



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

POTENCIAL USO DE LA TÉCNICA CRISPR/Cas9 EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES ACTUALIDAD Y FUTURO

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Enero 2024

Autor: Sergio Andrés Caro Perdomo

Modalidad: Revisión bibliográfica

Tutor/es: Enrique Barraión Catalán

INDICE

1. Resumen.....	3
2. Abreviaturas.....	4
3. Introducción.....	5
3.1. Historia del descubrimiento.....	5
3.2. Mecanismo CRISPR/Cas9 en bacterias infectadas por virus.....	6
3.3. CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genética.....	8
3.4. Potencial uso de CRISPR/Cas9 en enfermedades autoinmunes.....	10
4. Objetivos.....	12
5. Materiales y métodos.....	13
6. Resultados.....	15
6.1. CRISPR/Cas9 y polimorfismos de nucleótido único.....	16
6.2. Edición del epigenoma y modificación genética de células del sistema inmune con CRISPR/Cas9.....	18
6.3. CRISPR/Cas9 en Artritis Reumatoide.....	22
6.4. CRISPR/Cas9 en Diabetes tipo I.....	26
7. Discusión.....	34
8. Conclusiones.....	37
9. Bibliografía.....	38

1. RESUMEN

Introducción: La técnica CRISPR/Cas9 es una revolucionaria herramienta de edición genética que ha transformado la forma en que se ha abordado la modificación de material genético. Esta técnica fue descubierta en el sistema inmunológico de bacterias, y su aplicación ha permitido una manipulación precisa y eficiente de genes en organismos vivos (animales y plantas). Ofreciendo la capacidad de modificar específicamente los genes implicados en la respuesta inmunológica y la autorregulación del sistema inmune.

Objetivo: Realizar una revisión bibliográfica en las principales bases de datos con el objetivo de analizar y estudiar las actuales aplicaciones de la técnica CRISPR/Cas9 en enfermedades autoinmunes, para obtener una visión integral de cómo esta técnica está siendo utilizada en la investigación y potencialmente en el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

Materiales y métodos: La revisión sistemática se realizó utilizando las bases de datos Pubmed y Scopus, empleando los descriptores en la ecuación de búsqueda como: "CRISPR", "CRISPR/Cas9", "CRISPR/Cas9", "Autoimmune disease" y "Autoimmune diseases".

Resultados: Fueron seleccionados 6 artículos de los 468 que se encontraron en las 2 bases de datos, en donde 3 de ellos son revisiones sistemáticas y los otros 3 estudios experimentales en animales.

Conclusión: CRISPR/Cas9 revoluciona la investigación de enfermedades autoinmunes, revelando la complejidad genética de las mismas y ofreciendo un enfoque terapéutico preciso. La edición del ADN promete corregir desregulaciones, pero se subrayan riesgos potenciales en la aplicación en humanos. Nuevas investigaciones y una regulación rigurosa sobre su uso son esenciales para garantizar seguridad y eficacia.

2. ABREVIATURAS

CRISPR: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y espaciadas regularmente.

PAM: protospacer adjacent motif (motivo adyacente de protoespaciador).

sgRNA: Single guide RNA (ARN guía único).

NHEJ: Unión de extremos no homólogos.

HDR: Reparación homologa dirigida.

AR: Artritis Reumatoide.

DM1: Diabetes mellitus tipo I.

GWAS: Estudios de asociación a nivel genético.

SNP: Polimorfismos de nucleótido único.

ARNnc: ARN no codificante.

dgRNAs: ARN guía cortos.

CAARs: Receptores de autoanticuerpos quiméricos.

T-CAAR: Células T que expresan receptores de autoanticuerpos quiméricos.

ACAN: Gen de agrecano.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α .

IL-1: Interleucina-1.

CSR: Recombinación de cambio de clase.

SHM: Hipermutación somática.

AID: Proteína desaminasa de citidina inducida por activación.

Palabras clave: CRISPR-Asociado a la proteina 9, Enfermedades autoinmunes.

4. INTRODUCCIÓN

A lo largo de los años, desde la elucidación de la estructura y composición del ADN se ha intentado determinar la composición y función de cada uno de los genes presentes en nuestro genoma, todo esto para crear modelos animales de enfermedades y si es posible, poder asociar o relacionar los resultados a nivel clínico (en humanos) para, de esta manera, entender el transcurso de la patología de distintas enfermedades.

