus resultados deben ser confirmados por métodos experimentales acelulares o de cultivo que aseguren la existencia en el ADN de una edición fuera de objetivo (4).

Los métodos acelulares utilizan el ADN libre de células y reconstruyen la reacción de las endonucleasas sobre el ADN. Hay un repertorio variado de métodos acelulares, la ventaja de estos es su amplia sensibilidad que detecta hasta indeles <0.1%, el problema es el costo económico elevado de los materiales necesarios para llevarlos a cabo (4).

Digenome-seq es la técnica de detección acelular mayormente conocida, el procedimiento incluye la extracción del ADN genómico de las células expuestas a la edición del ADN; ese genoma se incuba con una Cas-9/ ARNsg, después se analiza por secuenciación del genoma completo (WGS), para indicar dónde existen DSB, de esta forma, se determina si la Cas-9 incide fuera de su diana programada (4,22).

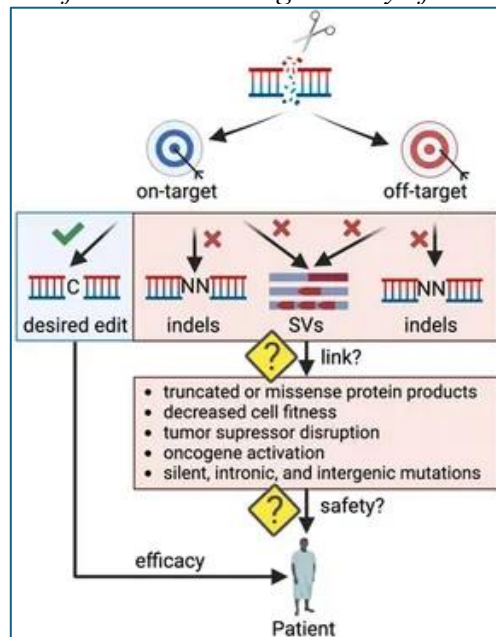
Los métodos basados en cultivo celular evalúan la edición fuera del objetivo en las células editadas, obtenidas a partir de una muestra del tejido, la técnica más precisa hasta el momento es la inmunoprecipitación de cromatina seguida de secuenciación de alto rendimiento (WFS) (4). Esta técnica analiza los clones de células editadas utilizando una dCas-9 que no posee capacidad catalítica y solo marcará los lugares fuera de objetivo que fueron afectados (4).

La detección *in vivo* puede ser todo un reto, es menos frecuente en los ensayos clínicos causado por los riesgos que conlleva la administración del sistema CRISPR directamente en el paciente.

Existen dos métodos; para lo anterior, en primer lugar, en la técnica de descubrimiento de sitios no deseados *in situ* y verificación mediante secuenciación (*discover-seq*), en la cual se utiliza la proteína MRE11 una molécula que participa de la reparación de la DSB para cuantificar los anticuerpos desarrollados por la expresión de MRE11 en un tejido específico. En este método no hay necesidad de agregar componentes exógenos; pero las moléculas que participan de la reparación del ADN o los residuos del proceso son marcadores difíciles de cuantificar.

El segundo método es la integración de componentes exógenos a Cas-9, donde se fusiona dominios o marcadores sintéticos que puedan ser cuantificables en una muestra de tejido. Por ejemplo, la fusión de Cas-9 a estreptavidina monomérica (mSA) la cual durante la reparación del ADN recluta biotinas y vuelve fácil identificar la molécula (4,22).

Figura 9. *Diferencia entre seguridad y eficiencia.*



Los estudios de los efectos *off-target* garantizan la seguridad de la aplicación de una terapia CRISPR y permite realizar correcciones al método antes de implementarse en pacientes, esto mediante la tasa de edición genómica en el objetivo, que es donde se garantiza la eficacia de una herramienta antes de administrar al paciente ya sea en modelos *ex vivo* o *in vivo*. Fuente: tomado de referencia (22).

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

3.1. Enfoque metodológico.

Se realizará una investigación cualitativa, centrada en comprender la evidencia científica actualizada para una revisión bibliográfica en búsqueda de responder al propósito de los objetivos planteados y la pregunta investigativa. El enfoque cualitativo tiene como objetivo establecer estándares de confiabilidad, esclarecimiento y consistencia en el proceso de la revisión bibliográfica, la síntesis es imparcial y transparente lo cual minimiza el sesgo y aporta resultados con alta especificidad.

3.2. Fuentes de información.

Esta investigación analiza fuentes primarias y artículos científicos, seleccionados en un proceso sistemático que incluye tanto revisiones sistemáticas y bibliográficas, así como ensayos clínicos y preclínicos. Las publicaciones seleccionadas fueron elegidas por su relevancia en el campo de investigación y la calidad de la información con el objetivo de proporcionar una base actualizada en el tema de las aplicaciones terapéuticas del sistema CRISPR. Para la búsqueda de información se usaron las plataformas “PudMed”, “Scielo”, “NEJM”, “Oxford Academy”, “Elsevier” y “Cochrane”.

3.3. Métodos de búsqueda.

En este apartado se detallan los elementos usados para la búsqueda de la información correspondiente a cada objetivo específico planteado para la investigación.

Tabla 1. *Criterios de búsqueda según objetivo.*

Objetivo	Descriptor	Motor de búsqueda	Periodo de tiempo	Idioma
Describir los principios de la edición genética mediante CRISPR y su aplicación en la medicina.	Sistema CRISPR/Cas.	PudMed	2020-2025	Español Inglés Francés
	Aplicaciones y herramientas CRISPR en medicina genética.	Scielo.		
	Proteínas Cas-9, Cas-12.	Oxford Academy		

	Reparación NHEJ, reparación HDR.			
Identificar las enfermedades genéticas que han sido objeto de investigación con CRISPR y sus resultados preliminares.	CRISPR y ensayos clínicos. Revisión sistemática y CRISPR. Edición del genoma y técnica CRISPR/Cas. Enfermedades y terapias genéticas.	PudMed Scielo. Oxford Academy NEJM Cochrane	2020-2025	Español Inglés Francés
Comparar la efectividad de CRISPR con otras estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades genéticas.	Tecnologías de edición genómica. Terapias genéticas y edición genómica CRISPR. Enfermedades genéticas y tratamiento. Síndrome genético y tratamiento.	PudMed Scielo. Oxford Academy NEJM Elsevier	2020-2025	Español Inglés Francés

Fuente elaboración propia basado en los elementos y objetivos establecidos.

3.4. Criterios de inclusión y exclusión.

En este apartado se describirán los criterios de inclusión y exclusión aplicados a los estudios elegibles para esta investigación, los cuales fueron: el factor de tiempo no mayor a 5 años, longitud del estudio y la evidencia disponible relacionado al uso de tecnología CRISPR en la medicina.

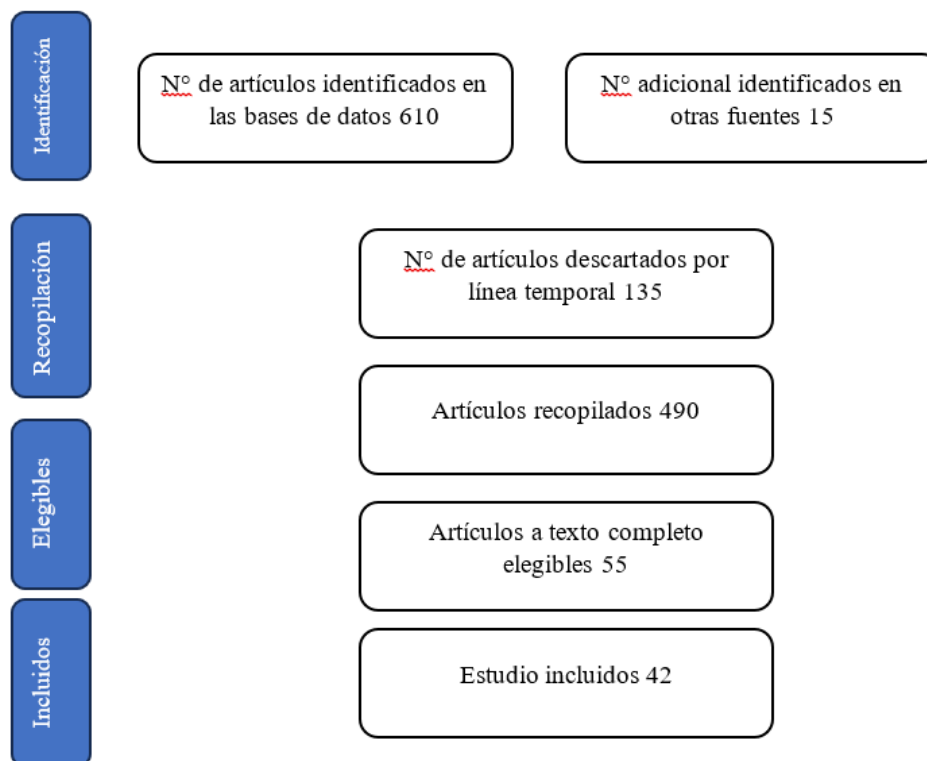
Tabla 2. Cuadro de Criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Artículos publicados entre enero 2020 y julio 2025.	Artículos con una vigencia mayor a 5 años.
Artículos en idioma inglés, español o francés.	Artículos de opinión de expertos, entrevistas o ensayo académico.
Tipos de estudio: revisión sistemática, revisión bibliográfica, ensayos clínicos o preclínicos que incluyan los resultados.	Estudios de diseño longitudinales o transversales.
Artículos con abordaje del tema desde la perspectiva de la medicina o la investigación clínica.	Artículos con abordaje del tema desde otras áreas de la ciencia no referente a la medicina.

Fuente: elaboración propia con base en los objetivos de la investigación.

3.5. Proceso de selección de información.

Figura 10. Diagrama de flujo: búsqueda información.



Fuente: elaboración propia con base en los artículos seleccionados.

3.6. Clasificación de la información según niveles de evidencia.

Tabla 3. *Clasificación de información según evidencia.*

Nivel de evidencia	Tipo de estudio	Cantidad de estudios	(%)
1	Revisión sistemática	9	22
2	Ensayo clínico	8	19
3	Ensayo preclínico	3	7
5	Revisión bibliográfica	22	52
Total		42	100

Fuente: elaboración propia con base en los artículos seleccionados.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Esta sección brinda respuesta a la pregunta investigativa y los objetivos específicos planteados en el capítulo I mediante el análisis cualitativo de los resultados de ensayos clínicos, preclínicos y la bibliografía disponible sobre el sistema CRISPR, además se desglosarán tablas y datos relevantes de los autores seleccionados. Este análisis es fundamental para la estructuración de conclusiones y recomendaciones que definan una visión a futuro para la edición genética mediante las aplicaciones CRISPR.

4.1. Principios y aplicaciones médicas de la edición genética mediante CRISPR.

Para efectos del análisis de este objetivo se plantean una serie de investigaciones con el propósito de esclarecer los principios teóricos y prácticos de la edición genética utilizando las herramientas CRISPR. Lo anterior para definir, los componentes necesarios para realizar la edición CRISPR con el objetivo de corregir mutaciones genéticas y esclarecer algunos aspectos del funcionamiento y eficiencia de las herramientas CRISPR/ Cas-9.

4.1.1. Definición e importancia de las endonucleasas.

El sistema CRISPR es un mecanismo inmunológico de las bacterias y arqueas que supone un método para adquirir ADN exógeno para su posterior reconocimiento y evitar las infecciones por virus. Este mecanismo bacteriano es estudiado por la ingeniería genética desentrañando los componentes y su función en las bacterias, este suceso permitió aplicarlo a células humanas en modelos que buscan editar el ADN para reparar alteraciones genómicas que provocan las enfermedades genéticas.

Las investigaciones analizadas concurren en los aspectos teóricos donde se afirma que el pilar central de la edición CRISPR son las endonucleasas Cas. Las endonucleasas realizan los diferentes trabajos de reconocimiento y escisión del ADN o ARN, por lo tanto, sin una proteína Cas la edición del genoma no será posible. Existen variantes de las endonucleasas de acuerdo con el tipo de bacteria estudiada y presentan funciones similares o completamente

diferentes, en la edición genética se utiliza con mayor frecuencia Cas-9 para provocar una DSB.

El motivo de la eficiencia del sistema CRISPR es la capacidad de Cas-9 para reconocer la secuencia PAM (motivo adyacente del protoespaciador), la cual es una secuencia de tres nucleótidos que se identifica en una hebra del ADN, esta capacidad permite una alta especificidad en los objetivos de edición genética puesto que la endonucleasa puede ser dirigida a cualquier parte del ADN según se requiera en una investigación (15,2,29).

Maganti *et al.* (2021) (29) realizaron una revisión sistemática que encontró 14 estudios donde transfectaron la endonucleasa Cas-9 por electroporación, un solo estudio donde se administró Cas-9 por medio de un lentivirus y 10 estudios que utilizaron Cas-9 en conjunto a un ARNsg y solo 2 administraron por separado el ARN y la endonucleasa. Este estudio reveló la predominancia de Cas-9 como tijera molecular y la importancia de administrar los elementos de edición CRISPR en conjunto para una mayor eficacia.

Bharathkumar *et al.* (2021) (30) introdujeron el concepto de las mutaciones en Cas-9, estas se realizan con el propósito de aumentar la especificidad y la permanencia de la alteración genética. Una forma comúnmente observada para mejorar la especificidad es alargar la secuencia PAM identificable, un sistema CRISPR/Cas-9 basado en *Neisseria meningitidis*, identifica la PAM 5-NNNNGATT y la endonucleasa Cas-9 *Staphylococcus aureus* detecta la PAM 5-NNGRRT, ambas formas presentan una aparición de edición fuera de objetivo <1%.

Otra vertiente de ensayos preclínicos emplea los ortólogos de Cas-9 una modificación relativamente nueva. Un ortólogo es un gen que se encuentra en diferentes especies con un ancestro en común. En el caso de las endonucleasas la Cas-9 utilizada es extraída de *Streptococcus pyogenes* y los ortólogos son las endonucleasas que comparten similitudes y pertenecen a otros grupos bacterianos. Bharathkumar *et al.* (2021) (30) afirmaron que diferentes ortólogos pueden reconocer secuencias PAM diferentes, lo cual permite acceder a

nuevos objetivos en el ADN, esta técnica todavía no ha podido expandirse a la terapia de enfermedades genéticas porque se necesita mayor estudio en seguridad y eficiencia.

La endonucleasa Cas-9 no es una regla definitiva, otras endonucleasas también se pueden implementar en la ingeniería genómica y esto depende del dominio nucleasa. Las endonucleasas Clase I están compuestas por complejos efectores multiproteicos, es decir, que las endonucleasas forman complejos fusionándose con otros componentes del sistema CRISPR para activarse y no presentan una utilidad real en la investigación porque el dominio proteico está dispersado entre las partes del complejo.

La Clase II se define por una única proteína efectora multidominio y multifuncional. Los ejemplos más claros son Cas-9 y Cas-12, donde estas endonucleasas tienen dominios de nucleasa que cortan la doble hebra de ADN y esta es la herramienta más versátil estudiada (31,2,15).

Yacoub *et al.* (2023) (31) apuntan que las endonucleasas de Clase II tienen múltiples utilidades en la investigación genética porque pueden ser empleadas para la maduración del ARNsg que se utilizará para guiar la Cas-9 hacia la PAM; además, se puede emplear Cas-9 para la identificación de secuencias y también pueden ayudar para localizar mutaciones. Yacoub y su equipo llegan a la conclusión de que Cas-9 tomó rápidamente importancia en la investigación genética debido a su eficacia en los ensayos *in vivo* y la versatilidad que posee.

Tabla 4. Clasificación y características de CRISPR–Cas.

Tipo	Modulo efector	Dominio nucleasa	Utilidad	Objetivo	Ref.
Clase I					
I	Cas-2 y Cas-3 Cas-5 a Cas-8 Cas-10 y Cas-11	Dominio de histidina-aspartato (HD) fusionado a Cas-3	Actúan en la fase de interferencia o en la	ADN	(2)
III		HD fusionado a Cas-10	Integración.		

IV		Desconocido			
Clase II					
II	Cas-9	RuvC y HNH	Escisión del ADN.	ADN	(2,30,15,32) (33,29,31)
V	Cas-12	RuvC y Nuc	Alta especificidad y requiere un ARNsg simple.		(2,30,31)
VI	Cas-13	Dominios de unión a nucleótidos (HEPN)	Realiza una única escisión en secuencias de ARN.	ARN	(2,30,31)

Fuente: elaboración propia con base a las referencias anotadas.

En una observación mayor, la tabla 5 presenta un resumen de las endonucleasas y sus funciones donde es notorio como la balanza se inclina mayormente hacia la Clase II por la capacidad de las endonucleasas de no necesitar formar complejos proteicos y escindir la doble cadena del ADN en sitios precisos causa una mayor tasa de estudios. En conclusión, para la ingeniería genética es importante adquirir una herramienta simple, eficaz y con una baja citotoxicidad. Por todo lo anterior, Cas-9 representa esas características y es la endonucleasa de primera elección para realizar ensayos preclínicos y clínicos.

4.1.2. Métodos de edición CRISPR.

La administración del sistema CRISPR puede llegar a ser objeto de debate porque en la edición *ex vivo* se extraen células del paciente que puedan ser cultivadas y transfectadas en laboratorio para su posterior inserción. El método *in vivo* consta de la administración directa de las herramientas CRISPR/ Cas-9, generalmente mediante una infusión.

Laurent *et al.* (2024) (3) muestra un análisis de ensayos clínicos realizados para la corrección de β -talasemias mediante la disrupción genética del promotor de γ -globina o la

disrupción del gen BCL11A; donde 13 estudios utilizaron una herramienta CRISPR/ Cas-9 y 3 ensayos clínicos emplearon la técnica Cas-12. De estos estudios, 4 realizan una investigación de edición CRISPR por medio de la administración *in vivo* de la herramienta de edición en una fase 2.

Cheng *et al.* (2021) (24) recopilaron 26 de ensayos de fase I, de los cuales solamente 2 utilizaron la administración *in vivo* mediante el vector AAV, los 24 restantes utilizaron una edición genética CRISPR/ Cas-9 en medios *ex vivo*, cabe resaltar que solo 6 ensayos tienen como objetivo una enfermedad genética.

Pavani *et al.* (2021) (8) desarrollaron un método *ex vivo* para la edición de células madre hematopoyéticas pluripotentes mediante la eliminación del gen HBA2 que codifica las cadenas α y la integración dirigida de un transgén de β -globina en sustitución del gen HBA2, esta técnica buscó corregir la β -talasemia y requiere una muestra de células madre para, posteriormente, realizar un trasplante autólogo con células modificadas por la tecnología CRISPR.

Sánchez *et al.* (2021) (34) analizaron 8 estudios preclínicos donde se administró la edición CRISPR *in vivo*, también incluyeron 3 estudios *ex vivo* para tratar mutaciones oncológicas. A su vez, la revisión sistemática de Maganti *et al.* (2021) (29) encontró 15 ensayos preclínicos que emplean el método *ex vivo* de electroporación para la administración de herramientas CRISPR y conducidos por vectores VV6 y oligonucleótidos.

Wu *et al.* (2020) (15) analizaron 3 ensayos clínicos sobre corrección de enfermedades hematológicas genéticas, en los cuales 2 de estos ensayos aplicaron una terapia *ex vivo* donde implantaron en las pacientes células madre pluripotentes modificadas y un ensayo clínico en pacientes con amaurosis congénita en los cuales se administró directamente en el glóbulo ocular el material de edición CRISPR/ Cas-9.

Cabe destacar que, en las investigaciones citadas, se observa un predominio del método *ex vivo* en la administración de editores CRISPR/ Cas-9. Concretamente, la gran mayoría de

investigaciones de fase 1 prefieren emplear métodos *ex vivo* con muestras de células de somáticas o de células madre. Este fenómeno se debe al motivo de la seguridad, ya que mediante métodos *in vitro* y cultivo celular es posible centrarse en la eficacia de las alteraciones provocadas en las células y medir el grado de indel provocado, sin causar daño al paciente. En los estudios clínicos sobre corrección de enfermedades hematológicas, como la anemia falciforme o β -talasemias, el método *ex vivo* permite controlar las células para el trasplante autólogo.

A pesar de que el método *ex vivo* es el más empleado, Laurent *et al.* (2021) (3) señalan que, aunque las células madre hematopoyéticas pueden purificarse y modificarse con este método *ex vivo*, los componentes CRISPR/ Cas-9 pueden administrarse sistemáticamente para llegar a varios tejidos y es necesario un vector como los AAV, los cuales presentan muy baja citotoxicidad y reacción inmune. Este es un enfoque que se analiza más frecuentemente en investigaciones con enfermedades genéticas no hematológicas, pero este proceso requiere una dosificación específica y la elección del serotipo de vector adecuado.

4.1.3. Definición e importancia de las herramientas CRISPR.

La evolución y el refinamiento de las técnicas CRISPR/Cas-9 ha llevado al desarrollo de cuatro herramientas de edición genómica, para determinar cuál es la herramienta más eficiente se debe considerar el mecanismo y la probabilidad de producir edición fuera del objetivo.

Al respecto, la investigación de Bouchard *et al.* (2024) (33) determinó que la edición de base se lleva a cabo causando una mutación en la endonucleasa Cas-9 con el objetivo de que solo posea un dominio de nucleasa; esta endonucleasa es llamada nickasa. Gracias a la fusión de la nickasa con una enzima adenosina desaminasa, se logra modificar los pares de bases A-T y reemplazarlos por el par de bases G-C durante la replicación o se fusiona la nickasa con una citidina desaminasa para modificar C-G en U-G. Esta aplicación es útil para corregir mutaciones muy puntuales, pero está limitada al par de bases diana.