En los últimos 11 años se ha desarrollado una revolucionaria técnica de edición genética denominada CRISPR/Cas9, cuyas siglas significan *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas)*, la cual ha proporcionado un método mucho más simple y económico para la modificación de genes con un alto grado de precisión¹. Esta técnica permite poder corregir la existencia de un gen alterado o de afectar a un gen específico buscando diferentes finalidades como podría ser el caso de querer destruir una célula cancerígena.

Historia del descubrimiento

En 1987 se observó a partir del mapeo del genoma de algunas bacterias y microorganismos, tales como *Escherchia coli*, que presentaban en su genoma muchas secuencias palindrómicas en una zona específica de su ADN sin ninguna función aparente. En la figura 1 se muestra la estructura de estas secuencias en distintas especies de bacterias².

No fue hasta el año 1993 que el científico español Francisco Martínez Mojica determinó que esa secuencia estaba presente en más tipos de bacterias, no solo en *E.coli*, denominándolas por primera vez como *Short Regularly Spaced Repeats*³.

En el año 2005, Mojica identificó grandes similitudes entre estas secuencias y el material genético de ciertos virus que infectaban bacterias. Observó cómo estas secuencias estaban separadas entre sí mediante secuencias de ADN vírico, denominadas espaciadoras como se observa en la figura 1; Definiendo por primera vez el sistema CRISPR, como un sistema de defensa bacteriano frente a infecciones víricas⁴.

Además, estas secuencias se transmitían de generación en generación, afirmando que estos microorganismos poseen un arsenal enzimático que es capaz de diferenciar entre el ADN bacteriano y el vírico, destruyendo solamente el del virus. Fueron todos estos descubrimientos de Mojica los que construyeron los cimientos para el posterior desarrollo de la técnica de edición genética⁵.

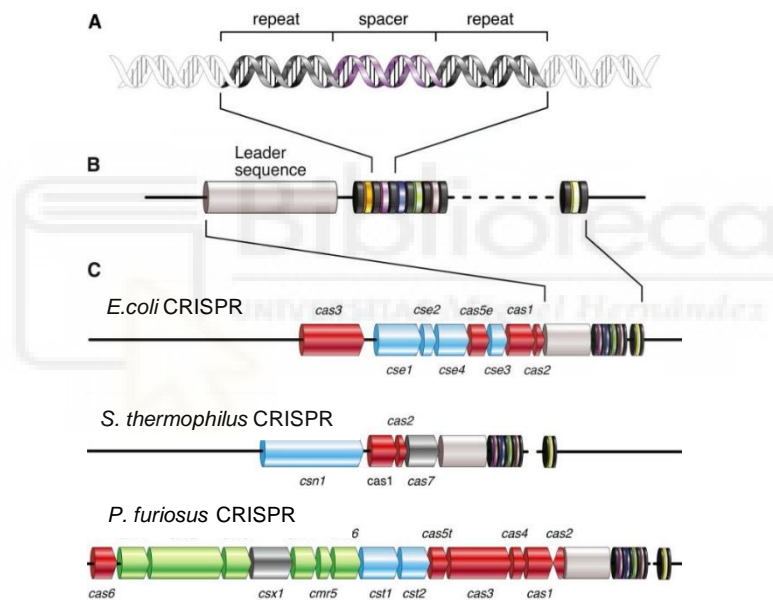


Figura 1. Región CRISPR en diferentes especies de bacterias.⁶

En el año 2012, Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier detallaron por primera vez como el sistema CRISPR/Cas9 podía ser utilizado para editar genéticamente diversos tipos celulares, sin embargo, lo que hacía interesante a esta técnica frente a otras técnicas ya desarrolladas fue su economía, reproducibilidad, su alta eficiencia y una complejidad menor¹. Este hecho les valió el Premio Nobel en 2020.

Mecanismo CRISPR/Cas9 en bacterias infectadas por virus

Durante el proceso de infección del virus, secuencias de su ADN se insertan en el interior del material genético de la bacteria, utilizando la maquinaria de esta para poder replicarse y poder infectar a otras bacterias. El ADN vírico ingresa en los cromosomas de la bacteria, en un espacio específico denominado CRISPR, quedando registrada la infección. Este proceso hace que la bacteria pueda reconocer futuras infecciones por el mismo virus y pueda defenderse al adquirir inmunidad frente al mismo⁵.

Para explicar el sistema CRISPR/Cas9, primero es importante mencionar que en la región denominada CRISPR se encuentra toda la maquinaria necesaria para llevar a cabo la detección del ADN viral, la cual está compuesta por cuatro genes (Cas9, Cas1, Cas2 y Csn2), 2 cadenas de ARN no codificante (tracrRNA), espaciadores y repeticiones.

Como se puede observar en la figura 2, una vez ingresa el ADN vírico en la bacteria, una pareja de enzimas (endonucleasas) denominadas Cas-1 y Cas-2 trabajan conjuntamente cortando el ADN vírico en una región denominada *protospacer* con el objetivo de introducirlo en la región CRISPR del ADN bacteriano, formando los ya mencionados spacers o espaciadoras⁶.

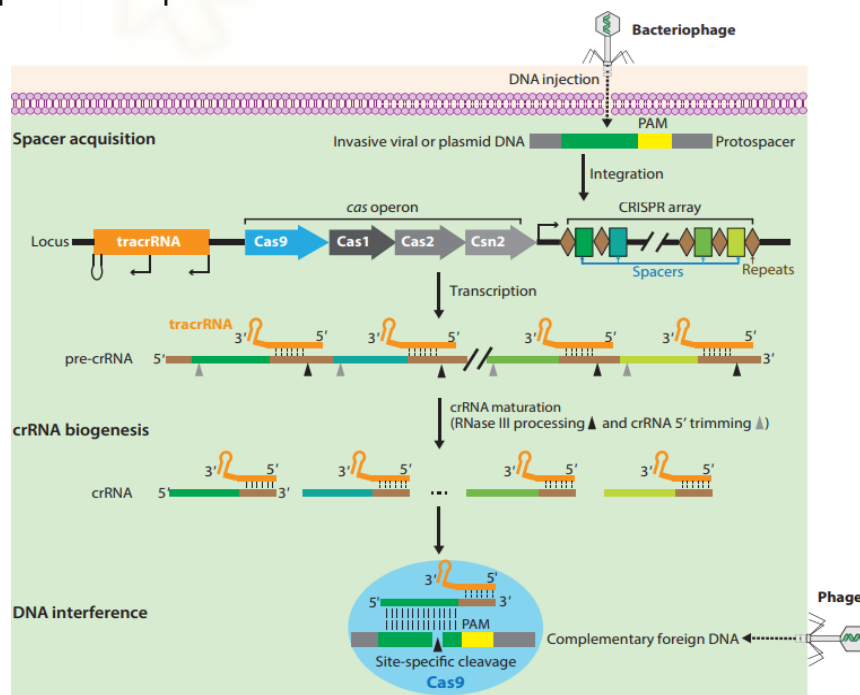


Figura 2. Mecanismo de acción CRISPR/Cas9.⁶

Sin embargo, es importante recalcar que Cas-1 y Cas-2 no cortan de manera aleatoria el ADN vírico, para hacerlo estas deben identificar un área denominada *protospacer adjacent motif (PAM)*. Esta región se caracteriza por tener cualquier base nitrogenada seguida de 2 guaninas consecutivas (NGG). Una vez encontrada la región PAM, estas enzimas se mueven en el sentido 5´-3´ y cortaran una sección de aproximadamente 20-26 bases de largo para posteriormente insertarla en el extremo 5´ de la región CRISPR y luego construir una nueva repetición en el sentido 5´-3´⁶.

Posteriormente, cuando la ARN polimerasa realiza el proceso de transcripción de CRISPR, lo convierte en una molécula de ARN denominada *pre-CRISPR RNA (pre-crRNA)*. Esta estructura está compuesta por espaciadores, repeticiones y *tracrRNA*. El *tracrRNA* tiene regiones complementarias a las repeticiones que constituyen CRISPR y está implicada en la maduración y procesamiento del ARN mensajero que guía el sistema CRISPR.