Musunuru (2023) (9) afirma que la edición de base puede lograr una eficiencia cercana o igual al 100% en células no proliferantes y es un método que mezcla la eficacia de la reparación del ADN por la vía NHEJ y la precisión de HDR, lo cual es superior a la edición estándar. No obstante, la edición fuera de objetivo es muy discordante entre investigaciones, en tanto es de alta frecuencia en estudios fase 1 y muy baja en estudios animales.

Además del anterior inconveniente, Janik *et al.* (2021) (2) concluyen que la célula puede acceder a la reparación por escisión de bases (BER) para corregir la mutación agregada por la nickasa y no existe un método que garantice la permanencia del cambio de bases.

El desarrollo de las herramientas CRISPR ha permitido nuevos avances en la ingeniería epigenética; en este campo de investigación se busca controlar los elementos que activan o desactivan la expresión génica sin causar cambios en las secuencias del ADN (2). Martin y Wassef (2024) (35) demostraron dos mecanismos de edición de epigenoma, la interferencia CRISPR (CRISPRi) y la activación CRISPR (CRISPRa), modelos que emplean la proteína dCas-9 una endonucleasa cuyos dominios nucleasa están desactivados y funciona como guía de herramientas de transcripción.

Janik *et al.* (2021) (2) y Martin y Wassef (2024) (35) observaron en sus respectivos trabajos como principal ejemplo de la edición epigenoma la fusión de la dCas-9 con el dominio KRAB (caja asociada a Kruppel); en este método KRAB desactiva los reguladores de la cromatina CBX5/HP1a (proteína heterocromatina 1 alfa), SETDB1 (metiltransferasa de histona bifurcada del dominio SET-1) y NuRD (remodelación de nucleosomas y desacetilasa), cuya acción reduce la accesibilidad a la cromatina y por lo tanto inhibe la transcripción de genes.

Otras formas de emplear la dCas-9 se observan en: la metilación de histonas donde se fusiona la endonucleasa con una metilasa que indispona la histona para la transcripción, la reprogramación trans-epigenética que consiste en metilar el ADN en las secuencias que corresponden a factores de la transcripción y los factores reguladores de genes para permitir intervenir en mutaciones antes de su activación (35).

Según Bharathkumar (2021) (30) el anterior enfoque permite desarrollar nuevas terapias en la medicina hematológica con el objetivo de silenciar el gen de la globina, la inactivación de los genes PETN y p53 así como del oncogén de la β -catenina en el cáncer hepático.

De acuerdo con la información antes detallada sobre la edición epigenoma se ha observado un problema clave: la falta de crecimiento de la tecnología CRISPR en el campo de la epigenética, ya que los estudios muestran pruebas preclínicas en células humanas o animales, pero muy poca evidencia sobre su aplicación en estudios clínicos de seguridad y tratamiento. Lo cual permite concluir que las técnicas donde se emplea la herramienta dCas-9-KRAB y dCas-9/ metilasa demuestran una alta especificidad y precisión mayor a la edición de base o el método de edición estándar, pero no ha sido igual en la aplicación como terapia de enfermedades genéticas.

La edición principal es el método basado en la unión de una nickasa y una transcriptasa inversa que permite sintetizar una nueva secuencia de ADN después de la PAM al sustituir más de 20nt de una secuencia mutada. Bouchard *et al.* (2024)(33) reportaron varios estudios en estado preclínico con la utilización de la edición de base para corregir mutación F508 y R785 en el gen CFTR (regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística) que causa la fibrosis quística, en los cuales se empleó edición principal para corregir el gen de la interleucina 2 (IL2RG) que causa la inmunodeficiencia ligada a X. Por su parte, la distrofia muscular de Duchenne presenta varios ensayos clínicos que ejecutan esta herramienta para sustituir las secuencias completas de las deleciones causantes de la pérdida completa de la expresión funcional de la distrofina (2).

Se han realizado varios ensayos clínicos *in vivo* de herramientas CRISPR con resultados de eficiencia de 25-50%; esto gracias al uso como vector de los AAV y AdV que permiten una mejor distribución sistemática (33). Musunuru (2023) (9) informó que en cuanto a la amiloidosis por transtiretina se ha explorado tanto la edición principal como la

edición estándar para eliminar o sustituir una secuencia mutada por hebra de ADN sana para la edición somática de gen TTR (transtiretina).

El inconveniente primordial de la edición principal es la selección del vector, Bouchard *et al.* (2024) (33) expresaron que el tamaño de los elementos necesarios puede complicar o disminuir su eficiencia si se administra en partes separadas mediante vectores virales. Por este motivo los plásmidos y los métodos físicos ganan terreno en la edición principal porque permiten administrar todo el complejo Cas-9/ transcriptasa y el ARNsg con la longitud que sea necesaria.

Al analizar los estudios antes citados, se observa una mayor evidencia de la importancia de la edición principal como método terapéutico para enfermedades genéticas, en comparación con la edición del epigenoma y la edición de base presenta solidez en los estudios preclínicos junto a mayores enfoques en los estudios clínicos. A pesar de ello, no se revela ninguna información que sugiera que presenta menor probabilidad de edición fuera de objetivo o de reacciones adversas.

Sumado a lo anterior, esta es la técnica más complicada de las cuatro puesto que necesita la estructuración de una nickasa, un ARN de 20 o más nucleótidos y la agregación de una transcriptasa inversa. La edición estándar sigue siendo la principal forma de edición CRISPR en los ensayos clínicos que se analizar en las secciones más adelante.

4.1.4. Reparación del ADN: NHEJ vs DHR.

La reparación del ADN en la edición de secuencias mediante CRISPR es un aspecto fundamental de los principios CRISPR y la formación de nuevas herramientas de edición genómica. La reparación NHEJ (Unión de Extremos No Homólogos) está presente en cualquier fase del ciclo celular sin restricciones y permite la unión de la doble ruptura de ADN mediante la acción de una ligasa-IV, este proceso presenta una agregación o pérdida de nucleótidos, lo cual puede inducir la desactivación de la modificación realizada y aumenta la probabilidad de indel. (34).

La HDR (Reparación por Homología) consiste en sintetizar una secuencia homóloga a una plantilla de ADN conservando la alteración inducida, dicha plantilla es agregada por el investigador o la misma célula se encarga de proporcionarla de una cromátide hermana, este proceso solo está activo durante la Fase S y G2 del ciclo celular; para acceder a la reparación HDR es necesario inducir el proceso bloqueando las proteínas de la vía NHEJ (34).

La reparación HDR presenta una baja probabilidad de formación de indels y varios de los estudios analizados indican que los investigadores la prefieren sobre la ruta NHEJ, este es uno de los métodos de mitigación de edición fuera de la diana más efectivos que existen. Maganti *et al.* (2021) (29), realizaron una revisión sistemática donde se incluyen 9 estudios que utilizaron la reparación HDR con una plantilla donante administrada mediante AAV6. Los 6 estudios restantes emplearon NHEJ y demostraron una mayor aparición de indels en comparación con la ruta HDR.

El ensayo clínico realizado por Fragoul *et al.* (2024) (12) y la investigación CRISPR de Sharma *et al.* (2023) (36) se enfocaron en tratar las β -hemoglobinopatías editando el gen HBB (hemoglobina- β) en las células madre donadas de pacientes y editadas en el método *ex vivo*. Esta estrategia permite un control absoluto sobre los estados celulares facilitando la reparación HDR, ya que para células madre es importante reducir al mínimo la posibilidad de producción de indels porque las células modificadas serán trasplantadas de regreso al paciente y deben ser células funcionales o el paciente sufrirá los efectos secundarios.

De acuerdo con Laurent *et al.* (2024) (3) la ruta de reparación por homología demuestra un potencial amplio en los ensayos preclínicos CRISPR para corregir las mutaciones de la distrofina y la introducción exitosa de una plantilla donante de exón 52 y 79 de secuencia normal. El inconveniente principal en las investigaciones relacionadas a la distrofina es la baja disponibilidad de muestras de tejido muscular, esto es debido a la baja incidencia de las distrofias musculares y la baja esperanza de vida de los pacientes.

Yacoub *et al.* (2023) (31) afirmaron que los investigadores escogen la HDR por elección al permitir un estricto control sobre las mutaciones inducidas porque las rupturas en la doble cadena activan inmediatamente la reparación NHEJ en la cual se introducirán pb en ambos extremos, lo cual elimina la alteración inducida, con la agregación de una plantilla donante sumado a proteínas bloqueadoras de NHEJ, puede evitarse la pérdida de nucleótidos y conservar con mayor frecuencia la edición en la secuencia.

Según Sánchez *et al.* (2021) (34), la reparación por homología tiene alta precisión y mayor permanencia de la mutación inducida. Según el tipo de herramienta CRISPR empleada su eficiencia es baja en relación con NHEJ y de poca disposición en las células al estar ligado a la fase S o G2 estrictamente. En las aplicaciones CRISPR para tratar enfermedades genéticas es un factor primordial la alta precisión de los elementos de edición porque entre mayor precisión se pueda concebir mayor será la seguridad de la edición genómica CRISPR.

La baja disponibilidad y la necesidad de proteínas efectoras inhibidoras de la ruta NHEJ representan las principales desventajas de la reparación por homología, Janik *et al.* (2020) (2) concluyeron que la indisponibilidad de la ruta HDR puede convertirse en una extensa dificultad. A pesar de lo anterior la precisión y permanencia de la edición permiten que la reparación por homología se presente como una opción viable para mejorar la eficiencia de las aplicaciones CRISPR, en específico en edición de células madre una modalidad que se enfoca en realizar toda la fase de edición *ex vivo* al controlar y monitorear los cambios en el ambiente celular.

La reparación NHEJ presenta una abundante disponibilidad por estar presente en cualquier fase del ciclo celular, el principal obstáculo es la aparición de edición fuera de objetivo y la introducción de mutaciones tipo indel. En los estudios preclínicos basados en enfermedades genéticas, se observa frecuentemente la ruta NHEJ, este suceso se presenta porque es un mecanismo más económico y de menor complejidad; mientras que, su contraparte, la reparación HDR, requiere proteínas efectoras que estimulen una célula hacia este tipo de reparación, lo cual consume tiempo.

Laurent *et al.* (2024) (3) apuntan que ambas reparaciones se implementan en la reparación del gen de la distrofina causante de la distrofia de Duchenne, pero la ruta NHEJ permite eliminar el exón mutado y reincorporar la secuencia con una debida cantidad de pb. Al respecto, los estudios preclínicos revelan que la mutación inducida se mantiene hasta 19 meses de observación. Por lo tanto, aunque existe una posibilidad de aparición de indeles la ruta NHEJ puede ser igualmente eficaz en la permanencia de la edición.

No se observa en la bibliografía consultada una predominancia total de la utilización de una reparación del ADN específica, en tanto los experimentos CRISPR son versátiles siempre que estén sujetos a cambios en beneficio del objetivo genético. Al final el propósito es beneficiar al paciente con la edición de genes que provocan su enfermedad y las herramientas CRISPR evolucionan al priorizar la seguridad biológica.

En la revisión de Yacoub *et al.* (2023) (31) analizaron las implicaciones de optar por la reparación NHEJ en enfermedades oftálmicas congénitas donde una inserción o eliminación de nucleótidos mayor a 3pb no respeta la regla de la PAM. Como resultado se obtuvieron dos sucesos: el primero es la traducción de una proteína truncada o incompleta causada por la inserción sin sentido de nucleótidos; y la segunda opción es la inactivación completa del gen por la imposibilidad de leer los codones adecuadamente durante la traducción.

Musunuru (2023) (9) expone que introducir mutaciones sin sentido no es una estrategia negativa porque en el concepto de desactivar genes que traducen a una proteína molecularmente inestable se opta por silenciar las secuencias al irrumpir su continuidad, ya que el editor de base C-U y A-I intercambia los pares de bases para introducir un error en la traducción y este movimiento impide la síntesis de proteínas anormales. Fuera de este concepto Musunuru advierte la posibilidad de eliminar la PAM por la inducción de la ruta NHEJ y una vez perdido el cebador, Cas-9 no se podrá unir de nuevo en ese punto del ADN.

Janik *et al.* (2020) (2) concluyeron que la vía NHEJ es propensa a errores semi aleatorios y se logra relacionar con la interrupción completa del gen o el origen de nuevas mutaciones. Ahora bien, esta afirmación no indica que la reparación NHEJ esté en desuso en

las investigaciones CRISPR; existen mecanismos de mitigación de indeles, los cuales, mediante la aplicación de proteínas efectoras, mejoran la efectividad de la reparación NHEJ y disminuyen la aparición de deleciones o inserciones.

4.2. Enfermedades genéticas tratadas con CRISPR y resultados de ensayos clínicos.

La herramienta CRISPR/Cas-9 es una fuente potencial de edición genética que posee varias ramas en la terapia genética, un gran número de ensayos preclínicos y clínicos se realizan en el mundo con el objetivo de desarrollar aplicaciones del sistema CRISPR/Cas-9 que demuestren eficiencia y seguridad. La eficiencia de una herramienta CRISPR significa el grado de permanencia de la edición genómica en las células y la seguridad se refiere a los efectos secundarios resultantes de la edición CRISPR, ambos puntos serán analizados en los ensayos clínicos y preclínicos seleccionados para esta investigación.

4.2.1. Enfermedades hematopoyéticas.

En los ensayos clínicos de terapias CRISPR se logra observar un mayor número de investigaciones dirigidas a enfermedades monogénicas y el cáncer, donde ambas ramas presentan resultados positivos y prometedores. En las enfermedades monogénicas se muestra una mayor cantidad de estudios en enfermedades hematológicas como anemia falciforme y β -talasemias.

Chodnekar y Tsetschladze (2024) (37) realizaron una revisión sistemática de ensayos clínicos en busca de evidenciar la permanencia de la edición genómica en células hematopoyéticas y determinaron que de 24 estudios relacionados a enfermedades monogénicas 14 fueron de β -talasemias y anemia falciforme, por lo tanto, afirmaron que la tendencia hacia las enfermedades hematológicas en la edición CRISPR se debe a mecanismo de edición *ex vivo* de células madres autólogas para su posterior trasplante de regreso al paciente y esto permite un mayor control en la reparación HDR, selección de la mejor muestra y mayor persistencia de la edición genómica.

Maganti *et al.* (2024) (29) realizaron una revisión sistemática de la permanencia de las modificaciones en las células madre hematopoyética editadas con CRISPR/Cas-9, donde concluyeron que 14 de 15 estudios mostraron una permanencia mayor a las 12 semanas de células editadas en la fase 1, una vez realizado el trasplante de células modificadas la reducción final fue de 18,9% en promedio. Estos datos revelan que la permanencia de células editadas disminuye en el tiempo, Maganti y su equipo afirman que la causa radica en la citotoxicidad de los vectores, la dosis administrada de la herramienta CRISPR y la reparación NHEJ que provoca indels que silencian la modificación en la secuencia.

Otros ensayos clínicos realizan cambios considerables en los vectores y la administración de dosis, lo cual permite resultados más duraderos. Frangoul *et al.* (2024) (12) revelaron una edición CRISPR/ Cas-9 en células madre hematopoyéticas CD34+ autólogas utilizando la herramienta exagamglogene automcel; para reactivar la región potenciadora específica de eritroides de BCL11A que corrige la anemia falciforme. Este ensayo pudo dar seguimiento a 30 de 44 pacientes por 19 meses, tiempo en que se evidenció la permanencia de la mutación inducida por 12 meses consecutivos en los cuales los pacientes tampoco mostraron crisis vaso oclusivas.

Cabe resaltar que Frangoul y su equipo administraron las células modificadas por vía intravenosa en un catéter de vía central en dosis graduales por 48 horas, además la transfección de la herramienta exagamglogene automcel se realizó por electroporación para eliminar el riesgo de reacción inmunológica que producen los vectores virales. Este estudio es evidencia importante que al pulir los métodos de administración, transfección y edición de la Cas-9 se logran mejores resultados que pueden replicarse en futuros estudios genómicos o introducirse a la práctica clínica.

Sharma *et al.* (2023) (36), desarrollaron un ensayo clínico en el cual participaron 16 pacientes de anemia falciforme vaso oclusiva, donde se usó un medio *ex vivo* para editar células madre hematopoyéticas CD34+. En este estudio se aplicó el tratamiento OTQ923 y se interrumpió el promotor HBG 1 y 2, con lo cual obtuvo un método eficaz para aumentar

la HbF. De este estudio destacan la edición fuera de objetivo del 0%, la transfección de Cas-9 junto el ARNm por electroporación y, por último, la mejora de los síntomas de anemia falciforme por los 18 meses de seguimiento.

Otro aspecto importante de mencionar, es la participación final de solamente 7 pacientes que lograron recibir el tratamiento OTQ923. Este suceso se relacionó a la toxicidad causada por agentes mieloablativos, el bursulfán y los alquilantes, los cuales son los más frecuentes utilizados en este tipo de ensayo y presentan muchos efectos secundarios que imposibilitan continuar a los pacientes con el tratamiento. Una alternativa propuesta por Sharma y sus colaboradores es emplear agentes menos genotóxicos como treosulfán o melfalán.

La β -talasemia ha sido objetivo de estudio en la edición CRISPR. Vaglio (2023) (10) señala que las β -talasemias y la anemia falciforme poseen el mismo objetivo genético, el gen HBB que codifica las cadenas- β de la hemoglobina, para dar como resultado el desarrollo de herramientas CRISPR que funcionan para editar el gen en ambos casos. Locatelli *et al.* (2023) (38), realiza un ensayo clínico con el tratamiento exa-cel (exaganglone autotemcel), una herramienta CRISPR basado en edición HDR, empleado con anterioridad para tratar anemia falciforme. Esta investigación tuvo como objetivo la escisión del gen BCL11A, un promotor genético que limita la expresión de HbF en la edad adulta.

Este ensayo logró una reducción alélica del locus BCL11A en un promedio de 78% al sexto y se observó una relación directa con el incremento de la HbF. Este tratamiento permitió a 10 pacientes abandonar la terapia de quelación de hierro y se mantuvieron estables hasta 22 meses consecutivos. Un total de 32 pacientes desarrollaron independencia a la transfusión con un nivel medio de HbF 11,9g/dl. De 35 pacientes con suficientes datos para el seguimiento 3 de ellos salieron del estudio debido a severos efectos secundarios del bursulfán donde la enfermedad hepática veno-oclusiva fue la causa principal.

4.2.2. Angioedema hereditario.

El angioedema hereditario es una enfermedad rara caracterizada por episodios de edema severos impredecibles, originada en una mutación que causa déficit del inhibidor del complemento-1 (INH-C1) que conlleva una sobre activación de la ruta inflamatoria de la calicreína que provoca vasodilatación y edema en mucosas y órganos internos (14).

La tecnología CRISPR permite la edición del gen *KLKB1* que codifica la calicreína B1, con la escisión de esta secuencia se pretende impedir el acceso a la ruta de vasodilatación que provoca los edemas. Los ensayos clínicos demuestran la alta eficacia de la herramienta NTLA-2002 para editar el gen *KLKB1*, estudios como Cohn *et al.* (2024) (14) demostraron la disminución de las crisis de edema en una tasa de 0.6-0.7% para los 21 pacientes que recibieron tratamiento y para los 6 pacientes que recibieron placebo fue de 2.8%. Longhurst *et al.* (2024) (39) reportaron una disminución de la calicreína plasmática dependiente de dosis de 67% del basal con 25mg, 84% con 50mg y 95% con 75mg.

En cuanto a la seguridad ambos ensayos clínicos presentaron síntomas relacionados a la infusión, aunque no fueron cuadros clínicos severos, es importante resaltar la presencia de cefaleas y lumbalgia intensas, pero no se registraron síntomas adversos durante los 16 meses de vigilancia. Dando lo anterior, NTLA-2002 presenta un perfil seguro con una tasa de indel al 0% y alta eficacia cercana al 90%; a pesar de estos resultados, las poblaciones incluidas en estos estudios son muy pequeñas para deducir un análisis certero y se necesita prolongar la vigilancia para evaluar la permanencia de la edición genómica.

4.2.3. Amiloidosis de transtiretina (ATTR).

La ATTR es un trastorno proteico hereditario potencialmente mortal, causado por la acumulación en tejido cardíaco, tendones y nervios de transtiretina mutada con irregularidad estructural, lo cual desarrolla miocardiopatía por depósitos amiloides y neuropatía periférica sensitivo-motora o autonómica progresiva. La causa reside en las mutaciones del gen *TTR* ubicado en el cromosoma 18 en la región 18q11.2 que codifica la transtiretina el transportador de la tiroxina y la vitamina A (40,13).

Al usar el gen TTR como objetivo genético se puede aplicar la tecnología CRISPR/Cas-9 para reducir la expresión de TTR mutada. Gillmore *et al.* (2021) (13) publicaron un ensayo clínico controlado con 6 pacientes, donde se administró la herramienta CRISPR NTLA-2001 en una infusión por vía central. Este estudio reveló una disminución marcada de TTR dependiente de dosis, de 57% para 0.1mg y de 87% para 0.3mg.

Es de relevancia resaltar que la TTR se produce en el hígado, para una mejor farmacocinética se utilizó como vector nanopartículas lipídicas para que pueda ser captado por el receptor de LDL de los hepatocitos, este método maximiza la eficiencia en tiempo y menor efecto tóxico. Además, durante el ensayo preclínico con modelo celular de hepatocitos, se trató con dosis mayores que las usadas en el ensayo clínico de NTLA-2001 y, a pesar de ese suceso, no se presentó edición fuera del objetivo.

Fontana *et al.* (2024) (40) presentaron un ensayo donde participaron 37 pacientes con miocardiopatía por amiloidosis de transtiretina. Este estudio usó la herramienta Ziclumeran Nexiguran que utiliza como vector nanopartículas lipídicas, este tratamiento demostró un inicio de la edición genómica 4 horas después, de la infusión además de una reducción de TTR promedio de 90% en todos los pacientes.

A pesar de los resultados favorecedores, los pacientes presentaron leves mejorías en los síntomas, pero no se observó cambio en la clasificación NYHA preestablecida en los 24 meses de seguimiento. En cuanto a la seguridad, 34 pacientes presentaron reacciones adversas a la infusión y 14 participantes presentaron una reacción grave que fue relacionada a un evento agudo de miocardiopatía por transtiretina.

En síntesis, ambos estudios son métodos de edición genómica para el gen TTR con eficacia comprobada por los niveles de TTR plasmático y sintomatología, pero el perfil de seguridad del ensayo clínico de Fontana *et al.* (2024) (40) presenta riesgo de eventos adversos agudos. Lo anterior, porque esta tecnología no va dirigida a la reparación del daño tisular en el corazón o a los nervios, sino que se enfoca en la mejoría de síntomas debido a que la diana son los hepatocitos.

4.2.4. Enfermedades oculares congénitas.

A diferencia de otros modelos de aplicaciones CRISPR, las investigaciones centradas en el glóbulo ocular se distinguen de las demás en el método de administración, ya que por lo general se emplean infusiones intravenosas administradas con vigilancia estricta y atención inmediata de efectos adversos. Las herramientas CRISPR destinadas a los tejidos oculares pueden administrarse directamente en el componente ocular deseado mediante microinyección, lo cual facilita la llegada inmediata del tratamiento a la célula diana y evita los efectos secundarios de las infusiones.

De entre las enfermedades oculares congénitas, la tecnología CRISPR avanza en la corrección de la Amaurosis congénita de Leber, esta enfermedad está relacionada a la mutación del gen CEP290 (la proteína centrosómica de 290 kDa) que se caracteriza por pérdida de la visión desde el primer año de vida, nistagmo, fotofobia, queratocono y culmina en una ceguera total (41).

El ensayo clínico de Pierce *et al.* (2024) (41) presentó un método para corregir la mutación del gen CEP290 por medio de la herramienta EDIT-101 que consiste en una inyección subretinal de la proteína Cas-9 de *Staphylococcus aureus*, la cual tiene como objetivo escindir sobre la región del intrón 26 del gen.

La población participante fue de 18 pacientes mayores de 3 años, una vez recibieron la inyección subretinal, se mantuvieron en seguimiento por 2 años, y durante este periodo se evaluó la agudeza visual y la sensibilidad retiniana mediante pruebas de estímulo de campo completo adaptadas a la oscuridad.

Los resultados presentados son prometedores y reflejan la alta eficiencia de la terapia CRISPR: desde el inicio del ensayo, 9 de los participantes tuvieron una mejora significativa en la agudeza visual con hasta $2,4 \log_{10}$ del ángulo mínimo de resolución, por su parte, 6 pacientes tuvieron una mejoría moderada con el paso del tiempo evaluada con la agudeza visual y la sensibilidad a la luz roja.

El perfil de seguridad no demostró ser una limitación porque no se observaron eventos adversos de ninguna clase o efectos de genotoxicidad relacionados a la administración o el tratamiento. Dado el hecho que el vector de la herramienta CRISPR es un AAV5 se detectaron anticuerpos antivirales en el 59% de la población y 64% presentó anticuerpos contra la Cas-9. La inmunogenicidad es un tema de investigación relativamente nuevo, por lo que todavía se desconoce su participación en la efectividad de la edición genómica.

En total, el 83% de los pacientes tuvo una mejoría de la discapacidad visual y el resto de la población presentó leves mejoras en la agudeza visual, con lo cual estos resultados demuestran una alta eficiencia de EDIT-101 para corregir la Amaurosis de Leber. Sin embargo, el patrocinador del estudio, lo consideró no exitoso y retiró el financiamiento. En contra de este suceso, la efectividad de EDIT-101 para corregir el intrón 26 respalda un análisis mayor.

Bouchard *et al.* (2024) (33) abordaron el síndrome cerebro fronto-facial de Baraitser-Winter y el coloboma, enfermedades causadas por una mutación en el gen ACTB en el exón 4 que codifica la β -actina. Esta mutación se pretende corregir mediante edición principal al aplicar la herramienta CRISPR en las células madre pluripotentes y reingresar las células editadas en el iris para corregir el defecto anatómico.

Bouchard *et al* también señalaron un ensayo preclínico para corregir la mutación del gen CRB1 (homólogo 1 de *crumbs*) que causa una de las variantes de amaurosis de Leber y la retinitis pigmentosa. Este, por medio del uso de la edición principal en células madre pluripotentes donadas por pacientes, con lo cual se alcanzó una eficiencia del 72%,

El resultado anterior puede justificar un ensayo fase 1 que evalúe la posibilidad de emplear este método como una cura definitiva. En contraste, se puede afirmar que la edición CRISPR/Cas-9 en el manejo de enfermedades oftalmológicas congénitas presenta una confianza y mayor estabilidad de los efectos secundarios, esta ventaja puede deberse al método de administración directamente sobre el tejido afectado.

La tabla 5 representa un resumen de los ensayos clínicos analizados en este apartado y sus resultados de eficiencia, la mayoría de los estudios supera una tasa de eficiencia del 80% y un indel al 0%, lo cual es un factor relevante que demuestra seguridad del tratamiento y su función exitosa. Estos resultados acercan más la posibilidad del ingreso de terapias CRISPR a la práctica clínica. A pesar de este contexto, existe un margen amplio para mejorar los objetivos genéticos y los efectos secundarios que debe ser tomado en cuenta en futuras investigaciones.

Tabla 5. *Resumen de ensayos clínicos y sus resultados.*

Estudio	Objetivo del estudio	Diana genética	Reparación del ADN	Tasa Indel	Tasa de eficiencia
(12)	Corrección de anemia falciforme	Eliminación del BCL11A.	HDR	0%	50%
(36)	Corrección de anemia falciforme	Escisión del espaciador entre HBG1-2.	HDR	7.1%	87.4%
(38)	Corrección de β -talasemia dependiente de transfusiones	Escisión del gen HBB.	HDR	0%	78%
(14)	Terapia para angioedema Hereditario.	Escisión del gen KLKB1.	NHEJ	0%	86%
(39)	Terapia para angioedema Hereditario.	Escisión del gen KLKB1.	NHEJ	1%	95%
(13)	Terapia para amiloidosis por transtiretina.	Silenciamiento del gen TTR.	NHEJ	0%	57-87%
(41)	Terapia para amaurosis congénita de Leber.	Escisión del gen CEP290	HDR	59%	83%

(40)	Tratamiento de miocardiopatía ATTR	Silenciamiento del gen TTR.	HDR	-	89-90%
------	------------------------------------	-----------------------------	-----	---	--------

Fuente: elaboración propia a partir de las publicaciones mencionadas.

4.2.5. Distrofias musculares hereditarias.

Las mutaciones en el gen DMD (distrofina) ubicado en el cromosoma Xp21 son la causa de las distrofias musculares hereditarias que abarcan la distrofia muscular de Duchenne, la distrofia muscular de Becker y la forma intermedia de distrofia muscular. Estas mutaciones causan una producción limitada de la proteína distrofina que resulta en la pérdida estructural de la membrana celular de las fibras musculares y el tejido conectivo fibroso, donde el tejido adiposo reemplaza progresivamente el musculo y los pacientes sufrirán de complicaciones cardíacas, retraso del crecimiento, malformaciones óseas y el deceso en edad temprana (15).

Esta es una de las primeras enfermedades que fueron objetivo de estudio en la tecnología CRISPR, Wu *et al.* (2020) (15) destacaron que 5 ensayos preclínicos en células humanas y animales han utilizado la reparación NHEJ para escindir el exón 23 y restaurar la expresión de distrofina; los resultados son controversiales con tasas de eficiencia entre 3 y 90%. Janik *et al.* (2020) (2) describieron el uso de la edición CRISPR/Cas-9 para corregir las repeticiones CTG/CAG en el gen DMD al utilizar como vector nanopartículas de oro y otro estudio donde se observó una conservación de la edición en 67% de las muestras celulares.

Laurent *et al.* (2024) (3) presentaron un pequeño análisis sobre varios ensayos preclínicos y de laboratorio relacionados al gen DMD donde se determinó que las mutaciones en el exón 23 y las deleciones del exón 52 son la causa de las distrofias musculares hereditarias. Yacoub *et al.* (2024) (31) confirmaron que las investigaciones identifican el exón 23 y 52 como posibles causas de las distrofias hereditarias y que la terapia CRISPR ha creado varios modelos preclínicos. Algunos enfoques presentan la sustitución del exón mediante reparación HDR y otras presentan la omisión del exón 23 para restaurar la expresión de distrofina.

La edición CRISPR dirigida a las mutaciones del gen DMD ha estado presente desde los inicios de esta tecnología, no obstante, ha presentado una disminución en los avances de edición genética CRISPR. Laurent *et al.* (2024) (3) sugiere que puede deberse al desarrollo de nuevas terapias, como los fármacos de omisión de exón y oligómeros modificados conjugados con péptidos y el método el triciclo-ADN, ya que estos nuevos tratamientos están en investigación y ganan relevancia en los ensayos clínicos.

Ahora bien, los autores antes citados no mencionan datos importantes para un estudio preclínico como: la tasa de edición fuera de objetivo, los efectos secundarios o la permanencia de la edición, lo cual genera dudas válidas sobre el potencial de los estudios preclínicos. A este dilema se suma la eficacia variable de un ensayo a otro, ya que no se observa una estabilidad en la eficiencia y hace falta el desarrollo un vector definitivo para llevar a Cas-9 hasta el gen DMD.

Otro problema mencionado por el equipo de Laurent está relacionado a la magnitud del gen DMD, esta secuencia es la más larga del ADN humano con un total de 2.4 millones de pares de bases y 79 exones; por lo tanto, se han observado otras mutaciones que podrían ser causa de distrofia muscular tales como: mutaciones puntuales en exones 9, 20, 35, 43, 55 y 61; duplicación de exones; e incluso omisión de múltiples pares de bases (3). Este hecho dificulta encontrar un objetivo genético para garantizar el éxito de la endonucleasa Cas-9 y amplía el rango de probabilidad de edición fuera de objetivo.

4.2.6. Otras aplicaciones CRISPR.

Existe un grupo de enfermedades con un origen genético menos frecuentes de observar en las investigaciones CRISPR y cuyos resultados son relevantes para determinar el potencial de la tecnología de edición genómica basada en CRISPR/Cas-9.

La *Diabetes Mellitus* tipo I (DMI) se caracteriza por niveles insuficientes de insulina, causados por la combinación de factores genéticos, autoinmunes y ambientales. Karpov *et*

al. (2023) (42) realizaron una revisión de las terapias genéticas dirigidas a DMI en donde resaltaron los resultados de la tecnología CRISPR en algunos ensayos preclínicos y ensayos clínicos en progreso, los cuales se centraron en modificación *ex vivo* de células endodérmicas pancreáticas alogénicas para su posterior trasplante.

Este método intentó intensificar las funciones de las células β -pancreáticas al aplicar una escisión en los genes B2M, TXNIP y agregar secuencias sanas de los genes PD-L1, HLA-E TNFAIP-3 y MANF mediante la herramienta de edición principal, con esta modificación se buscó reducir el rechazo inmunológico por parte de las células T y NK, además de ejercer protección contra el estrés oxidativo y las citocinas que inducen la apoptosis.

La fibrosis quística es una enfermedad que varía en intensidad y es de difícil manejo, esta es desencadenada por deleciones en el gen CFTR (regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística); este defecto ocasiona una mucosidad espesa y pegajosa en el lumen de la vía respiratoria y digestiva, como consecuencia los pacientes sufren episodios de obstrucción de grave a severo (43).

Nicosia y Harrison (2025) (43) realizaron una revisión sistemática sobre los avances científicos en la edición genómica de la fibrosis quística. Esta investigación analizó 27 artículos seleccionados donde se discutieron tres temas principales: la eficiencia, las células diana y el objetivo propuesto. Las investigaciones analizadas alcanzaron una eficiencia promedio del 90%, todas las terapias se dirigían a células de la mucosa del intestino y el gen CFTR; además, se mencionó la utilización de la edición de base y la edición principal por medio del uso de las endonucleasas Cas-9 y Cas-12.

Bouchard *et al.* (2024) (33) destacaron un ensayo preclínico con células humanas, en el cual se usó la edición principal para editar el canal iónico codificado por el gen CFTR y disminuir el transporte de fluidos hacia el lumen. La falta de información sobre los efectos fuera de objetivo es un problema recurrente en las publicaciones de edición CRISPR/Cas-9, este impedimento es causado porque las investigaciones no tienen como uno de sus objetivos principales estudiar los efectos negativos de la edición propuesta, una posible solución es

realizar ensayos preclínicos que evalúen de forma específica la edición fuera de objetivo para las herramientas CRISPR desarrolladas para la terapia de fibrosis quística.

Un obstáculo descrito por ambos estudios antes citados es la importancia de la detección temprana del daño tisular pulmonar, ya que las terapias genómicas están dirigidas a corregir la hiperviscosidad de la mucosa; por tanto, no reparan el daño estructural a los bronquios o pueden revertir el daño establecido. El momento diagnóstico es crucial para la aplicación de terapias genéticas porque es una intervención temprana puede aplicarse para prevenir el progreso a una enfermedad pulmonar irreversible o una obstrucción intestinal severa.

Enfermedades neurológicas como el Huntington y Alzheimer presentan un amplio potencial en las terapias genéticas. El Huntington es causado por repeticiones de los nucleótidos CAG en el exón 1 del gen de la Huntingtina (HTT) que codifica la glutamina. Como consecuencia la glutamina mutada a nivel molecular tiene una longitud extendida y provoca la neurodegeneración que con el tiempo deteriora al paciente (44), es relevante conocer que esta enfermedad es autosómico dominante y tiene una edad diagnóstica entre 30-50 años.

Bojadeh *et al.* (2023) (44) presenta dos enfoques de la edición CRISPR/ Cas-9 como terapia para la enfermedad de Huntington. El primero es la edición de fibroblastos eliminando las secuencias repetidas en el gen HTT en un modelo *in vivo* usado un virus AAV como vector. Otra estrategia, es la edición de células madre por medio de una escisión *ex vivo* de las secuencias repetidas para su posterior trasplante. Ambas estrategias están en desarrollo mediante estudios preclínicos que demuestran identificación de células sinápticamente activas que conservan la edición CRISPR.

Sharma *et al.* (2020) (45) realizaron una revisión donde resalta la estrategia CRISPR de silenciamiento del gen HTT en uno de los alelos como posible mecanismo de disminución de la síntesis de glutamina mutada. Sharma *et al* también hicieron referencia a las mutaciones que causan el Alzheimer y presentaron una estrategia muy recurrente en los ensayos

preclínicos: la edición de base para corregir las mutaciones en el gen de la presenilina 1 y 2 (PSEN1 y 2) intercambiando el nucleótido timina por una citosina, este mecanismo silencia el gen y disminuye la producción de la proteína beta-amiloide.

Nojadeh *et al.* (2023) (44) destacaron 3 ensayos preclínicos llevados a cabo con células madre pluripotentes diferenciadas a neuronas axonales. Como resultado determinaron que en la esclerosis amiotrófica lateral los modelos preclínicos manifestaron una alta eficiencia en la introducción de múltiples bases en el gen SOD1 que codifica la superoxidasa dismutasa-1, provocando la inactivación del gen en el alelo alterado y el alelo sano restante se encarga de la traducción de esta enzima necesaria para reducir el estrés oxidativo en las neuronas.

En síntesis, las estrategias empleadas en los ensayos clínicos para enfermedades neurológicas poseen resultados favorecedores para su extensión a estudios clínicos de fase 1. Sin embargo, las publicaciones no toman en cuenta la información sobre la tasa de indel o el tiempo de la durabilidad de la edición. La investigación de Sharma y su equipo define como un posible dilema la longitud de los genes objetivos, los cuales para estas enfermedades pueden presentar varias mutaciones en cualquiera de los exones y abren la oportunidad de la edición fuera de objetivo.

4.2.7. Hallazgos en los ensayos preclínicos.

La fase preclínica permite examinar los efectos biológicos que tendrá en producto en los participantes de un posible ensayo clínico, este es el primer paso la investigación en células con la enfermedad, seguido de pruebas en animales de laboratorio. Con la tecnología CRISPR los ensayos preclínicos, tanto en células humanas como animales, tienen como objetivo el desarrollo de nuevas herramientas CRISPR.

El ensayo preclínico de Pavani *et al.* (2021) (8), desarrolló un método novedoso de corrección de la β -talasemia, mediante la eliminación sinérgica del gen HBA2 y el reemplazo del gen HBB en células madre pluripotentes hematopoyéticas (HSPC), como resultado se presentó una mejora del fenotipo de la β 0- talasemia y se redujeron los precipitados de α -globina en los eritroblastos.

Para este ensayo se utilizaron dos grupos celulares las HSPC y células CD34+, donadas de cordón umbilical de pacientes con β -talasemia confirmados al nacer. La edición CRISPR fue realizada por parte de SpCas-9, donde se confirmó el sitio de la DSB mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) y *software* predictor. Por último, para determinar la edición fuera de objetivo, se optó por la tecnología de *GUIDE-seq*, un método de detección celular de edición *off target* que implica la secuenciación completa del ADN objetivo.

Esta estrategia plantea primero la eliminación del gen HBA2 que codifica las cadenas α de la hemoglobina, por medio de la simulación de un rasgo de alfa-talasemia o una talasemia silente, esta acción mejora los síntomas y la estabilidad de la hemoglobina en comparación con la β -talasemia. Seguidamente, se realiza una segunda edición genómica realizando una edición principal sobre el gen HBB que codifica las cadenas beta de la hemoglobina, este mecanismo necesita una cadena donante de la secuencia HBB sana dispuesta por un vector lentiviral.

La estrategia suena agresiva, pero resulta eficaz en la estabilización molecular de la hemoglobina, en tanto, las células cultivadas por diferenciación eritroide presentan una reducción de la expresión de α -globina en un 25-75%, debido al uso de una nickasa Cas-9 para la edición genómica la tasa de indeles es reducida y controlable en las células madre editadas.

En cuanto a la seguridad de esta plataforma se puede afirmar que *GUIDE-seq* no encontró edición fuera de objetivo, a pesar de este hecho, se debe confirmar mediante otros métodos de detección para validar la fidelidad de los hallazgos en edición fuera de objetivo.

Pavani y su equipo demostraron un método eficaz para la regulación negativa de la α -globina que mejora el desequilibrio de hemoglobina en las células con β -talasemia. A pesar de sus datos prometedores la bioseguridad del producto final está por definirse antes de pensar en realizar ensayos clínicos con pacientes reales que necesitarán sobrevivir el proceso de preparación para recibir células madre modificadas.

La regulación negativa de α -globina y sustitución del gen HBB en conjunto puede ser dirigida hacia otras β -hemoglobinopatías, esta misma estrategia se plantea en las células con anemia falciforme donde niveles bajos de α -globina reducen la polimerización de la HbS y la concentración de hemoglobina falciforme (8).

Los estudios CRISPR pueden optar por evaluar la seguridad genómica y biológica de las herramientas CRISPR, así como los efectos de la edición genómica mediante estudios preclínicos. En este caso se utilizan células humanas donantes o modelos animales para observar los efectos fuera del objetivo después de realizar una edición genómica con Cas-9.

Fрати *et al.* (2024) (46) realizaron un ensayo preclínico de seguridad revisando los efectos fuera de objetivo y las capacidades de eficiencia de estrategias CRISPR dirigidas a células con β -talasemia y anemia falciforme. En este ensayo probaron varios parámetros para verificar factores que disminuyan la eficiencia o desencadenen reacciones de inmunológicas en la célula.

La estrategia consistió en utilizar células madre pluripotentes hematopoyéticas con anemia de células falciformes para editar con Cas-9 el sitio de unión del represor del factor relacionado con el linfoma (FRL), esta acción debería de aumentar la expresión de HbF, un mecanismo que apacigua la anemia crónica de los pacientes.

Este formato de edición comprobó la expresión de HbF en los progenitores eritroides, pero presentó muchos problemas que deben solucionarse. Por ejemplo, la electroporación utilizada para la transfección de Cas-9/ ARNsg resultó en un aumento de la toxicidad celular, las deleciones tienen una frecuencia <60% pero continúa siendo alta y la diferenciación a linaje mielóide incrementó, lo cual que hizo poco útil la mutación provocada.

La estrategia planeada por Frати *et al.* (2024) (46) es eficaz e insegura a la vez, no obstante; la edición del sitio de unión del FRL puede optimizarse utilizando otros enfoques que logren el propósito final de aumentar la hemoglobina fetal, este método es muy nuevo en la actualidad, por lo que todavía queda margen para mejorar la precisión y la seguridad.

Yang et al. (2024) (11) realizaron un ensayo preclínico en células con β -talasemia, en cuanto a la evaluación de seguridad, este estudio realizó una valoración previa de los sitios fuera de objetivo usando *software* computarizado, el cual arrojó un total de 45 sitios posibles objetivos genéticos que pueden ser editados para provocar indeles.

Dos días después de la transfección, se empleó una secuenciación del ADN editado en búsqueda de alteraciones no deseadas, a pesar de inducir la reparación por HDR esta herramienta CRISPR demostró solamente 6 indeles que no demostraron tener efectos celulares. Posteriormente se demostraron 23 variantes de edición fuera de objetivo que podrían ocurrir en un segundo experimento. Los ensayos preclínicos permiten construir un perfil de seguridad antes de la aplicación de una herramienta CRISPR en la fase 1 y 2 para mejorar la aceptación de la tecnología de edición genómica.

Los estudios CRISPR en fase clínica también emplean ensayos preclínicos utilizando las muestras de células recolectadas después de administrar el tratamiento, esto con el propósito de verificar en varios periodos el estado de edición genómica y los indeles provocados; un claro ejemplo de esto son los estudios de Longhurst *et al.* (2024) (39) y Gillmore *et al.* (2021) (13), quienes realizaron ensayos preclínicos previos a la fase 1 y 2 para identificar los sitios fuera de objetivo y la probabilidad de citotoxicidad.

4.3. Efectividad de CRISPR en comparación con otras terapias.

En esta sección se responderá al tercer objetivo específico de la presente investigación al comparar la eficiencia, seguridad, efectos adversos entre la tecnología CRISPR y las terapias actuales para enfermedades genéticas, así como entre las tecnologías de edición genómica ZFN y TALEN.

4.3.1. CRISPR vs ZFN y TALEN.

El progreso tecnológico marca la innovación en las investigaciones biológicas, ya que cuando una nueva técnica en edición genómica surge es inevitable que se formulen

comparativas y se genere una competencia para definir cuál tecnología es de mayor calidad. La edición genómica mediante ZFN, TALEN y CRISPR son objetivo frecuente de comparación en búsqueda de determinar cuál plataforma está a la punta de los avances científicos en este campo.

Según González *et al.* (2021)(47) la tecnología ZFN (nucleasas dedos de zinc) consiste en nucleasas artificiales programadas en laboratorio y se forman uniendo dos dominios proteicos a través de una cadena de 32 péptidos, por medio de la enzima de restricción tipo II, este proceso crea la endonucleasa sintética FokI; de acuerdo con el número de nucleótidos la nucleasa encuentran un sitio objetivo en el ADN y provoca una DSB (ruptura en la doble cadena de ADN).

González y su equipo afirman que este método es poco factible porque requiere una alta especialidad en montaje e ingeniería de proteínas. El desarrollo de una nueva variante de ZFN dirigida a una nueva secuencia de ADN es un proceso lento y cuidadoso que puede retrasar el inicio de los ensayos clínicos. Por su parte, Rahim *et al.* (2021)(48) explican que para implementar la técnica ZFN se requiere un mayor número de endonucleasas en reflejo al número de objetivos genéticos, así como una cadena de polipéptidos que conecte las endonucleasas y provoque una dimerización para activar los dominios de escisión.

Cada elemento es completamente sintético y requiere conocimientos en tecnología de reingeniería de proteínas, ya que esto es un método que consiste en el replanteamiento de los fundamentos y el rediseño radical de los procesos de una investigación o experimento, y el rediseño de una proteína sintética necesita extensos tiempos de elaboración (48)

Rahim *et al.* (2021)(48) expone que la tecnología ZFN tiene una alta especificidad y se emplea en células de hemofilia tipo B, por medio de la modificación de los genes FVIII y FIX, así como en el tratamiento de enfermedades lisosomales.

Janik *et al.* (2020)(2) exponen que ZFN tiene la capacidad de reconocer de 9-12pb para el sitio de escisión, a pesar de esta habilidad, ZFN presenta una baja eficiencia en

comparación con TALEN y CRISPR. Por su parte, Vaglio (2023) (10) reconoce que las estrategias de ensamblaje pueden elevar la eficiencia y tiene una menor tasa de edición fuera de objetivo que CRISPR, donde el problema real es la complejidad del diseño de nucleasas sintéticas.

En cuanto a la seguridad, el obstáculo más trascendental de ZFN es la formación de heterodímeros que se unen a sitios fuera de objetivo. González *et al.* (2021) (47) señalan que los efectos negativos de la formación de heterodímeros son mitigables mediante mejoras, pero al comparar la CRISPR o TALEN, la tecnología ZFN no alcanza tasas similares de eficiencia y cada nuevo avance incrementa la complejidad de crear estrategias terapéuticas mediante ZFN.

Rahim *et al.* (2021) (48) mencionaron dos problemas relevantes de la tecnología ZFN. El primer dilema expone que, al usar plásmidos u otro vector no viral, surge una mayor escisión de la cromatina y esto resulta en una acumulación de los complejos ZFN. El segundo problema es la limitación al uso único de virus adenoasociado (AVV) o lentivirus (LV) porque este suceso reduce la seguridad y la evolución de ZFN como método de edición genómica, donde es rebasado por técnicas mayormente avanzadas como CRISPR/ Cas-9.

La técnica TALEN (tecnología de efectores similares a los activadores de la transcripción) es muy similar a ZFN, por lo que Vaglio (2023) (10) afirma que las proteínas efectoras activadoras de la transcripción se descubrieron en las bacterias *Xanthomonas* patógenas que causan enfermedades en las plantas. Este sistema se compone de dos nucleasas FokI que provocan la DSB, la nucleasa está ligada a 15-19 repeticiones tándem similares a la secuencia objetivo (TALE) ensamblados en el extremo N de la molécula, esta estructura permite el reconocimiento de 1-2pb para realizar la escisión del ADN (47).

En términos sencillos la tecnología TALEN es un avance en el diseño de ZFN, y este progreso en la edición genómica presenta sus propios obstáculos. Al respecto González *et al.* (2021) (47) analizaron el difícil diseño de las repeticiones tándem, ya que este método solo agrega complejidad porque se necesita sintetizar una secuencia tándem para enlazarla a dos

endonucleasas dedos de zinc que también deben ser sintetizadas en laboratorio, por lo que aunque la tecnología TALEN posee una mayor especificidad y menor probabilidad de edición fuera de objetivo, sigue necesitando reingeniería de proteínas e ingeniería de ADN.

Vaglio (2023) (10), determinó que el dilema de la tecnología TALEN radica en su difícil diseño, comparada con la técnica CRISPR que solo necesita dos elementos clave la proteína Cas-9 y un ARNsg. Janik *et al.* (2020) (2) también afirmaron que la tecnología TALEN arrastra un problema de ZFN porque la dimerización de los dedos de zinc es necesaria para unirse al ADN por lo tanto sigue siendo probable la interacción con otros complejos proteicos del ADN.

La edición del genoma TALEN ha demostrado eficiencia en estrategias terapéuticas contra enfermedades, no obstante, un fenómeno observado durante el presente análisis es la falta de publicaciones actuales en avances de la tecnología TALEN. Este hecho lo refuerza la investigación de Rahim *et al.* (2021) (48), ya que dicha publicación manifiesta la alta eficiencia presentada por un modelo TALEN en la edición del gen leptina (LEP) que juega un papel importante en la regulación del peso y el apetito, este avance científico fue desarrollado en el 2016 y no se encontró ningún avance reciente, a pesar de tener resultados prometedores en el ensayo preclínico.

Según González *et al.* (2021) (47) la principal ventaja de TALEN es la baja citotoxicidad, esta característica se le confiere por la alta especificidad que las herramientas TALEN pueden alcanzar; un hecho que es confirmado en los estudios del locus CCR-5 y IL2RG en células humanas en los cuales el modelo TALEN presenta una citotoxicidad menor que la CRISPR.

Dado lo anterior, es posible concluir que TALEN presenta un perfil de seguridad viable, una eficiencia equiparable a CRISPR y superior a ZFN, pero su complejo diseño y los largos tiempos de desarrollo de días o semanas permiten a la técnica CRISPR un mayor número de investigaciones y un creciente interés en la investigación médica.

La superioridad del sistema CRISPR/ Cas-9 radica en su versatilidad, una capacidad que confiere una gran sencillez para adaptarse a cualquier objetivo genético en el ADN y su implementación en múltiples áreas de la ciencia.

González *et al.* (2021) (47) demostraron que la viabilidad de la técnica Cas-9 reside en flexibilidad del ARNsg. Además, sus estudios preclínicos revelaron que los ARN sintéticos tienen una mayor afinidad por nucleótidos de guanina o citocina colocados en ciertas posiciones, pero a pesar de este fenómeno no restan especificidad o reduce la eficiencia de las herramientas CRISPR. La gran cantidad de estrategias de diseño de ARNsg minimizan la actividad fuera de objetivo y facilitan el trabajo de estructurar la herramienta CRISPR antes de aplicarla en células humanas.

González y su equipo también enfatizaron en la capacidad de la endonucleasa Cas-9 para ser modificada, estrategia que permite: la edición epigenética, la activación/ represión transcripcional y la edición de base a través del desarrollo de versiones alternativas de Cas-9 como la nickasa-9, empleada en la edición de base (47). Sumado a esto, Cas-12 y Cas-13 demostraron alta sensibilidad y fácil cuantificación, características que permiten resultados positivos en los estudios de método diagnóstico y ensayos preclínicos.

Boti *et al.* (2023) (49) afirmaron que la factibilidad de las técnicas CRISPR queda demostrada en el amplio catálogo de objetivos genéticos que se estudian y se aplican en ensayos clínicos. Desde la inactivación de la caja Kruppel, pasando por los genes HBB y las modificaciones de células CAR-T para el tratamiento de cáncer; CRISPR representa una mayor viabilidad, flexibilidad y adaptación para la investigación que ZFN y TALEN.

Desde otra perspectiva Rahim *et al.* (2021) (48) expone el tema de la dificultad de desarrollo de ZFN y TALEN, ya que para ambas técnicas es necesario reingeniería enzimática adaptada a las nucleasas aplicadas en separado para cada secuencia editable en la célula, a diferencia del sistema CRISPR el cual solo necesita cambiar el ARNsg para identificar nuevos sitios para la edición genómica.

La eficiencia es un factor cambiante que evoluciona según las modificaciones realizadas en cualquiera de las tres herramientas de edición del genoma. En la tecnología CRISPR/Cas-9 el ARNsg implementado, el método de administración, los vectores de transfección, las estrategias de mejora, el tipo de edición y la secuencia específica a la que se dirige definen la eficiencia de la edición mediante CRISPR/ Cas-9. González *et al.* (2021) (47) informaron que la utilización de una Cas-9 nativa de *Streptococcus pyogenes* alcanzó una eficiencia del 40-50%; un valor realmente destacable en la edición genómica.

El análisis de los ensayos clínicos anteriormente mencionados resalta diferentes tasas de efectividad de acuerdo con el objetivo genético y la aplicación de mejoras a las herramientas CRISPR. Boti *et al.* (2023) (49) señalaron que existen mejoras que elevan la eficiencia porcentual con gran diferencia. Por ejemplo, las principales modificaciones observadas en los estudios preclínicos y clínicos son la manipulación de organoides, modificación de células madre hematopoyéticas, administración de vectores no virales y el empleo de endonucleasas Cas-9 modificadas. Estas mejoras al sistema CRISPR pueden ser beneficiosas, no obstante, se presentan como una espada de doble filo puesto que nuevos mecanismos también suman obstáculos o la posibilidad de mayor edición fuera de objetivo.

Janik *et al.* (2020) (2) afirmaron que CRISPR presenta una mayor eficiencia a ZFN y TALEN para editar múltiples objetivos genéticos porque con el CRISPR se puede introducir endonucleasas y ARNsg dirigidos a diferentes locus, lo cual permite editar simultáneamente varios puntos en el ADN; una estrategia utilizada en la enfermedad de Huntington provocado por las repeticiones de nucleótidos en el gen HTT, este defecto es corregido con la edición de fibroblastos eliminando las secuencias repetidas en el gen HTT gracias a una endonucleasa Cas-9 (50).

La seguridad de las herramientas CRISPR es un tema de debate constante, los principales problemas que afronta en la actualidad esta tecnología son la edición fuera de objetivo y la inmunogenicidad. González *et al.* (2021) (47) señalaron que los estudios preclínicos revelan un alto riesgo de mutagénesis y actividad fuera del objetivo, dicha situación ha llevado a desarrollar métodos de reducción de la edición fuera de objetivo y

algunos ensayos clínicos revelaron una tasa de 0% de indeles. Locatelli *et al.* (2024) (38) mostraron una corrección de la β -talasemia con ninguna aparición de indeles o edición fuera del objetivo. Mientras que Cohn *et al.* (2024) (14) logra el mismo efecto en el tratamiento del angioedema hereditario.

Janik *et al.* (2020) (2) hacen hincapié en el uso de vectores adenoasociados (AAV) como los más frecuentemente usados por su baja citotoxicidad, este tipo de administración se observa tanto para ZFN como para TALEN. En la actualidad, los métodos físicos como electroporación y las nanopartículas se observan con mayor frecuencia en las investigaciones CRISPR dirigidas a células humanas, dichos métodos tienen un rango de inmunogenicidad más bajo que el vector AAV.

Los tres mecanismos de edición genómica ZFN, TALEN y CRISPR poseen una eficiencia afectada por la ubicación del objetivo genómico, la complejidad de los métodos epigenéticos, la citotoxicidad y la ocupación de nucleosomas. Por lo tanto, el presente análisis determinó que la eficiencia puede variar en gran medida de acuerdo con los factores anteriores y por ello se observan tasas de indel y eficacia distintos para cada estrategia de edición.

En síntesis, las limitaciones del sistema CRISPR no han impedido continuar con los avances en aplicaciones médicas y sigue evolucionando constantemente. En conjunto las herramientas de edición genómica han mejorado el entendimiento de los mecanismos relacionados al ADN, pero para utilizar las técnicas ZFN, TALEN o CRISPR es necesario tener un alto nivel de comprensión de los mecanismos moleculares y la utilización de la tecnología de laboratorio genético.

La tabla 6 resume las características principales de las técnicas de edición genómica CRISPR, TALEN y ZFN tomando en cuenta efectividad, dificultad de realización, los elementos necesarios y los factores que pueden convertirse en un problema a la hora de realizar estudios científicos.

Tabla 6. Comparativa de efectividad y tiempo.

Característica	ZFN	TALEN	CRISPR	Ref.
Especificidad	Permite un pequeño número de desajustes posicionales.	Permite un pequeño número de desajustes posicionales.	Reconoce el objetivo a pesar de un número de desajustes.	(48)
Dificultad	Ingeniería de proteínas para cada objetivo.	Ingeniería de proteínas y de clonación molecular.	Síntesis de oligonucleótidos. Cultivo de muestras biológicas.	(2,48)
Elementos	Nucleasa FokI. 3-4 dedos de Zn.	Nucleasa FokI. 3-4 dedos de Zn. Secuencia tadem.	Endonucleasa Cas-9. ARNsg.	(2,48) (49,47)
Método de escisión.	Dos ZFN alrededor de la secuencia objetivo.	Se requieren dos TALEN alrededor de la secuencia objetivo.	Una única proteína Cas-9 fusionado al ARNsg.	(2,48,10) (49,47)
Eficiencia de focalización	Bajo	De moderado hasta alto	Alto	(2,48,10) (49,47)
Problemas	Interacción con proteínas del ADN. Hetero-dimerización. Alta probabilidad de edición fuera de objetivo.	Complejidad de rediseño. Hetero-dimerización.	Edición fuera de objetivo variable.	(2,48,10) (49,47)
Asequibilidad	Consumo tiempo y muchos recursos	Asequible, pero requiere tiempo.	Asequible Rápido en tiempo	(2,48)

Fuente: elaboración propia con base a las publicaciones mencionadas.

4.3.2. CRISPR vs terapias actuales.

Las estrategias terapéuticas CRISPR abarcan diferentes áreas de la medicina y en cada campo son puestas a prueba con las terapias tradicionales y otras formas de tratamiento. En este análisis la información se centra en la edición genómica mediante CRISPR para el tratamiento de enfermedades genéticas, por lo tanto, a continuación, se compararán las aplicaciones CRISPR contra algunos tratamientos ya conocidos para enfermedades hematológicas hereditarias.

La tecnología CRISPR avanza en la terapia de β -hemoglobinopatías dependientes de transfusión, enfermedades que se manejan con un plan de transfusiones desde el nacimiento para permitir un crecimiento apto y este proceso continúa en la vida adulta. Existen estrategias terapéuticas, tanto curativas como de control de síntomas, los cuales primero se deben analizar para entender cómo CRISPR puede vencer los problemas planteados por los tratamientos tradicionales.

Según Papizan *et al.* (2020) (51) la terapia transfusional es una medida preventiva para pacientes con β -hemoglobinopatías que evita la aparición de evento cerebrovascular y permite a los niños un desarrollo de crecimiento cercano al estándar esperado para la edad. Brusson y Miccio (2025) (52) expresaron que para manejo de las β -hemoglobinopatías se emplean la transfusión de glóbulos rojos de donantes sanos y farmacológicos de por vida, además la eficiencia que estas demuestran es variable según cada paciente.

Según Papizan *et al.* (2020) (51) la aloinmunización a antígenos de glóbulos rojos es el principal inconveniente de las transfusiones, un programa de transfusiones es una medida de por vida para el paciente y en la edad pediátrica suelen aplicarse cada 2-4 semanas, por lo que entre más transfusiones reciba el paciente, mayor probabilidad tendrá de desarrollar aloanticuerpos a antígenos transfundidos y no podrá recibir más sangre de donantes.

El trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (TCMH) resulta un tratamiento curativo eficaz para la β -talasemia y anemia falciforme, a pesar de ello, no todos

los pacientes encuentran un donante adecuado porque el injerto puede iniciar una relación de rechazo o incluso iniciar complicaciones inmunitarias sumado a los efectos secundarios del tratamiento mieloablactivo.

Según Tariq *et al.* (2024) (53) la compatibilidad del donante es un factor relevante, ya que se necesita un hermano HLA idéntico (antígeno leucocitario humano) que actúe como donante de células madre hematopoyéticas; no obstante, menos del 15% de los pacientes cumplen este requisito, por lo que el resto no puede optar por el trasplante. Además, los pacientes que se incluirán en el trasplante deben sobrellevar todas las consecuencias del manejo mieloablactivo previo a realizar el injerto, donde los principales efectos secundarios son los vómitos incoercibles y las infecciones secundarias a la inmunosupresión.

Con la tecnología CRISPR puede evitarse el rechazo del trasplante mediante la edición de células madre hematopoyéticas autólogas en medio *ex vivo* para, posteriormente reintroducirla al paciente, una estrategia planteada en estudios anteriormente mencionados; como por ejemplo el de Fragoul *et al.* (2024) (12), un ensayo clínico basado en la edición de células madre hematopoyéticas autólogas con la herramienta CRISPR *Exagamglogene Autotemcel*; y el ensayo clínico de Locatelli *et al.* (2024) (38), en el cual se editaron células madre para provocar una escisión del gen BCL11A, un promotor genético que limita la expresión de HbF en la edad adulta.

Esta técnica tiene como propósito aumentar la síntesis de HbF que sustituya las funciones y la presencia de una HbA defectuosa. Una vez realizada la edición genómica mediante CRISPR, las células autólogas se reingresan al paciente, pero previamente debe haber recibido tratamiento mieloablactivo el único inconveniente que no se puede evadir.

Los ensayos clínicos de fase 2 y 3 evidencian una edición fuera de objetivo de 0% en los estudios con los mejores resultados y una estabilización de la anemia; este hecho sustenta la necesidad de incrementar los ensayos clínicos fase 3 en búsqueda de definir la permanencia de la edición en una población grande.

Christakopoulos *et al.* (2023) (54) resumieron las estrategias CRISPR aplicadas para corregir la β -talasemia. Los editores de bases pueden inducir indeles en el promotor γ -globina que interrumpen la unión de BCL11A, esto para crear nuevos motivos de unión para los factores de transcripción, con la edición principal se propone reemplazar los exones de las β -cadenas mutadas con una secuencia donante sana y la disrupción Cas-9 del potenciador eritroide BCL11A a través de NHEJ.

La evidencia esclarece el hecho de que las terapias CRISPR tienen una mayor versatilidad que los tratamientos actuales, por lo tanto, la edición genómica de células madre hematopoyéticas puede tener varios enfoques y no limitar las posibilidades de alcanzar un estado curativo.

Durante este análisis se observó que la permanencia de la edición genómica es un tema recurrente, no obstante, para que una herramienta CRISPR tenga la característica de ser curativa, la edición provocada en el ADN debe permanecer intacta de por vida. Los estudios clínicos mencionados revelan los resultados a 2 o 3 años de observación de los participantes. La cantidad de participantes es pequeña porque son estudios controlados y se requiere observar las alteraciones genéticas provocadas durante un lapso prolongado cercano a 5 años para determinar si la terapia CRISPR refleja su alto precio en su valor curativo.

Para la anemia falciforme algunas estrategias farmacológicas se mantienen en la actualidad, ya que su objetivo es mitigar los síntomas y no curar la enfermedad. De acuerdo con Papizan *et al.* (2020) (51) la hidroxiurea es el primer fármaco aprobado por la FDA en población mayor de 9 meses para manejo de anemia falciforme, el mecanismo de acción es inhibir la enzima ribonucleótido reductasa que permite incrementos de la HbF. Los estudios revelan que la hidroxiurea reduce los episodios de dolor, el síndrome torácico y la necesidad de transfusiones.

La hidroxurea tiene consecuencias en la línea celular eritroide porque causa neutropenia y trombocitopenia de moderado a grave, para evitar este hecho se ajusta la dosis según el grado de intoxicación del paciente. Además, el tratamiento con la hidroxiurea se

asocia con la aparición de neoplasias secundarias, pero este último suceso no está bien dilucidado.

De acuerdo con Tariq *et al.* (2024) (53) otros tratamientos para anemia falciforme como la L-glutamina presentan una alta recurrencia a esplenomegalia, sofocos y graves alteraciones digestivas. El Crizanlizumab bloquea las interacciones de la P-selectina disminuyendo la adhesión de los eritrocitos al endotelio, pero los estudios revelan que este fármaco no reduce los episodios de dolor y la eficiencia a largo plazo decae en la mayoría de los pacientes.

Si bien los tratamientos farmacológicos como la hidroxiurea funcionan, se pueden administrar por tiempo prolongado, los efectos secundarios ponen en riesgo la inmunidad del paciente quien, por lo general, presenta una fragilidad que complica la recuperación. Las técnicas CRISPR se presentan como terapias curativas, no para manejo sintomático o preventivo, sino como una ventaja sobre el tratamiento tradicional.

La herramienta *Exagamglone autotemcel* (Casgevy) es el único producto farmacológico CRISPR aprobado para tratamiento de β -hemoglobinopatías dependientes de transfusión por parte del organismo regulador del Reino Unido (Agencia Reguladora de Medicamentos y Productos Sanitarios; MHRA). Casgevy funciona editando el gen BCL11A en la región del potenciador eritroide ubicado en el cromosoma 2p16, y mediante este proceso regulador es como Casgevy puede reemplazar la síntesis de HbS con HbF y eliminar la variante causante de la enfermedad (55).

La aparición de Casgevy como tratamiento en Reino Unido permite plantear la siguiente duda ¿cuáles son los factores que llevaron a ganar aprobación del uso de Casgevy como tratamiento? Faud *et al.* (2024) (55) planea una revisión sistemática con la hipótesis de que Casgevy y Lyfgenia son igualmente eficientes, pero en esa investigación se arrojaron datos importantes que podrían dar respuesta a la anterior pregunta.

La evidencia científica expuesta por Faud *et al.* (2024) (55) demostró que Casgevy eleva los niveles de HbF durante los 36 meses de seguimiento, lo cual confirma la eficiencia

del método de edición genómica propuesto ya que presenta una supresión del gen BCL11A >95% en la serie eritroide que suprime las crisis vaso oclusivas y, el factor más importante a considerar, es que no hay índice de efectos adversos severos relacionados a las células madre hematopoyéticas editadas. En general, se presentaron síntomas como estomatitis y leve neutropenia, pero esto no afecta el perfil de seguridad del fármaco. Cabe mencionar que durante el ensayo CLIMB SCD-121, 20 de 40 pacientes experimentaron los efectos secundarios del tratamiento de preparación mieloablactivo con bursulfan (12).

En síntesis, cualquier otra estrategia terapéutica basada en CRISPR que quiera logra incluirse en los tratamientos aprobados por las entidades reguladoras debe de asegurar una alta eficiencia reflejada en la erradicación de los síntomas, así como respaldar los hallazgos con datos de laboratorio que manifiesten los efectos terapéuticos y demostrar que durante su administración y seguimiento el tratamiento CRISPR es seguro y no aparecerá daño colateral proveniente de la edición genómica propuesta.

La enfermedad ATTR hereditaria anteriormente analizada presentó varios avances terapéuticos en la tecnología CRISPR, los cuales son comparables con los tratamientos aprobados para el manejo de la amiloidosis cardiaca. El fármaco Patisiran pertenece a los ARNi (ARN interferente) dirigidos al ARN de la TTR para disminuir su síntesis, pero también están disponible los estabilizadores del tetrámero de TTR que impiden el plegamiento anormal de la proteína, estas terapias demuestran ser mejores que el trasplante de hígado u otros fármacos destinados al control de síntomas con una eficiencia cercana al 90% (9).

La tecnología CRISPR expone varias estrategias curativas para la ATTR hereditaria, Gillmore *et al.* (2021) (13) desarrollaron un ensayo clínico usando la herramienta NTLA-2001 para editar el gen de la TTR ubicado en el cromosoma 18; este estudio reveló una disminución marcada de TTR dependiente de dosis, de 57% para 0.1mg y de 87% para 0.3mg. Fontana *et al.* (2024) (40) presentaron un enfoque similar en un ensayo clínico de fase II, gracias a la aplicación de la herramienta *Nexiguran ziclumeran* en 36 pacientes y reportaron una eficiencia que ronda el 90% en casi todos los pacientes.

En contraste ambas herramientas demuestran eficiencia, a pesar de esta característica, los pacientes reportan mejoría de síntomas, pero no cambios en la clasificación NYHA, por lo cual se concluye que este enfoque CRISPR todavía no es curativo de la enfermedad y tampoco permite reparar el daño a las neuronas o tejido cardíaco; por lo tanto, los tratamientos basados en ARNi son de primera elección en la actualidad. La incidencia de la ATTR es baja, en tanto es una enfermedad rara en América y en Europa, pero incluso en las regiones de Japón y Portugal que son zona endémica esta enfermedad se considera entre las menos frecuentes, por lo tanto, algunos autores creen que el costo de desarrollar terapias CRISPR para ATTR supera el beneficio y no amerita un análisis mayor.

En cuanto a otras enfermedades cardíacas causadas por componentes genéticos, la información encontrada puede ser muy ambivalente. Según Asif *et al.* (2024) (56) se es posible encontrar algunas estrategias CRISPR en modelo preclínico con resultados exitosos para tratar defectos congénitos cardíacos, valvulopatías congénitas y el síndrome Wolf-Parkinson-White. La mutación H530R en PRKAG2 (subunidad gamma-2 de la enzima proteína quinasa activada por AMP) causa el síndrome de Wolf-Parkinson-White familiar, donde los ensayos preclínicos presentan una corrección del gen mediante el método de edición epigenética CRISPR, esta estrategia plantea ser curativa y corregir cualquier grado de hipertrofia ventricular.

Estas estrategias pueden no ser factibles, aunque la tecnología CRISPR presenta éxito y precisión en la edición; en este caso está dirigido a pacientes pediátricos en los cuales el daño de la enfermedad no es permanente. No obstante, las modificaciones en pacientes pediátricos o en la línea germinal no ha sido bien aceptadas por el público o los grupos científicos, también se suma el mismo problema de costo beneficio presente en las estrategias para ATTR.

Tarig *et al.* (2024) (53) en su investigación realizaron un pequeño análisis del mercado y determinaron que para las β -hemoglobinopatías los trasplantes rondan un precio total de 400.000\$; en comparación, la tecnología CRISPR, durante todo el desarrollo y la aplicación,

cuesta dos millones de dólares por paciente; un precio exorbitante en específico para enfermedades con poca aparición.

Ambos obstáculos impiden el avance de este enfoque de la tecnología CRISPR, tanto Asif *et al.* (2024) (56) como otras comunidades científicas han resaltado los altos costos que implica la creación e implementación de terapias CRISPR dirigidas a enfermedades con población minoritaria causado por la rareza de estas. Asif *et al* también menciona que la tecnología CRISPR para tratar enfermedades genéticas puede tener poca o escasa utilización en la medicina comunitaria, queda en evidencia que estas técnicas son de especialidad médica genética y requiere la asistencia de centros médicos genéticos; recurso de alto costo para el paciente.

Cabe resaltar que la edición genómica mediante CRISPR presenta mejores enfoques en el área cardiovascular no relacionada a enfermedades genéticas, de acuerdo con Musunuru (2023) (9) el objetivo genético PCSK9 y el gen similar a la angiopoyetina 3 (ANGPTL3) pueden editarse para generar una pérdida de la función que lleva a la reducción del colesterol LDL, y esta estrategia funciona como un protector contra hipercolesterolemia y la aterosclerosis. Esta plataforma, basada en la edición de base, presenta ensayos clínicos de fase 1 y 2 con mayor éxito, lo cual se encamina hacia una afectación global que podría incluirse en la práctica clínica de primer nivel.

La distrofia muscular de Duchenne es una enfermedad rara, pero con una mayor incidencia en conjunto con el grupo de distrofias musculares. Esta enfermedad es tratada clásicamente con glucocorticoides para disminuir la apoptosis y necrosis, los cuales mejoran la función, a la vez retrasan la escoliosis y miocardiopatía. A pesar del manejo con corticoides, la esperanza de vida de estos niños ronda los 20 años, además de limitar las actividades físicas y diarias por ser un padecimiento invalidante. El resto de los enfoques de tratamiento son aplicados para reducir los síntomas de insuficiencia cardíaca y la debilidad muscular mediante los protocolos tradicionales.

Según Musunuru (2023) (9) el enfoque de edición de base para los exones 23, 51 y 52 representa el mayor avance en edición CRISPR para distrofia de Duchenne porque significa una corrección en el ADN definitiva que elimina la enfermedad en un contexto más teórico que práctico. Asif *et al.* (2024) (56) resaltan los avances en la edición de las mutaciones del gen TBX5 causante del síndrome de Holt-Oram que incluye una distrofia y distorsión de las extremidades superiores. Estos estudios pronuncian la edición CRISPR/ Cas-9 como una plataforma de tratamiento definitiva para enfermedades sin solución, en comparativa con los tratamientos establecidos que no extienden la esperanza de vida del paciente.

Las enfermedades genéticas tratadas con fármacos reductores de síntomas o enfocadas en detener el progreso de la enfermedad conllevan años de terapias y altos gastos para el paciente sumado a los ajustes en la dosis y lidiar con los efectos secundarios. Caso contrario, las aplicaciones CRISPR intentan ser una cura definitiva de una sola aplicación en la vida, en específico, la dirección que toma la edición genómica es alargar la vida del paciente en forma estable y funcional. Este enfoque beneficia a las personas que padecen enfermedades invalidantes que afectan las actividades diarias básicas y funcionales, algunas de esas enfermedades son: el angioedema hereditario, enfermedades neurodegenerativas y la fibrosis quística, entre otras.

El costo económico es una barrera sin una clara resolución, la ambigüedad de los seguros médicos y la falta de presupuesto en la salud pública no permiten el ingreso de las aplicaciones CRISPR al uso clínico, además, se debe tener en cuenta que el monitoreo de las terapias genéticas debe permanecer mínimo un año y puede acarrear gastos no previstos. En la actualidad no existe una forma de abaratar costos en los materiales necesarios para la aplicación de las herramientas CRISPR, los presupuestos de investigación CRISPR son menores que otras tecnologías de edición genómica, pero sigue observándose un coste alto en comparación con tratamientos aprobados.

En este trabajo de investigación se abordaron estrategias CRISPR con enfoques precisos y eficientes, a pesar de este hecho, las terapias individuales para enfermedades genéticas presentan una falta de aplicación debido a la población a quien va dirigida: las

enfermedades genéticas son minorías raras de observar y con una aparición irradiada por toda la población mundial, no se puede centrar un estudio CRISPR dirigido a enfermedades genéticas con población de una sola ciudad y el paciente debe desplazarse hasta la ubicación del estudio o llevar el tratamiento hacia el paciente.

4.3.3. Limitaciones de las aplicaciones CRISPR.

La edición fuera de objetivo es la primera preocupación de la aplicación de edición genómica CRISPR en los pacientes, puesto que existe la probabilidad de inducir mutaciones tipo indel o activar oncogenes en secuencias similares al objetivo. En contra de lo anterior, la evidencia presente en los ensayos clínicos analizados revela la posibilidad de disminuir a 0% la tasa de indel, esta afirmación está sustentada por varios investigadores que buscan otros factores que influyentes en la seguridad de las aplicaciones CRISPR.

Este es un efecto secundario que acarrea todos los métodos de edición genómica, las técnicas CRISPR pueden llegar a presentar una mayor tasa de indel en comparación con sus hermanas ZFN o TALEN, en función del tipo y complejidad de edición objetivo. De acuerdo con González *et al.* (2021) (47) la tolerancia desigual al emparejamiento de los diversos elementos de edición con el ADN proporciona diferencias en las probabilidades de efectos secundarios. Para CRISPR existen dos puntos de inflexión, por su parte las regiones de la cromatina abierta pueden ser propensas a mutaciones provocadas por Cas-9 y, por otra, la actividad prolongada de la endonucleasa después de alcanzar la PAM, aumenta la probabilidad de actividad fuera de objetivo.

Wienert y Cromer (2022) (22) encontraron que las translocaciones también son posibles durante la actividad de la endonucleasa Cas-9. La translocación consiste en la unión de un fragmento de un cromosoma a cualquier otro cromosoma para crear un desequilibrio en la expresión genética. Existen tres momentos donde una translocación es posible: la primera es durante una reparación de la DSB por recombinación homóloga, la segunda durante una escisión del ADN simultáneo a edición fuera del objetivo donde los fragmentos de pares de

bases pueden mezclarse y, por último, en la utilización de mecanismo de edición genómica múltiple.

En respuesta a la aparición de la edición fuera de objetivo, se han creado métodos para la detección de posibles sitios de edición fuera de objetivo para permitir a los investigadores anticiparse a la edición no deseada y corregir el proceso en búsqueda de mejorar la seguridad de las herramientas CRISPR.

Wienart y Cromer (2022) (22) analizaron varias fuentes relacionadas a los efectos *off target*, con lo cual afirmaron que la variación del ADN de cada paciente determina directamente la actividad fuera de objetivo y, por lo tanto, se debe personalizar un plan de trabajo para analizar las probabilidades de indeles implementando varios métodos de detección.

Los métodos *in silico* se basan en la detección computarizada que simula la edición genómica CRISPR e identifican posibles sitios similares a la PAM diana que pueden iniciar una mutación. De acuerdo con Wienart y Cromer (2022) (22) los programas de predicción de indeles son implementados con alta frecuencia en fases preclínicas, pero cuando se realizan los ajustes a las herramientas CRISPR, no se debe considerar los programas de predicción como un absoluto porque estos no toman en cuenta el microambiente nuclear y los eventos epigenéticos que poseen las células; por ende, el siguiente paso es confirmar los datos con un método experimental.

Las técnicas experimentales disponibles para detectar edición fuera de objetivo son dos: métodos acelulares que solo requieren extraer el ADN de una muestra de tejido y los métodos de cultivo celular basados en experimentación *ex vivo*. Conting *et al.* (2023) (4) demostraron, gracias a un exhaustivo análisis, que los métodos de detección basados en cultivo celular presentan los mejores resultados en ensayos clínicos y preclínicos. La herramienta de detección WGS (secuenciación del genoma completo) de cultivo celular se observa con frecuencia en la fase preclínica de los estudios y este método permite evaluar las

secuencias antes y después de la edición CRISPR/ Cas-9, lo cual funciona para verificar las alteraciones no deseadas en células de pacientes en estudios de fase clínica.

GUIDE-seq (identificación imparcial de DSB en todo el genoma habilitada por secuenciación) es el segundo método mayormente usado por los investigadores, está basado en oligonucleótidos, este mecanismo detecta indeles hasta en una tasa baja de 0.03%. Esta herramienta es de coste bajo, por lo cual es de fácil acceso y posee una alta sensibilidad.

La detección *in vivo* es un método para la detección de edición fuera del objetivo que todavía está en fase de experimentación. La modalidad de *Discover-seq* que aplica la exonucleasa MRE-11, es una proteína de reparación de ADN endógena que puede identificar DSB causada por CRISPR, esta herramienta es aplicada a una muestra de tejido del paciente y se cuantifica con la aparición de anticuerpos (4).

La detección *in vivo* es relativamente nueva y todavía presenta errores como falsos positivos y tiempo de acción corto. Hasta el momento las técnicas *in vivo* siguen en desarrollo, ya que en su lugar los investigadores prefieren métodos confiables y con alta viabilidad de resultados antes que estas, pero las expectativas se mantienen abiertas a futuros avances.

La secuenciación dirigida de amplicones permite identificar indeles pequeños en el sitio de corte del ADN, esta se emplea cuando los métodos de detección avanzados no alcanzan a determinar las tasas de indeles mínimos. Wienert y Comer *et al.* (2022) (22) comentan que los amplicones son fragmentos de ADN generados con una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde los fragmentos son aislados por electroforesis y cuantificados por técnicas de secuenciación.

La ventaja de los amplicones es su capacidad para reportar mutaciones muy pequeñas que pueden pasar desapercibidas, pero tiene las siguientes limitaciones: deleciones que eliminan la PAM vuelven imposible determinar las mutaciones en esa secuencia, múltiples

indeles pueden sesgar la detección y, por último, duplicación e inserciones grandes interfieren en la detección de pequeños indeles.

Los métodos acelulares consisten en extraer el material genético de la célula y reconstruir la reacción de la Cas-9 en el ADN o la cromatina, este es un método de tubo de ensayo. *Digenome-seq* (secuenciación del genoma digerido) es la versión primaria de esta herramienta de detección y a partir de ella surgieron variantes dirigidas a la cromatina o a una modificación del proceso (22).

Congting *et al.* (2023) (4) demostraron que la relevancia de la detección basada en *Digenome-seq* radica en su capacidad de detectar tasas de indel de hasta 0.01%, lo cual es de utilidad cuando los métodos celulares no detectan indeles pequeños.

La detección celular de edición fuera de objetivo posee dos limitaciones particulares. Al respecto, Conting *et al.* (2023) (4) informa que *Digenome-seq* es un método de alta eficiencia y de excelente calidad, pero altamente costoso con un precio que ronda entre 200-1000\$ por genoma analizado. Sumado a lo anterior; las variantes basadas en este método pueden alcanzar tasas de falsos negativos de hasta 29%, lo cual convierte dichos métodos en opciones poco viables.

Utilizar diversos métodos de detección de indeles asegura un perfil de seguridad con mayor fidelidad, el inconveniente de esta afirmación radica en los recursos económicos o de material que incrementa el presupuesto de una investigación CRISPR. A pesar del coste y la necesidad de tiempo para aplicar las correcciones, este es un paso que no puede evadirse porque una investigación genómica necesita mínimo dos métodos de detección de efectos *off target* para tener credibilidad, aplicando la detección en diferentes momentos del estudio.

A continuación, la tabla 7 resume las ventajas, desventajas y clasifica los métodos de detección para edición fuera del objetivo que en la actualidad siguen vigentes, los cuales han sido mencionados durante esta sección del análisis.

Tabla 7. Métodos de detección para edición fuera de objetivo.

	Subtipo	Métodos	Ventajas	Desventajas
Predicción <i>In silico</i>	Modelos basados en alineación	CasOT	Ajustable en secuencia la PAM. Permite 6 desajustes pb.	No considera el ambiente celular.
		Cas-OFFinder	Ajustable en longitud de ARN, tipo de PAM y número de desajustes.	No considera el ambiente del núcleo celular.
		FlasFry	Proporciona datos sobre los contenidos de GC.	Los resultados necesitan validación por métodos experimentales.
		Crisflash	Alta velocidad.	
	Basados en puntuación	MIT	Basado en la posición de los desajustes en el ARNsg.	Depende de la base de datos de efectos fuera de objetivo.
		CCTop	basado en las distancias de los desajustes con el PAM.	
		CROP-IT		
		CFD	Utiliza una base de datos.	
		Deep CRISPR	Considera la secuencia y los factores epigenéticos.	
	Elevation			
Detección por experimento	Métodos Acelular	Digenome-seq	Alta sensibilidad.	Costoso.
		DIG-seq	Utiliza cromatina libre de la célula.	Requiere alta cobertura de secuenciación y un genoma de referencia.
		Extru-seq	Baja tasa de error.	Costoso.

			Baja tasa de falso positivo.	Sesgado por translocaciones y depleciones cromosómicas.
		SITE-seq	Profundidad de lectura mínima.	Baja sensibilidad.
		CIRCLE-seq	No requiere un genoma de referencia.	
	Métodos de cultivo celular	WGS	Análisis compresivo de todo el genoma antes y después de la edición.	Costoso. Numero de clones analizables limitado.
		CHIP-seq	Analiza los sitios de unión de Cas-9 catalíticamente inactivos en todo el genoma.	Baja tasa de validación. Afectada por anticuerpos y accesibilidad a la cromatina.
		IDLV	Detecta sitios fuera de objetivo en células difíciles de transfectar.	Baja sensibilidad. Alta tasa de falsos positivos.
		GUIDE-seq	Integra oligonucleótidos en la DSB. Alta sensibilidad y bajo costo	La eficiencia de la transfección limita los resultados.
		LAM-HTGTS	Alta precisión en detección de translocaciones inducidas por DSB	Solo detecta translocaciones.

		BLESS	Captura DSB <i>in situ</i> mediante adaptadores biotinilados.	Solo identifica la edición fuera de objetivo en el momento de exacto de realizar la detección.
		BLISS	Captura DSB <i>in situ</i> con oligonucleótidos y la secuencia promotora T7	
	Detección <i>in vivo</i>	Discover-seq	Utiliza la proteína de reparación del ADN MRE-11. Alta sensibilidad y precisión.	Tasas variables de falsos positivos.
		GUIDE-tag	Utiliza la molécula biotina-ADNdc. Alta sensibilidad.	La tasa de unión de biotina-ADdc es baja, <6%.

El contenido GC se refiere a la proporción de bases guanina (G) y citosina (C), este es un dato de estabilidad del ADN. IDLV: Lentivirus Deficientes en Integrasa. biotina-ADNdc: biotina dirigida al ADN bicatenario. MRE-11: proteína de reparación recombinación meiótica 11. Fuente: elaboración con base en la referencia (4).

En respuesta para solucionar la producción de indeles por la actividad de Cas-9 surgen los mecanismos de mitigación de la actividad fuera de objetivo. Wienert y Cromer *et al.* (2022) (22) resumen los mecanismos de alta efectividad para reducir el efecto *off target* entre los cuales destacan los siguientes: inhibición de la vía de reparación NHEJ, cuyo objetivo es acceder a la reparación por homología evitando los indeles; la ingeniería de proteínas para crear ligandos de Cas-9 que potencian o modifican su función; y la creación de mecanismos de entrega dirigida.

Modificar las funciones de la endonucleasa Cas-9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas-9) es un enfoque conocido e implementado con frecuencia. Wienert y Cromer *et al.* (2022) (22) llegaron a la conclusión que los diseños más específicos de Cas-9 permiten reducir hasta 20 veces la probabilidad de efecto de edición fuera del objetivo porque la modificación que presenta una amplia efectividad es la nickasa-9. Para mejorar la especificidad de Cas-9, se bloquea uno de los dominios de nucleasa; por lo tanto, la nickasa solo puede cortar una

cadena del ADN, esta perspectiva se emplea en la edición de base y la edición epigenética donde realizar cambios sutiles en el ADN inactiva los genes que producen los síntomas de las enfermedades genéticas.

El formato de administración de Cas-9 altera la duración de la exposición y el tiempo de actividad de la endonucleasa, los vectores pueden desencadenar reacciones de inmunogenicidad y, posteriormente, ser eliminados por los linfocitos T citotóxicos; por este motivo se prefiere vectores con baja inmunogenicidad. De acuerdo con González *et al.* (2021) (47) el vector con mayor margen de empleo son los AAV (virus adenoasociados), un vector con una limitada capacidad de empaquetamiento; en tanto no puede transportar moléculas de larga longitud y se limita a ARNsg de pequeño tamaño.

Wu *et al.* (2020) (15) en su análisis explicaron que los ARNsg de pequeño tamaño con vida media corta disminuyen la probabilidad de actividad fuera de objetivo. Asimismo, como respuesta a la falta de capacidad de los AAV, los métodos no virales, como la electroporación, ganan popularidad en la administración de componentes de edición genómica y presentan una ventaja especial al no desencadenar efectos citotóxicos.

Las técnicas de administración no virales se aplican en los medios *ex vivo* a células madre extraídas del paciente, pero en la administración *in vivo* estos métodos no son posibles; por lo que, en su lugar, para incorporar a la célula el complejo Cas-9/ ARNsg *in vivo* se crearon las nanopartículas: un vector con baja reacción inmune y que en los ensayos clínicos demuestra menor cantidad de síntomas relacionados a la infusión.

Según Cheng *et al.* (2021) (24) las nanopartículas exosomas ganan popularidad como vector de componentes genéticos porque consisten en vesículas plasmáticas que pueden transportar la Cas-9 y un ARNsg >10pb, lo cual es un método con mayor estabilidad en comparativa con otras nanopartículas o vectores virales

Además, posee dos capacidades muy significativas alta biocompatibilidad e inmunogenicidad insignificante; ambas características reducen el riesgo a actividad fuera de

objetivo. Los exosomas fueron concebidos en los estudios CRISPR para editar oncogenes y se expandió hacia los estudios con dirección en las enfermedades genéticas debido a su efectividad y fácil adquisición (24).

Los vectores proporcionan enfoques alternativos para evitar los riesgos relacionados a los indeles, la alta gamma de variantes de vectores permite seleccionar la más adecuada para dirigir la focalización del objetivo y reducir la toxicidad celular relacionada a los elementos CRISPR. En contraste para una mejor mitigación de la edición fuera de la diana, se debe considerar emplear más de una forma de mitigación para ampliar la protección contra los efectos adversos de la edición CRISPR/Cas-9.

Algunos autores exponen que los métodos de corrección de la edición fuera de objetivo han permitido dejar la de visualizar este fenómeno como el principal obstáculo a vencer de la tecnología CRISPR. Otras reacciones negativas se manifiestan durante la aplicación de herramientas CRISPR, las cuales deben ser tomadas a consideración.

De acuerdo con Sharma *et al.* (2020) (45), en un principio los cortes fuera del objetivo que generan una ruptura simple de la doble cadena se planteaban como el único factor que disminuye la especificidad de Cas-9, pero gracias al desarrollo de métodos de detección y mitigación de edición no deseada en la actualidad, este problema es solucionable y no debería ser un factor que comprometa la credibilidad de la edición CRISPR/ Cas-9.

Actualmente, la respuesta inmunológica contra Cas-9 es vista por muchos investigadores como el principal inconveniente en la edición genómica CRISPR. Los componentes bacterianos o sintéticos tienen la capacidad de fomentar la inmunogenicidad, esto se refiere a la capacidad que tiene un fármaco o un compuesto de producir una reacción inmune.

El estudio de Wu *et al.* (2020) (15) expone varios reportes de IgG anti-Cas9 de *Streptococcus pyogenes* y del estafilococo en pacientes sanos, también resalta la alta prevalencia de células T efectoras hacia Cas-9. La respuesta humoral se activa frente a los

componentes CRISPR, la hipótesis plantea que la aparición de anticuerpos contra los elementos de edición genómica afecta la permanencia de la edición junto con la durabilidad del complejo Cas-9/ ARNsg.

En la revisión de Asif *et al.* (2024) (56), concluyó que el 60% de los pacientes posee una respuesta humoral y celular adaptativa previamente sensibilizada hacia la endonucleasa Cas-9. Según la investigación de González *et al.* (2021) (47), se puede encontrar una reacción inmune contra la SpCas-9 de entre 42-67% de los pacientes que reciben una aplicación CRISPR.

A diferencia de otras terapias aprobadas para el uso clínico, la versatilidad de CRISPR le permite evolucionar, en tanto una característica analizada al comparar la edición CRISPR para β -hemoglobinopatías con las terapias de transfusión y trasplante son las estrategias en las cuales las reacciones adversas son conocidas e identificables pero impredecibles. Es posible que en investigaciones futuras se diseñe una técnica para mitigar las reacciones inmunológicas de los componentes de edición genómica.

Según Sharma *et al.* (2020) (45), los eventos de reparación del ADN y reordenamiento genético después de la edición genómica interfieren con la eficiencia y la permanencia de la mutación inducida. Las inserciones de varios nucleótidos pueden inducir mutaciones no prevista o inducir nuevas variantes de expresión de proteínas, mientras que las diferentes rutas de reparación del ADN bajan el tiempo de permanencia de la edición deseada.

De acuerdo con Wu *et al.* (2020) (15) la reparación de la DSB se desencadena siempre después de que Cas-9 realiza la escisión, la célula activa la respuesta al daño del ADN dependiente de p53 y el ciclo celular se detiene hasta completar cualquier ruta de reparación del ADN. Las células madre pluripotentes humanas son altamente susceptibles a la activación de p53 y disminuyen la permanencia de la edición de la secuencia, en respuesta la edición de bases o la edición principal sobre el gen p53 en estas células puede ser una aceptable solución.

El reordenamiento de la secuencia diana puede alterar la edición realizada, Yacoub *et al.* (2023) (31) afirman que la reparación NHEJ inserta o elimina nucleótidos que no son múltiplos de tres, esto puede producir la síntesis de proteínas truncadas o la total ausencia de traducción de una proteína. La reparación HDR permite la integración de una secuencia determinada al evadir la eliminación de nucleótidos, aunque influir en la célula para encaminar la reparación de la DSB hacia el método HDR no es sencillo, así se garantiza una menor probabilidad de indeles que con la reparación NHEJ.

Es relevante tener en cuenta que se debe investigar a fondo cómo la inmunogenicidad afecta la permanencia de la edición o las funciones de Cas-9; aunque las fuentes revisadas para el análisis de este trabajo de investigación no hayan arrojado datos sobre factores que influyen directamente sobre la inmunogenicidad de Cas-9.

En cuanto a otros efectos negativos como las translocaciones o inactivación de cromatina, no se encontró más información, este hecho se observa porque la tecnología CRISPR es relativamente nueva, es decir, se requiere tiempo para expandir los conocimientos que hacen falta sobre la edición genómica CRISPR/ Cas.

4.3.4. El debate ético.

No es objetivo de esta revisión adentrarse en los temas éticos asociados con las tecnologías genómicas; sin embargo, resulta relevante ahondar un poco en el debate ético que surge alrededor de la implementación del sistema CRISPR/ Cas-9 para la edición de genes humanos en el área de la medicina.

Según Vaglio (2023) (10) existen muchas preocupaciones sobre los usos de la tecnología CRISPR en diferentes niveles de la ética y la moral médica, las cuales afectan el establecimiento de las aplicaciones en la práctica clínica. Las discusiones de los problemas éticos de CRISPR se agrupan en tres temáticas: implicaciones del uso en la salud pública, edición genómica en la línea germinal y el carácter negativo de la eugenesia.

La necesidad de cuestionar los avances científicos nace del temor humano al cambio y los peligros que atrae modificar las condiciones naturales. La aplicación de terapias CRISPR no escapa a este suceso, las instituciones científicas y de salud pública debaten sobre el tipo de regulación legal y sanitaria que las tecnologías genómicas deben incluir ante la posibilidad de usarse como terapias para enfermedades de cualquier tipo.

Infante *et al.* (2021) (57) realizaron una revisión sistemática y determinaron que los comités de bioética en Latinoamérica tendrán el deber de aclarar los usos admisibles en la investigación CRISPR en los siguientes aspectos: estudios implementados solamente en células somáticas, investigaciones en embriones no humanos y control sobre las investigaciones en células germinales.

El control sobre la investigación busca colocar límites biológicos y equivalencia en los beneficios, pero sin dejar de lado las preocupaciones de la comunidad científica por los efectos fuera de objetivo y las reacciones adversas. En contraposición el restringir las investigaciones en embriones limita la posibilidad de desarrollar terapias relacionadas con células madre o realizar correcciones en genómica que eviten enfermedades genéticas en embriones (57).

Infante y su equipo concluyeron que las normativas sobre el uso del sistema CRISPR debe proteger los intereses científicos para promover un control legislativo democrático sin tener que reducir las capacidades de expansión del conocimiento o las posibilidades terapéuticas. Los comités de ética son instrumentos con el objetivo de simplificar los procedimientos legales, pero en muchos casos tratan de generar una pérdida de credibilidad en los hallazgos de la tecnología CRISPR.

Para la presente revisión, es evidente la falta de literatura Centroamérica con respecto a permitir investigaciones CRISPR en la medicina. No se encontró literatura que trate sobre el pensamiento actual del comité nacional de ética sobre las tecnologías CRISPR en Costa Rica, tampoco protocolos que restrinjan el inicio de investigación genómica. Este hecho revela que la salud pública o privada en el país no está preparada para abordar investigaciones

fuera de lo epidemiológico, lo cual en un futuro podría ser un impedimento en el avance del sistema de salud.

Los países más desarrollados, como Estados Unidos y Francia, no muestran ninguna resiliencia de la investigación en células somáticas, por el contrario, tanto las naciones desarrolladas y las menos establecidas económicamente rechazan en parte las modificaciones sobre la línea germinal. La revisión sistemática de González (2021) (58) conceptualizó las técnicas en la línea germinal como las ediciones realizadas en embriones tempranos o en células madre pluripotenciales humanas, este rechazo se debe a la posibilidad de herencia genética que conllevan las células germinales, en su lugar, las modificaciones realizadas a células somáticas mueren con el paciente y no se heredan a la siguiente generación.

Janik *et al.* (2020) (2) analizaron el hecho de que la tecnología CRISPR busca la prevención de la transmisión de variantes genéticas que causan enfermedades para evitar que futuras generaciones hereden los mismos problemas de salud y este aspecto puede ser visto como mejoramiento de las capacidades humanas.

La eugenesia, la dignidad humana y el transhumanismo representa ejes de pensamiento que definen la opinión pública sobre cualquier modificación en el ADN humano, incluidas las técnicas CRISPR. Infante *et al.* (2021) (57) refirieron diferentes posturas sobre el mejoramiento humano, lo cual permite concluir que las comunidades científicas y la población en general visualizan las modificaciones en el ADN como una puerta hacia divisiones sociales marcada por ejes evolutivos manipulables.

En la revisión de Chodnekar y Tsetskhladze (2024) (37) advierte del uso malintencionado de la tecnología CRISPR. Los avances de terapias CRISPR dirigidas a enfermedades genéticas han demostrado que la edición con endonucleasas permite modificar cualquier parte del ADN, bajo ese concepto se originó la hipótesis de que el sistema CRISPR puede emplearse para provocar enfermedades en lugar de curarlas un tema controversial que podría ser investigado a fondo en otro análisis.

Desde otro ángulo, la legislación en la materia fomenta el control y los límites necesarios para no poner en riesgo a la población, también se debe evitar confinar la expansión del conocimiento o los alcances de las terapias CRISPR. González *et al.* (2021) (58) hacen hincapié en las políticas internacionales sobre realizar intervenciones o experimentación en embriones humanos, donde incluso algunos países prohíben estas prácticas en animales. Si bien los países en vías de desarrollo pueden no tener un interés particular en las terapias CRISPR, mantener una relación actualizada es un método de control sobre las posibles investigaciones genómicas.

Mediante los estudios analizados en esta sesión, se deduce que no existe una posición fija con respecto a la implementación de la tecnología CRISPR en la práctica clínica para tratar enfermedades genéticas. Las comunidades científicas se dividen entre polos opuestos y desacuerdan entre las limitaciones que deberían imponerse sobre las investigaciones, sumado a ello, no todos los países sienten interés en permitir el crecimiento de las técnicas de edición genómica y los comités de ética no se pronuncian al respecto.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

En este apartado se darán a conocer las conclusiones obtenidas, a partir de la revisión exhaustiva de las fuentes de información sobre los avances de la investigación CRISPR. A continuación, se presentan tres conclusiones por cada objetivo específico.

- 1- Los elementos y los mecanismos de CRISPR son altamente comprendidos, por lo que seguir con las investigaciones garantiza un incremento en los conocimientos. Las investigaciones evidencian la importancia de Cas-9 como elemento de escisión del ADN y también la relevancia de los métodos *ex vivo* para la edición de células madre; un método que promete desarrollar curas definitivas para enfermedades genéticas.
- 2- La versatilidad, accesibilidad y fácil uso de la tecnología CRISPR/ Cas-9, en tanto, esta permite el desarrollo de técnicas avanzadas con mayor efectividad, la edición principal y la edición estándar son técnicas que presentan mayor cantidad de avances en eficiencia y comprensión. La edición genómica CRISPR/ Cas-9 es la técnica mayormente utilizada para la edición de genes dirigido a enfermedades genéticas.
- 3- Se ha demostrado que la implementación de reparación HDR ha resultado efectiva debido a su menor tasa de indel y la incorporación de una plantilla de reparación que conserva la edición genómica. La vía de reparación del ADN NHEJ representa un método sencillo y con alta disponibilidad, pero susceptible a la inserción o eliminación de nucleótidos.
- 4- Las β -hemoglobinopatías representa las principales enfermedades estudiadas con la tecnología CRISPR, lo cual permitió la aprobación de Casgevy el primer editor del gen HBB basado en las técnicas CRISPR. La eficiencia de CRISPR, aunque variable entre estudios clínicos, supera los métodos de edición genómica anteriores y respalda un análisis mayor; sin embargo, no todas las enfermedades genéticas ostentan la población adecuada que justifique los estudios y el costo económico de desarrollar terapias CRISPR.

- 5- La importancia de los ensayos preclínicos radica en su capacidad de determinar los factores de seguridad biológica de los editores de genes previo a la fase clínica. En el estudio de enfermedades genéticas es relevante realizar ajustes en la mitigación de la edición fuera de objetivo y los vectores; es decir, durante la fase preclínica.
- 6- Las terapias CRISPR asociadas a enfermedades genéticas poseen un amplio potencial, pero Costa Rica no ofrece un enfoque respecto a admitir las investigaciones en edición genómica en comparación con los países de Suramérica, Estados Unidos o China. En esta revisión no se encontró precedentes nacionales donde se aborden la implementación de esta tecnología en la población nacional.
- 7- La tecnología CRISPR continúa siendo la técnica con mayor eficiencia para la edición de secuencias genéticas, debido a la versatilidad, menor costo y la evidencia de su efectividad reflejada en los ensayos clínicos dirigidos a enfermedades genéticas. Es crucial aclarar que ZFN y TALEN no están en desuso y se presentan como técnicas igualmente seguras.
- 8- Las aplicaciones CRISPR, enfrenta diversas barreras y desafíos, dentro de los cuales el costo económico y el riesgo biológico pueden mitigar la capacidad de la tecnología para desarrollarse. Es esencial aumentar los estudios sobre los efectos secundarios de las herramientas CRISPR, principalmente sobre la edición fuera de objetivo e inmunogenicidad; factores que influyen directamente sobre la seguridad y eficiencia de la edición genómica CRISPR.
- 9- La tecnología CRISPR se exhibe como una posible cura para enfermedades genéticas que presentan clínica severa; no obstante, a pesar de la existencia de tratamientos para reducir los síntomas y retrasar el progreso de las enfermedades, las terapias CRISPR poseen una efectividad superior. El obstáculo ético biomédico aparenta no esclarecer la posición de la comunidad científica respecto a la implementación de las aplicaciones CRISPR en la práctica clínica.

5.2. Recomendaciones.

- 1- Es fundamental habilitar dentro del temario de las instituciones educativas en medicina la edición del genoma y los tratamientos genéticos. Esta acción permite expandir la educación del sistema CRISPR y sus posibles aplicaciones en enfermedades genéticas, lo cual ayuda a sembrar el interés de los futuros médicos en la investigación genómica.
- 2- La comunicación transparente es necesaria para la aceptación pública. Explicar los avances y los mecanismos de acción de las aplicaciones CRISPR para el tratamiento de enfermedades genéticas al público en general, abre la posibilidad de la aceptación de estas herramientas genéticas. Para ello se puede distribuir la información a través de los canales de comunicación, las redes sociales y los recursos multimedia facilitan el acceso a la información y representan un medio para llegar a toda la población.
- 3- Los diseños 3D realizados en *software* de las endonucleasas, los componentes CRISPR y las secuencias genéticas pueden ayudar a incrementar la comprensión sobre cómo funcionan los mecanismos de reparación del ADN. Asimismo, los modelos 3D ayudan a desarrollar cambios de conformación en la Cas-9, lo cual da como resultado nuevas funciones que aumenten la precisión de las herramientas CRISPR.
- 4- Se recomienda realizar un análisis más profundo de los factores que afectan directa o indirectamente la permanencia de la edición genómica. Es necesario comprender la durabilidad de las modificaciones realizadas, la cura de una enfermedad genética mediante CRISPR depende de la estabilidad del ADN después de ser editado.
- 5- Es recomendable enfatizar en las investigaciones en la inmunogenicidad de los elementos CRISPR, en búsqueda de esclarecer los factores que actúan sobre la permanencia y eficiencia de la edición genómica, las posibles reacciones inmunológicas causadas por los elementos de edición genómica, las cuales surgen

como el obstáculo biológico más importante a resolver. Para estos casos, es recomendable cuantificar las reacciones inmunes para determinar cuánto afecta en la eficiencia de las aplicaciones CRISPR.

- 6- Es recomendable en un segundo análisis realizar una comparación entre la eficiencia de la tecnología CRISPR y otras terapias genéticas como los ARN interferente en el tratamiento de enfermedades genéticas. La eficiencia y seguridad de CRISPR frente a ZFN y TALEN es superior, por lo que comparar la edición genómica con terapias genéticas basadas en megaendonucleasas o ARN permitiría entablar direcciones futuras de las terapias personalizadas.
- 7- La inteligencia artificial (IA) es una tecnología moderna que gana auge en diferentes áreas de la ciencia y está basada en algoritmos que simulan la solución de problemas, es sugerente verificar si los métodos de detección de edición fuera de objetivo podrían beneficiarse de la simulación mediante IA, así como la veracidad que aportaría la implementación de la tecnología IA a los métodos de mitigación de efectos *off target*.
- 8- Se sugiere realizar la consulta al comité nacional de ética médica con respecto a pronunciar las implicaciones éticas de la investigación genómica en Costa Rica. Los países centroamericanos no demuestran interés en nuevas terapias o en estimular la investigación local, dictar normas y límites es el primer paso para permitir el ingreso de los estudios genéticos mediante CRISPR en Costa Rica.
- 9- Abordar las cuestiones de acceso, justicia y derechos humanos con el fin de asegurar la equidad en la accesibilidad de los conocimientos adquiridos en regiones en desarrollo. Esta acción se puede lograr verificando los estatutos legales de las instituciones gubernamentales dirigido al desarrollo de la investigación biológica y la existencia de reglamentos que impidan las diligencias necesarias para promover las aplicaciones CRISPR.

Referencias

1. Jiang F, Doudna J. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annuals reviews* [Internet]. 2017; 46(1): p. 505-529. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>.
2. Janik E, Niemcewicz M, Ceremuga M, Krzowski L, Bijak S, Bijak M. Various Aspects of a Gene Editing System—CRISPR–Cas9. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2020; 21(24): p. 9604. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/24/9604>.
3. Laurent M, Geoffroy M, Pavani G, Guiraud S. CRISPR-Based Gene Therapies: From Preclinical to Clinical Treatments. *Cells* [Internet]. 2024; 13(10): p. 800. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4409/13/10/800>.
4. Congting G, Xiaoteng M, Fei G, Yuxuan G. Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing. *Frontiers* [Internet]. 2023; 11(1). Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2023.1143157/full>.
5. Zhang H, Qin C, An C, Zheng X, Wen S, Chen W, et al. Application of the CRISPR/Cas9-based gene editing technique in basic research, diagnosis, and therapy of cancer. *Molecular Cancer* [Internet]. 2021; 20(126). Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12943-021-01431-6>.
6. Doudna J. CRISPR in nature. *CRISPRpedia* [Internet]. 2022; 1(1). Disponible en: <https://innovativegenomics.org/es/crisprpedia/crispr-en-la-naturaleza/>.
7. Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, et al. Search and replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* [Internet]. 2019; 576(1): p. 149-157. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6907074/>.
8. Pavani G, Fabiano A, Laurent , Amor F, Cantelli E, Chalumeau A, et al. Correction of b-thalassemia by CRISPR/Cas9 editing of the a-globin locus in. *blood advances* [Internet]. 2021; 5(5): p. 1137–1153. Disponible en: <https://ashpublications.org/bloodadvances/article/5/5/1137/475292/Correction-of-thalassemia-by-CRISPR-Cas9-editing>.
9. Musunuru K. CRISPR and cardiovascular diseases. *Cardiovascular Research* [Internet]. 2023; 119(1): p. 79-93. Disponible en:

<https://academic.oup.com/circvascres/article/119/1/79/6564520?login=false#398929950>.

10. Vaglio Cedeño C, Rodriguez EJ, Morales F. Aplicaciones clínicas de la herramienta CRISPR-Cas. *Acta Medica Costarricense*. 2023; 65(3): p. 113-123. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022023000300113.
11. Yang , He L, Xie Y, Zhu L, Wu J, Fan Y, et al. In situ correction of various β -thalassemia mutations in human hematopoietic stem cells. *Frontiers* [Internet]. 2024; 11(2023). Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2023.1276890/full>.
12. Fragoul H, Locatelli F, Sharma A, Bhatia M, Mapara M, Molinari L, et al. Exagamglogene Autotemcel for Severe Sickle Cell Disease. *The New England Journal of Medicine* [Internet]. 2024; 390(18): p. 1649-1662. Disponible en: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2309676?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed.
13. Gillmore D, Gane E, Taubel , Kao J, Fontana M, Maitland ML, et al. CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2021; 385(6): p. 493-502.
14. Cohn DM, Gurugama , Katelaris CH, Launay , Bouillet L, Petersen RS, et al. CRISPR-Based Therapy for Hereditary Angioedema. *The New England Journal of Medicine* [Internet]. 2024; 392(5): p. 458-467. Disponible en: <https://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa2405734>.
15. Wu SS, Li QC, Yin CQ, Yue W, Sung CQ. Advances in CRISPR/Cas-based Gene Therapy in Human Genetic Diseases. *Theranostics* [Internet]. 2020; 10(10): p. 4374-4382. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7150498/>.
16. Knoppers BM, Kleiderman E. “CRISPR babies”: What does this mean for science and Canada? *Canadian Medical Association Journal*. 2019; 194(4): p. 91-92. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6342697/#:~:text=The%20ethical%20critiques%20can%20be,chilling%20effect%E2%80%9D%20on%20scientific%20research>.
17. Readman M, King A, Watson C, King D. What is CRISPR/Cas9? *Archives of Disease in Childhood - Education and Practice*. 2016; 101(213): p. 213-215. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4975809/>.
18. Komor C, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* [Internet]. 2016;

533(1): p. 420-424. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nature17946#citeas>.

19. Cong L, Ran A, Cox D, Lin S, Barretto , Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* [Internet]. 2013; 819(23): p. 819-823. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3795411/>.
20. van der Oost J, Jore M, Westra E, Lundgren , Brouns S. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends in Biochemical Sciences* [Internet]. 2009; 34(8): p. 401-407. Disponible en: [https://www.cell.com/trends/biochemical-sciences/fulltext/S0968-0004\(09\)00120-0?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0968000409001200%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/biochemical-sciences/fulltext/S0968-0004(09)00120-0?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0968000409001200%3Fshowall%3Dtrue).
21. Wiedenheft B, Kaihong Z, Jinek M, Coyle S, Ma W, Doudna J. Structural Basis for DNase Activity of a Conserved Protein Implicated in CRISPR-Mediated Genome Defense. *Structure* [Internet]. 2009; 17(6): p. 904-912. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19523907/>.
22. Wienert B, Cromer K. CRISPR nuclease off-target activity and mitigation strategies. *Frontiers* [Internet]. 2022; 4(1). Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/genome-editing/articles/10.3389/fgeed.2022.1050507/full>.
23. Misganaw AM. Viral Vectors for the in Vivo Delivery of CRISPR Components: Advances and Challenges. *Frontiers* [Internet]. 2022; 10(1). Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2022.895713/full>.
24. Cheng H, Zhang F, Ding Y. CRISPR/Cas9 Delivery System Engineering for Genome Editing in Therapeutic Applications. *Pharmaceutics* [Internet]. 2021; 13(10): p. 1649. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/10/1649>.
25. Manghwar H, Li B, Ding X, Hussain A, Lindsey K, Zhang X, et al. CRISPR/Cas Systems in Genome Editing: Methodologies and Tools for sgRNA Design, Off-Target Evaluation, and Strategies to Mitigate Off-Target Effects. *Advanced Ciencias*. 2020; 7(6): p. 1-16. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7080517/>.
26. Suhyung C, Jongoh C, Byung-Kwan C. Applications of CRISPR/Cas System to Bacterial Metabolic Engineering. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2018; 19(4): p. 1089. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5979482/>.

27. Wilson R. CRISPR Technology. CRISPRpedia [Internet]. 2022; 1(1). Disponible en: <https://innovativegenomics.org/es/crisprpedia/tecnolog%C3%ADa-da-crispr/#Gene-drives>.
28. Wang D, Zhang F, Gao G. CRISPR-Based Therapeutic Genome Editing: Strategies and In Vivo Delivery by AAV Vectors. Cell [Internet]. 2020; 181(1): p. 136-150. Disponible en: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(20\)30285-3](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(20)30285-3).
29. Maganti HB, Bailey AJM, Kirkham AM, Shorr R, Pineault N, Allan DS. Persistence of CRISPR/Cas9 Gene Edited Hematopoietic Stem Cells Following Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis of Preclinical Studies. Stem Cells Translational Medicine [Internet]. 2021; 10(7): p. 996–1007. Disponible en: <https://academic.oup.com/stcltm/article/10/7/996/6516479?searchresult=1>.
30. Bharathkumar N, Sunil A, Meera , Aksah S, Kannan M, Saravanan KM, et al. CRISPR/Cas-Based Modifications for Therapeutic Applications: A Review. Molecular Biothecnology [Internet]. 2021; 64(4): p. 355-372. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8571677/#notes4>.
31. Yacoub TB, Wohlschlegel J, Sähel JA, Zeitz C, Audo S. CRISPR/Cas9 : de la recherche à l’application thérapeutique. Journal français d'ophtalmologie [Internet]. Abril; 46(4): p. 398-407. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0181551223000463>.
32. Ahumada Ayala M, Aguilar Lopez R, González-Stoylov N, Palacio Sosa E, Cervantes Barragán DE, Fernández Hernández L. Editing the Human Genome with CRISPR/Cas: A Review of its Molecular Basis, Current Clinical Applications, and Bioethical Implications. Revista de Investigacion Clinica [Internet]. 2023; 75(1): p. 13-28. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762023000100013&lang=es#ref42.
33. Bouchard C, Godbout K, Tremblay JP. La correction de mutations pathogènes par Prime editing. Med Sci [Internet]. 2024; 40(10): p. 748 - 756. Disponible en: https://www.medecinesciences.org/fr/articles/medsci/full_html/2024/08/msc240013/msc240013.html.
34. Sánchez Artigas R, Díaz Armas MT, Rodríguez Duque R, Miguel Soca E. Principios y aplicaciones médicas de la edición de genes mediante CRISPR/Cas. MediSur [Internet]. 2021; 19(6): p. 1005-1014. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2021000601005&lang=es.

35. Martin H, Wassef M. L'ingénierie ciblée de l'épigénome. *Med Sci* [Internet]. 2024; 40(12): p. 955 - 962. Disponible en: https://www.medecinesciences.org/fr/articles/medsci/full_html/2024/11/msc240143/m-sc240143.html.
36. Sharma A, Boelens JJ, Cancio M, Hankins JS, Bhad P, Azizy M, et al. CRISPR-Cas9 Editing of the HBG1/HBG2 Promoters to Treat Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2023; 389(9): p. 820–832. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10947132/>.
37. Chodnekar SY, Tsetskhladze Z. CRISPR CLIP: comprehensive reviews on interventional studies using precision recombinant technologies: clinical landmarks, implications, and prospects. *Oxford Open Immunology* [Internet]. 2024; 5(1). Disponible en: <https://academic.oup.com/oim/article/5/1/iqae013/7906502?searchresult=1#496505972>.
38. Locatelli F, Lang P, Wall D, Meisel R, Corbacioglu S, Li AM, et al. Exagamglogene Autotemcel for Transfusion-Dependent β -Thalassemia. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2024; 390(8): p. 1663-1676. Disponible en: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2309673?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed.
39. Longhurst J, Lindsay K, Petersen RS, Fijen M, Gurugama , Maag D, et al. CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing of KLKB1 for Hereditary Angioedema. *NEJM*. 2024; 390(5): p. 432-441. Disponible en: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2309149>.
40. Fontana M, Solomon D, Kachadourian J, Walsh L, Rocha R, Lewohl D, et al. CRISPR-Cas9 Gene Editing with Nexiguran Ziclumeran for ATTR Cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine*. 2024; 391(23): p. 571–586. Disponible en: https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2412309?query=recirc_Semantic.
41. Pierce EA, Aleman TS, Jayasundera KT, Ashimatey BS, Kim K, Rashid A, et al. Gene Editing for CEP290-Associated Retinal Degeneration. *NEJM* [Internet]. 2024; 390(21): p. 1972-1984. Disponible en: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2309915>.
42. Karpov DS, Sosnovtseva AO, Pylina SV, Bastrich AN, Petrova DA, Kovalev MA, et al. Challenges of CRISPR/Cas-Based Cell Therapy for Type 1 Diabetes: How Not to Engineer a “Trojan Horse”. *International journal of molecular sciences* [Internet]. 2023; 24(24): p. 17320. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10743607/>.

43. Nicosia L, Harrison PT. CRISPR for cystic fibrosis: Advances and insights from a systematic review. *Molecular Therapy* [Internet]. 2025. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525001625004721#sec4>.
44. Nojadeh JN, Bildiren Eryilmaz NS, Ergüder BI. CRISPR/Cas9 genome editing for neurodegenerative diseases. *EXCLI Journal*. 2023; 22(1): p. 567–582. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10450213/>.
45. Sharma G, Sharma AR, Bhattacharya , Lee SS, Chakraborty C. CRISPR-Cas9: A Preclinical and Clinical Perspective for the Treatment of Human Diseases. *Molecular Therapy*. 2020; 20(29): p. 571–586. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7854284/>.
46. Frati G, Brusson , Sartre G, Romano O, Turchiano G, Miccio A, et al. Safety and efficacy studies of CRISPR-Cas9 treatment of sickle cell disease highlights disease-specific responses. *Molecular Therapy*. 2024; 32(12): p. 4337 - 4352. Disponible en: [https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016\(24\)00470-2](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016(24)00470-2).
47. González Castro N, Bjelic J, Malhotra G, Huang C, Alsaffar SH. Comparison of the Feasibility, Efficiency, and Safety of Genome Editing Technologies. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2021; 22(19): p. 10355. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/19/10355>.
48. Rahim , Gulzar S, Zahid , Rahim K. A Systematic Review on the Comparison of Molecular Gene Editing Tools. *International Journal of Innovative Science and Research Technology*. 2021; 6(8): p. 829-836. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/354437994_A_Systematic_Review_on_the_Comparison_of_Molecular_Gene_Editing_Tools.
49. Boti MA, Athanasopoulou K, Adamopoulos PG, Sideris DC, Scorilas A. Recent Advances in Genome-Engineering Strategies. *Genes*. 2023; 14(1): p. 129. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4425/14/1/129>.
50. Babačić H, Mehta A, Merkel O, Schoser B. CRISPR-cas gene-editing as plausible treatment of neuromuscular and nucleotide-repeat-expansion diseases: A systematic review. *PLoS One* [Internet]. 2019; 14(2). Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6386526/>.
51. Papizan JB, Porter SN, Sharma A, Pruett-Miller SM. Therapeutic gene editing strategies using CRISPR-Cas9 for the β -hemoglobinopathies. *J Biomed Res* [Internet]. 2020;

- 9(35): p. 615–632. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8038529/#s05>.
52. Brusson M, Miccio A. Une approche CRISPR/Cas pour traiter les β -hémoglobinopathies. *Med Sci* [Internet]. 2025; 40(1): p. 33-39. Disponible en: https://www.medecinesciences.org/articles/medsci/full_html/2025/01/msc240188/msc240188.html.
53. Tariq , Khurshid F, Khan MH, Dilshad A, Zain A, Rasool W, et al. CRISPR/Cas9 in the treatment of sickle cell disease (SCD) and its comparison with traditional treatment approaches: a review. *Ann Med Surg* [Internet]. 2024; 86(10): p. 5938–5946. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11444630/>.
54. Christakopoulos GE, Telange R, Yen J, Weiss MJ. Gene therapy and gene editing for β -thalassemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. [Internet]. 2023; 37(2): p. 433-447. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10355137/>.
55. Fuad Z, Redha ZA, Abuidrees A. Emerging Cell-Based Gene Therapies in Sickle Cell Disease: Systematic Review of Casgevy and Lyfgenia. *International Journal of Biomedicine* [Internet]. 2024; 14(3): p. 379-385. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.21103/Article14\(3\)_RA2](http://dx.doi.org/10.21103/Article14(3)_RA2).
56. Asif , Khan WJ, Aslam , Aslam A, Chowdhury MA. The Use of CRISPR-Cas9 Genetic Technology in Cardiovascular Disease: A Comprehensive Review of Current Progress and Future Prospective. *Cureus* [internet]. 2024; 16(4). Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11078688/#:~:text=Conclusiones,no%20existen%20intereses%20en%20conflicto>.
57. Infante López D, Céspedes Galvis MF, Wilches Flórez ÁM. CRISPR-CAS9: EL DEBATE BIOÉTICO MÁS ALLÁ DE LA LÍNEA GERMINAL. *pers.bioét.* 2021; 25(2): p. e2529. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-31222021000202529&lang=en.
58. González Angulo AM, Díaz Amado. El debate ético y de regulación sobre el uso de CRISPR-Cas9 en la línea germinal humana. *Universitas Medica*. 2021; 62(4): p. 206-223. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S2011-08392021000400206&script=sci_arttext.
59. Liu Z, Dong H, Cui Y, Cong L, Zhang D. Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria. *Microbial Cell Factories*. 2020; 19(172). Disponible en:

<https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-020-01431-z#Sec2>.

ANEXOS

Anexo 1. Clasificación de artículos consultados según nivel de evidencia.

Autor/ revista/ año	Re.	Título	Tipo de estudio	Nivel de evidencia	Población	Metodología	Resultados y Conclusiones
Janik, Edyta; Niemcewicz, Marcin; Ceremuga, Michal-Krzowski, Lukasz; Bijak, Joanna Saluk; Bijak, Michal/ International Journal of Molecular Sciences/ 2020	(2)	Various Aspects of a Gene Editing System—CRISPR–Cas9	Revisión bibliográfica	5	139 artículos	Recopilación de artículos para comparar las tecnologías de edición genómica y los mecanismos descritos de edición la CRISPR.	El crecimiento de la tecnología CRISPR/ Cas-9 está proporcionando resultados beneficiosos y será una herramienta clave en salud.
Bharathkumar, Nagaraj; Sunil, Abraham; Meera, Prabhakar; Aksah, Sam; Kannan, Muthu; Saravanan, Konda Mani; Anand, Thirunavukarasou/Molecular Biotechnology/ 2022.	(30)	CRISPR/Cas-Based Modifications for Therapeutic Applications: A Review	Revisión sistemática	1	119 ensayos clínicos.	Realizar una comparación sistemática de las variantes de endonucleasas Cas y su utilidad en la terapia de enfermedades genéticas.	Las implicaciones tecnológicas y éticas resultan en una imposibilidad de alcanzar niveles superiores en las investigaciones. Pero tiene el potencial de

							erradicar trastornos genéticos.
Laurent, Marine; Geoffroy, Marine; Pavani, Giulia; Guiraud, Simon/ Cells/ 2024.	(3)	CRISPR-Based Gene Therapies: From Preclinical to Clinical Treatments	Revisión sistemática	1	207 ensayos clínicos y preclínicos	Se realiza una revisión de los resultados de ensayos clínicos y preclínicos, para determinar la eficacia y seguridad de las tecnologías CRISPR.	A pesar de los resultados positivos de los ensayos clínicos. La eficacia y seguridad a largo plazo sigue sin resolverse.
Musunuru Kiran/ Cardiovascular Research/ 2021	(9)	CRISPR and cardiovascular diseases	Revisión bibliográfica	5	83 artículos	Una revisión con el objetivo de exponer las herramientas de edición del genoma, el impacto de la investigación CRISPR y las aplicaciones emergentes para tratar Enfermedades cardiovasculares y genéticas.	Las aplicaciones terapéuticas de la tecnología CRISPR son prometedoras, pero se debe investigar más profundo sobre los efectos no deseados.

Vaglio Cedeño, Christopher; Rodriguez, Esteban Jose; Morales, Fernando/ Acta Medica costarricense/ 2023	(10)	Aplicaciones clínicas de la herramienta CRISPR-Cas	Revisión bibliográfica	5	90 artículos	Se presenta información de los artículos en la base de datos PubMed, mediante el uso de palabras claves relacionado a la tecnología CRISPR.	Como principal conclusión; quedan muchas variables a mejorar como la edición fuera de objetivo, que garantizar eficacia y seguridad.
Fontana, Marianna; Solomon, Scott D; Kachadourian, Jessica; Walsh, Liron; Rocha, Ricardo; Lewohl, David; Gillmore, Julian D et al/ NEJM/ 2024.	(40)	CRISPR-Cas9 Gene Editing with Nexiguran Ziclumeran for ATTR Cardiomyopathy	Ensayo clínico	2	36 pacientes	Los pacientes recibieron el tratamiento nex-z dirigido a miocardiopatía ATTR y se observaron por 12 meses.	El ensayo clínico con nex-z demuestra una reducción consistente, rápida y duradera de los niveles de TTR sérica.
Cheng, Hao; Zhang, Feng; Ding, Yang/ Pharmaceutics/ 2021.	(24)	CRISPR/Cas9 Delivery System Engineering for	Revisión bibliográfica	5	70 artículos	Realiza una Ejecuta una revisión de los vectores no virales incluyendo el ADN plasmídico el ARNm y	Concluye que el método de plásmidos basados en lípidos es el vector no viral más

		Genome Editing in Therapeutic Applications.				la ribonucleoproteína. Plantea una discusión para determinar cual vector causa menos efectos de edición fuera del objetivo.	seguro y con menos expresión fuera del objetivo y resalta la posibilidad de mejorar en nanovectores.
Pavani, Giulia; Fabiano, Anna; Laurent, Mariane; Amor, Fatima; Cantelli, Erika; Chalumeau, Anne; Maule, Giulia; Tachtsidi, Alexandra; Concordet, Jean-Paul; Cereseto, Anna; Mavilio, Fulvio; Ferrari, Giuliana; Miccio, Annarita; Amendola, Mario/ Blood Advances/ 2021	(8)	Correction of β -thalassemia by CRISPR/Cas9 editing of the α -globin locus in human hematopoietic stem cells	Ensayo preclínico controlado	3	Muestras de sangre de cordón umbilical de pacientes con β -talasemia.	combinación de dos técnicas: la reducción de la cadena de α -globina, la integración y expresión dirigidas de un transgén HBB.	La regulación positiva y negativa de las cadenas de globina permite mejorar el desequilibrio en las células con talasemia β^+ y β^0 .
Fragoul, Haydar; Locatelli, Franco; Sharma, Akshay; Bhatia, Monica; Mapara,	(12)	Exagamglogene Autotemcel for Severe Sickle Cell Disease	Ensayo clínico Controlado.	2	44 pacientes.	Administración i.v del tratamiento Exagamglogene autotemcel para	el tratamiento con exa-cel eliminó las crisis vaso-oclusivas en el 97

Markus; Molinari, Lyndsay; Wall, Donna/ NEJM/ 2024.						corregir la anemia falciforme hereditaria.	% de los pacientes por más de 12 meses.
Gillmore, Julian D; Gane, Ed; Taubel, Jorg; Kao, Justin; Fontana, Marianna; Maitland, Michael L; Seitzer, Jessica; O'Connell, Daniel; Walsh, Kathryn R; Wood, Kristy; Phillips, Jonathan; Xu, Yuanxin; Amaral, Adam; Boyd, Adam P; Cehelsky, Jeffrey E; McKee, Mark D; Schiermeier, Andrew; Harari, Oliver; Murphy, Andrew; Kyratsous, Christos A; Zambrowicz, Brian; Soltys, Randy; Gutstein, David E; Leonard, John; Sepp-Lorenzino, Laura;	(13)	CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis	Ensayo clínico controlado.	2	6 pacientes.	Administración i.v del tratamiento NTLA-2001 en seis pacientes con amiloidosis ATTR hereditaria con polineuropatía	Se observo una reducción sérica de proteína TTR con respecto al valor basal, 52 % en grupo de 0.1mg/kg de dosis y 87% en el 0.3mg/kg

Lebwohl, David/ NEJM/ 2021							
Cohn, Danny M; Gurugama, Padmalal; Katelaris, Constance H; Launay, David; Bouillet, Laurence; Petersen, Remy S; Lindsay, Karen; Aygören-Pürsün, Emel; Maag, David; Butler, James S; Shah, Mrinal Y; Golden, Adele; Xu, Yuanxin; Abdelhady, Ahmed M; Lebwohl, David; Longhurst, Hilary J/ NEJM/ 2024.	(14)	CRISPR-Based Therapy for Hereditary Angioedema	Ensayo clínico aleatorizado.	2	27 pacientes	Administración i.v del tratamiento NTLA-2002/ DU/ 25mg o 50mg de placebo. En pacientes con angioedema hereditario. Y monitoreados por 16 semanas.	La administración de NTLA-2002, redujo los episodios de angioedema en las 16 semanas y redujo los niveles séricos de calicreína.
Pierce, Eric A; Aleman, Tomas S; Jayasundera, Kanishka T; Ashimatey, Bright S; Kim, Keunpyo; Rashid, Alia; Jaskolka, Michael C; Pennesi, Mark E/ NEJM/ 2024.	(41)	Gene Editing for CEP290-Associated Retinal Degeneration.	Ensayo clínico controlado.	2	14 pacientes	Se administro EDIT-101 a pacientes con degeneración retiniana hereditaria, 12 adultos de 17-63 años y 10 niños de 9-14 años, en una dosis aleatoria.	El tratamiento con EDIT -101 demuestra un perfil de seguridad y mejora de agudeza visual en 9 pacientes y ninguno

							mostro efectos adversos.
Maganti, Harinad B; Bailey, Adrian J.M; Kirkham, Aidan M; Shorr, Risa; Pineault, Nicolas; Allan, David S/ Stem Cells Translational Medicine/ 2021.	(29)	Persistence of CRISPR/Cas9 Gene Edited Hematopoietic Stem Cells Following Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis of Preclinical Studies.	Revisión sistemática	1	26 estudios preclínicos	Se identificaron estudios en Medline, Embase y Pubmed. Usando términos como: trasplante de células madre hematopoyéticas AND trasplante de células de cordón umbilical AND CRISPR.	Los datos de estudios preclínicos in vivo sugieren que disminuye el porcentaje general de células editadas, posiblemente por el bajo potencial del injerto.
Longhurst, Hilary J; Lindsay, Karen; Petersen, Remy S; Fijen, Lauré M; Gurugama, Padmalal; Maag, David; Butler, James S; Cohn, Danny M/ NEJM/ 2024.	(39)	CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing of <i>KLKB1</i> for Hereditary Angioedema	Ensayo clínico controlado	2	30 pacientes	Se administro NTLA-2002 ha pacientes con angioedema hereditario y un aumento gradual de dosis. Y se	70% de los pacientes mostro reacción a la infusión, se observó una reducción de la calicreína de hasta

						monitorearon los pacientes por 104 semanas.	95% dependiente de la dosis de NTLA-2002.
Chodnekar, Swarali Yatin; Tsetskhladze, Zurab/ Oxford Open Immunology/ 2024.	(37)	CRISPR CLIP: comprehensive reviews on interventional studies using precision recombinant technologies: clinical landmarks, implications, and prospects	Revisión sistemática	1	82 ensayos clínicos	Se identificaron 82 estudios de las fuentes: ClinicalTrials.gov, Registro de Ensayos Clínicos de la Unión Europea, las plataformas ISRCTN e ICTRP, ChiCTR, trialsearch y Cochrane.	Se necesitan ensayos más diversificados, en localización global y tipos de enfermedades para mejorar la veracidad de la eficiencia y seguridad de las herramientas CRISPR.
Yang, Yinghong; Lina, He; Yingjun, Xie; Lifen, Zhu; Jianfeng, Wu; Yong, Fan; Yi, Yang; Xiaofang, Sun/ Frontiers/ 2024	(11)	<i>In situ</i> correction of various β -thalassemia mutations in human	Ensayo preclínico	3	Células hemato-poyéticas CD34+ de pacientes	Se administro a células hemato-poyéticas el complejo Cas-9/sgRNA3-RNP y se monitoreo la permanencia de la	La edición genética mediante Cas-9/sgRNA3-RNP fue un completo éxito con una alta tasa de escisión del

		hematopoietic stem cells.				modificación mediante secuenciación del genoma.	locus HBB y no se encontraron mutaciones indel
Wu, Shao-Shuai; Li, Qing-Cui; Yin, Chang-Qing; Yue, Wen; Sung, Chun-Qing/ Theranostics/ 2020	(15)	Advances in CRISPR/Cas-based Gene Therapy in Human Genetic Diseases	Revisión bibliográfica	5	98 artículos.	Aborda una revisión de 14 ensayos preclínicos y 5 ensayos clínicos, compara los métodos de reparación celular y la frecuencia de mutación indel.	Concluyeron que aplicar las herramientas de focalización de ARN, CRISPR/Cas tipo II y proteínas de fusión bloqueadoras NHEJ mejora la precisión la terapia CRISPR.
Congting, Guo; Xiaoteng, Ma; Fei, Gao; Yuxuan, Guo/ Frontiers/ 2023.	(4)	Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing	Revisión bibliográfica	5	101 artículos	Resume los avances tecnológicos en materia de detección de la edición fuera del objetivo al usar el	Eficiencia y la especificidad son necesarios para establecer seguridad en la edición genómica.

						sistema CRISPR para la edición del genoma	la detección de indeles in vivo es muy complejo.
González Castro, Nicolás; Bjelic, Jan; Malhotra, Gunya; Huang, Cong; Alsaffar, Salman Hasan/ International Journal of Molecular Sciences/ 2021.	(47)	Comparison of the Feasibility, Efficiency, and Safety of Genome Editing Technologies	Revisión bibliográfica	5	153 artículos	Se compara la viabilidad y seguridad de las tecnologías de edición genómica ZFN, TALEN y CRISPR.	Para la utilización de tecnología CRISPR, se debe tener variantes de alta fidelidad de SpCas9.
Wienert, Beeke; Cromer, Kyle/ Frontiers/ 2022.	(22)	CRISPR nuclease off-target activity and mitigation strategies.	Revisión bibliográfica	5	123 ensayos clínicos y preclínicos	Revisión de ensayos clínicos donde se llevó a cabo métodos de detección de edición fuera de objetivo ex vivo e in vivo. Y propone métodos para mitigar el efecto “off target”.	Cualquier grado de actividad no intencionada es perjudicial en la seguridad de la edición genómica. se debe mejorar la detección de efectos fuera de objetivo en técnicas CRISPR.

Rahim, Jannat; Gulzar, Sabahat; Zahid, Rohama; Rahim, Khushbakht/ International Journal of Innovative Science and Research Technology/ 2021	(48)	A Systematic Review on the Comparison of Molecular Gene Editing Tools	Revisión sistémica	1	34 artículos	Revisión sistémica de 34 artículos, para llevar a cabo una comparación de los componentes, eficiencia y seguridad entre las tecnologías ZFN, TALEN y CRISPR.	La tecnología CRISPR presenta una gran diferenciación con las técnicas ZFN y TALEN. Su especificidad y facilidad la convierten en la técnica más aceptada.
Christakopoulos, Georgios E; Telange, Raul; Yen, Jonathan; Weiss, Mitchell J/ Hematol Oncol Clin North Am./ 2023.	(54)	Gene therapy and gene editing for β -thalassemia.	Revisión bibliográfica	5	84 artículos	Una revisión que aborda las terapias génicas dirigidas a la corrección de la β -talasemia incluyendo la técnica CRISPR/Cas-9 y realiza una comparación de los resultados de 16	Esta investigación concluye que <25 % de los pacientes logra un trasplante alogénico, causado por la incompatibilidad y la indisponibilidad de donantes. Las terapias génicas in

						ensayos clínicos, para desarrollar perspectivas a futuro.	vivo como las herramientas CRISPR son una opción que seguirá mejorando.
Asif, Muhammad; Khan, Wahab J; Aslam, Sadia; Aslam, Awais; Chowdhury, Mohammed A/ Cureus/ 2024	(56)	The Use of CRISPR-Cas9 Genetic Technology in Cardiovascular Disease: A Comprehensive Review of Current Progress and Future Prospective	Revisión bibliográfica	5	136 artículos	Resumen de los avances de los ensayos clínicos y preclínicos de las terapias CRISPR dirigidas a enfermedades cardíacas congénitas y adquiridas para identificar perspectivas futuras y las implicaciones del uso de la edición genómica CRISPR.	Las terapias genéticas dirigidas de terapia de enfermedades cardíacas puede presentar métodos curativos a futuro, sin embargo, sigue siendo insipiente causado por costos alto y su escasa utilización a nivel comunitario
González Angulo, Ana Maria; Díaz Amado,	(58)	El debate ético y de regulación sobre el uso de	Revisión sistémica	1	59 ensayos clínicos	Se seleccionaron 59 documentos de las bases de datos	Las preocupaciones éticas se originan en 2 conceptos: 1) los

Eduardo/ Medica/ 2021.	Universitas		CRISPR-Cas9 en la línea germinal humana.				PubMed y en Embase, usando términos MeSH y términos libres con los conectores AND u OR según las especificaciones: CRI SPR-Cas9, gene editing, human germline, editing, technical limitations, ethics, regulatory, personal opinions, consensus, statements, reports.	cambios genéticos sobre la línea germinal se transmitirán a las siguientes generaciones 2) no existe consenso sobre el estatus del embrión humano en el contexto de la tecnología genética.
Infante López, Dilany Vanessa; Céspedes Galvis, Mileidy Fernanda; Wilches Flórez, Ángela María/ pers.bioét./ 2021.	(57)	CRISPR/ Cas9: el debate bioético más allá de la línea germinal.	Revisión sistemática	1	81 artículos	se realizó una búsqueda de información en las bases de datos PubMed, Scopus y Scielo, utilizando	La bioética toma decisiones bipolares, se aceptan prácticas en la línea somática con fines	

						términos de búsqueda libre como: "Bioética CRISPR-Cas9", "CRISPR-cas9 bioethics", "CRISPR-Cas9 application ethics" y "CRISPR/Cas9 Reflexiones bioéticas".	terapéuticos, pero se desaprueba de forma generalizada la edición del genoma en la línea germinal causado por una postura de falta de protocolos, ausencia de consentimiento informado y riesgos de efectos no deseados no determinables.
Papizan, James B; Porter, Shaina N; Sharma, Akshay; Pruett-Miller, Shondra M/J biomed Res/ 2020	(51)	Estrategias de edición genética terapéutica utilizando CRISPR-Cas9 para las β -	Revisión bibliográfica	5	179 artículos	Se realizó una búsqueda de información usando las palabras claves anemia de células falciformes, hemoglobina fetal,	Las estrategias de tratamiento con edición genómica CRISPR puede posicionarse como un tratamiento clínico

		hemoglobinopatías.				hemoglobinopatía, CRISPR, edición genética, ingeniería genómica.	especializado. Los altos costes de fabricación pueden suscitarse como una adversidad en el futuro.
Locatelli, Franco; Lang, Peter; Wall, Donna; Meisel, Roiland; Corbacioglu, Selim; Li, Amanda M; De la Fuente, Josu/ NEJM/ 2024.	(38)	Exagamnglogene Autotemcel for Transfusion-Dependent β -Thalassemia	Ensayo clínico controlado	2	52 pacientes	Se administro exa-cel una herramienta CRISPR a 52 pacientes con β -talasemia dependiente de transfusión y se observaron por 20,4 meses. La muestra se seleccionó en un rango de edad de 12-35 años.	El 91% de los pacientes con β -talasemia dependiente de transfusión demostró una independencia transfusional. No se mostró efectos adversos.
Nojadeh, Jafar Nouri; Bildiren Eryilmaz, Nur Seren; Ergüder, Berrin Imge;/ EXCLI/ 2023.	(44)	CRISPR/Cas9 genome editing for neurodegenerative diseases	Revisión bibliográfica	5	114 artículos	Se realiza una revisión de ensayos preclínicos y clínicos para proporcionar una descripción general de	La tecnología CRISPR es una herramienta prometedora para tratar enfermedades

						la tecnología CRISPR-Cas y resumir los avances de la terapia CRISPR en la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica y la ataxia espinocerebelosa.	neurodegenerativas, pero los ensayos no superan la fase I y debe optimizar la seguridad, los métodos de administración y los efectos no deseados.
Brusson, Megane; Miccio, Annarita/ Med Sci/ 2025	(52)	Une approche CRISPR/Cas pour traiter les β -hémoglobinopathies.	revisión bibliográfica	5	44 artículos	Realiza una revisión bibliográfica sobre las formas de terapias CRISPR para tratar hemoglobinopatías, tomando en cuenta los ensayos con la	La aprobación de Casgevy es un hito para la terapia génica, sin embargo, la citotoxicidad no sea podido reducir.

						herramienta Casgevy, trasplante de células madre y ensayos ex vivo con el gen HBG1.	Las estrategias en células in vivo mediante vectores o micropartículas representan la forma de menor costo y mayor eficacia.
Yacoub, Tasnim Ben; Wohlschlegel, Juliette; Sähel, José Alain; Zeitz, Christina; Audo, Isabelle/ Journal français d'ophtalmologie/ 2023.	(31)	CRISPR/Cas9: de la recherche à l'application thérapeutique	Revisión bibliográfica	5	38 artículos	Realiza una revisión de la información de avances en edición genética usando los términos métodos de edición genética, amaurosis congénita y en gen E290, terapia Gybera y luxturna. Para realizar una comparación metódica de eficiencia y seguridad, así como de	La herramienta CRISPR es mas prometedora que la técnica ZFN y TALEN, pero las implicaciones éticas obstruyen los ensayos clínicos. Las terapias de reemplazo de genes están limitada a unas pocas enfermedades y a

						limitaciones dentro de la oftalmología entre las tecnologías ZFN, CRISPR y TALEN.	mutaciones que anulan la función.
Martin, Hedvika; Wassef, Michel/ Med Sci/ 2024	(35)	L'ingénierie ciblée de l'épigénome	Revisión bibliográfica	5	44 artículos	Una revisión que ilustra el desarrollo de herramientas y aplicaciones CRISPR con el método de la edición de epigenoma y sus técnicas terapéuticas en la biomedicina.	Las herramientas CRISPR permiten una mejor comprensión de la modificación epigenómica y de procesos de regulación génica. La precisión de alto es la causa de su posicionamiento como aplicación terapéutica.
Bouchard, Camille; Godbout, Kelly; Tremblay, Jacques P/ Med Sci/ 2024.	(33)	La correction de mutations pathogènes	revisión de bibliográfica	5	50 artículos	Una revisión que resume las herramientas y aplicaciones CRISPR	Se debe ampliar los estudios de ausencia de mutación fuera del

		par Prime editing				con el método de edición principal e informa el estado del conocimiento de la corrección de mutaciones mediante este método.	objetivo para mejorar la escala de seguridad y queda evidenciado por los estudios revisados que para la restauración del fenotipo se requiere 25-75% de corrección del gen.
Tariq, Hamza; Khurshid, Fatima; Khan, Muhammad Hamza; Dilshad, Aamna; Zain, Ahmad; Rasool, Warda; Jawaid, Alishba; Kunwar, Digbijay; Khanduja, Sneha; Akbar, Anum/ Ann Med Surg/ 2024	(53)	CRISPR/Cas9 in the treatment of sickle cell disease (SCD) and its comparison with traditional treatment approaches: a review.	Revisión bibliográfica	5	68 artículos	Una revisión del manejo de anemia falciforme exagamnglogene autotemcel en los aspectos de eficiencia, seguridad y resultados para comparar de forma analítica contra el manejo tradicional.	En comparación con CRISPR las transfusiones de sangre y los trasplantes de médula ósea, están limitados por la escasez de donantes compatibles.

Sharma, Akshay; Boelens, Jaap-Jan; Cancio, Maria; Hankins, Jane S; Bhad, Prafulla; Azizy, Marjohn; Lewandowski, Andrew; Zhao, Xiaojun; Chitnis, Shripad; Peddinti, Radhika; Zheng, Yan; Kapoor, Neena; Ciceri, Fabio; Maclachlan, Timothy; Yang, Yi; Liu, Yi; Yuan, Jianping; Naumann, Ulrike; Yu, Vionnie WC; Stevenson, Susan C; De Vita, Serena; LaBelle, James L;/ NEJM/ 2023.	(36)	CRISPR-Cas9 Editing of the HBG1/HBG2 Promoters to Treat Sickle Cell Disease	Ensayo clínico	2	16 pacientes	Se realiza un ensayo preclínico para la construcción de una herramienta CRISPR denominada OTQ923. Seguimiento de la realización de una fase 2 con 16 pacientes que padecen anemia falciforme con crisis vaso oclusivas. Se observaron los sujetos por 18 meses continuos.	Una sola infusión de OTQ923 en tres de los pacientes, aumento sostenidamente la hemoglobina HbF, reduciendo la frecuencia de las crisis vaso-occlusivas. No se observaron ediciones fuera del objetivo.
Fuad, Zainab; Redha, Zainab A; Abuidrees, Aqeela/ International Journal of Biomedicine/ 2024.	(55)	Emerging Cell-Based Gene Therapies in Sickle Cell Disease:	Revisión sistemática	1	19 ensayos clínicos	Se realizó una revisión sistemática según las directrices de PRISMA 2020 y se basó en el análisis de datos de artículos	Casgevy y Lyfgenia son igualmente eficaces, los efectos adversos no están relacionados a la terapia génica y se

		A Systematic Review of Casgevy and Lyfgenia				completos relacionados con el tema.	necesita más investigación para confirmar si Lyfgenia se relaciona con malignidad.
Karpov, Dmitry S; Sosnovtseva, Anastasiia O; Pylina, Svetlana V; Bastrich, Asya N; Petrova, Darya A; Kovalev, Maxim A; Shuvalova, Anastasija I; Eremkina, Anna K; Mokrysheva, Natalia G/ International journal of molecular sciences/ 2023.	(42)	Challenges of CRISPR/Cas-Based Cell Therapy for Type 1 Diabetes: How Not to Engineer a “Trojan Horse”	Revisión bibliográfica	5	263 artículos	Una revisión que resume los ensayos clínicos en la terapia celular para DMI y los ensayos preclínicos y clínicos de la generación de células iPS inmuno-privilegiadas mediante CRISPR/Cas-9. Para comparar resultados y eficacia.	La edición genómica mediante CRISPR/Cas y la tecnología de iPSC se encamina a desarrollar una terapia de sustitución de células beta pancreáticas sin necesidad de inmunosupresión.
Ahumada Ayala, Miguel; Aguilar Lopez, Regina; González-Stoylov, Nicolai;	(32)	Editing the Human Genome with	Revisión bibliográfica	5	50 artículos	Se realiza una revisión que entabla los principales hallazgos	La edición del genoma se desarrolla como

Palacio Sosa, Esmeralda; Cervantes Barragán, David E; Fernández Hernández, Liliana/ revista de investigación médica/ 2023		CRISPR/Cas: A Review of its Molecular Basis, Current Clinical Applications, and Bioethical Implications				en las bases moleculares del sistema CRISPR, las aplicaciones terapéuticas en hematológica, oncología, cardiología y enfermedades neurológicas.	una terapia alternativa a enfermedades severas, las instituciones reguladoras solo aceptan las modificaciones en células somáticas.
Sánchez Artigas, Rolando; Díaz Armas, María Teresa; Rodríguez Duque, Raisa; Miguel Soca, Pedro Enrique/ MEdiSur/ 2021.	(34)	Principios y aplicaciones médicas de la edición de genes mediante CRISPR/Cas	Revisión bibliográfica	5	38 artículos	Una revisión bibliográfica, utilizando los Descriptores en Ciencias de Salud (DeCS/MeSH) y aplicando la búsqueda en Pudmed, Scielo y Cochrane.	Los estudios del genoma permiten crear un banco de pesquisa de fenotipos. Los mecanismos regulatorios siguen siendo un problema que genera discusión e incertidumbre.

Nicosia, Lucia; Harrison, Patrick T/ Molecular Therapy/ 2025.	(43)	CRISPR for cystic fibrosis: Advances and insights from a systematic review	Revisión sistemática	1		Realiza una búsqueda exhaustiva y sistemática de la literatura publicada en PubMed y Google Scholar, utilizando las palabras clave “CFTR” y “CRISPR”, “CFTR” y “NHEJ”, “CFTR” y “HDR”, “CFTR” y “Base Editing” o “CFTR” y “Prime Editing”.	La HDR es aplicable para corregir cualquier mutación, su uso en la fibrosis quística disminuye a causa de la aparición de otras tecnologías genómicas como la edición principal. Se requiere una eficiencia del 25% para que una tecnología CRISPR funcione para corregir la fibrosis quística.
Frati, Giacomo; Brusson, Megane; Sartre, Gilles; Romano, Oriano; Turchiano, Giandomenico; Miccio,	(46)	Safety and efficacy studies of CRISPR-Cas9 treatment	Ensayo preclínico	3	Muestras de sangre de cordón umbilical	Este estudio ex vivo en cual edita con tecnología CRISPR/Cas-9 el gen HBB en	La eficiencia aumento con el tiempo llegando a su máximo en 3

Annarita; Mlayah, Bochra; Felix, Tristan; Chalumeau, Anne; Antoniou, Panagiotis; Concordet, Jean-Paul/ Molecular Therapy/ 2024		of sickle cell disease highlights disease-specific responses				células madre pluripotentes humanas para determinar tasa de indel, análisis de aberraciones cromosómicas y la tasa de eficiencia.	días con una expresión marcada de HbF. Tasa de deleciones 50-60%.
Sharma, Garima; Sharma, Ashish Ranjan; Bhattacharya, Manojit; Lee, Sang-Soo; Chakraborty, Chiranjib/ Molecular Therapy/ 2020	(45)	CRISPR-Cas9: A Preclinical and Clinical Perspective for the Treatment of Human Diseases	Revisión bibliográfica	5	25 ensayos preclínicos 19 ensayos clínicos	Una revisión bibliográfica, analizando la eficiencia y seguridad de la terapia CRISPR/Cas-9, presente en los resultados de ensayos clínicos y preclínicos.	La tecnología CRISPR/ Cas-9 presenta un futuro prometedor, sin embargo, todavía es una tecnología incipiente que se aplica a pacientes terminales. Se necesita mejorar las regulaciones de la comunidad científica sobre la edición del genoma.

<p>Boti, Michaela A; Athanasopoulou, Konstantina; Adamopoulos, Panagiotis G; Sideris, Diamantis C; Scorilas, Andreas/ Genes/ 2023.</p>	<p>(49)</p>	<p>Recent Advances in Genome-Engineering Strategies</p>	<p>Revisión bibliográfica</p>	<p>5</p>	<p>132 artículos</p>	<p>Una revisión, comparando los avances entre las terapias CRISPR y otras estrategias de edición genómica, presentes en los resultados de ensayos clínicos y preclínicos.</p>	<p>El desarrollo de diversos métodos basados en CRISPR/ Cas-9, sentó las bases para profundizar los estudios genómicos. Actualmente por su alta eficiencia es la técnica de edición genómica más aceptada por la comunidad científica.</p>
--	-------------	---	-------------------------------	----------	----------------------	---	--