En el siguiente paso, por acción de la ARNasa se corta en el extremo 5´ las repeticiones, dando lugar a otra estructura llamada *CRISPR colon tracer RNA (crRNA)*. Esta estructura es captada por Cas-9 y forma la estructura conocida como *guide RNA (gRNA)*⁶.

El gRNA al encontrar ADN vírico, localiza PAM y abre el ADN, haciendo coincidir el spacer del gRNA con el grupo de bases complementarias del ADN vírico y una vez hecho este proceso, Cas-9 corta las 2 cadenas del ADN y continúa su búsqueda de más ADN vírico⁶.

CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genética

El principio de la edición genética es la escisión de ADN bicatenario en un sitio específico del genoma. Encontrar la manera de cortar el ADN de forma selectiva fue uno de los obstáculos más grandes en el desarrollo de la técnica CRISPR/Cas9, sin embargo, Doudna y Charpentier desarrollaron un proceso en el que mediante la síntesis de un *single guide RNA (sgRNA)* era posible dirigir la nucleasa Cas9 al sitio diana sin afectar su actividad⁸. El sgRNA es una estructura compuesta por crRNA

(que tiene una secuencia homologa al sitio diana del ADN y se sintetiza a escala laboratorio) y tracrRNA combinados artificialmente.

Además, una vez que el complejo Cas9-sgRNA corta el gen diana, es sencillo modificar la función del gen mediante una mutación por deleción o inserción. En la figura 3 se representa este proceso⁶.

Después de efectuar la ruptura en el ADN, es necesario llevar a cabo su reparación, y en este punto se destacan dos vías principales: la primera es conocida como Unión de Extremos No Homólogos (NHEJ), mientras que la segunda es la Reparación Homóloga Dirigida (HDR)⁷.

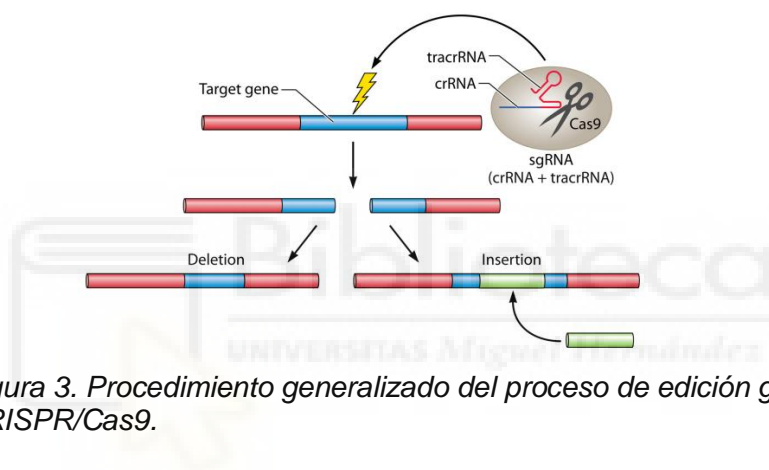


Figura 3. Procedimiento generalizado del proceso de edición genética con CRISPR/Cas9.

1. Unión de extremos no homólogos

Este proceso es altamente propenso a errores, donde debido a factores aleatorios pueden manifestarse mutaciones, pérdida de función genética, así como inserciones o deleciones genéticas. Estos eventos, que ocurren de manera aleatoria, a menudo resultan en la interrupción de la función génica^{7,9}.

2. Reparación homóloga dirigida

Este proceso de reparación es menos propenso a errores, pero es crucial que la célula disponga de un fragmento homólogo de ADN, es decir, una secuencia de ADN con exactamente la misma disposición de bases. En las células eucariotas, que poseen pares de cromosomas homólogos, este mecanismo es común. Además, solo puede activarse cuando la célula se encuentra en las fases G1 o S del ciclo celular, lo que lo hace menos susceptible a la generación de mutaciones^{7,9}.

En el contexto de la edición génica con CRISPR/Cas9, se induce este mecanismo al introducir una plantilla donante que presenta una secuencia de bases de interés con extremos homólogos al sitio de corte previamente generado por Cas9. Esto facilita la creación de las mutaciones deseadas mediante un proceso de recombinación homóloga, proporcionando una base para realizar modificaciones genéticas con una alta especificidad, ya sea para la inserción, deletión o corrección de un gen^{7, 9}.

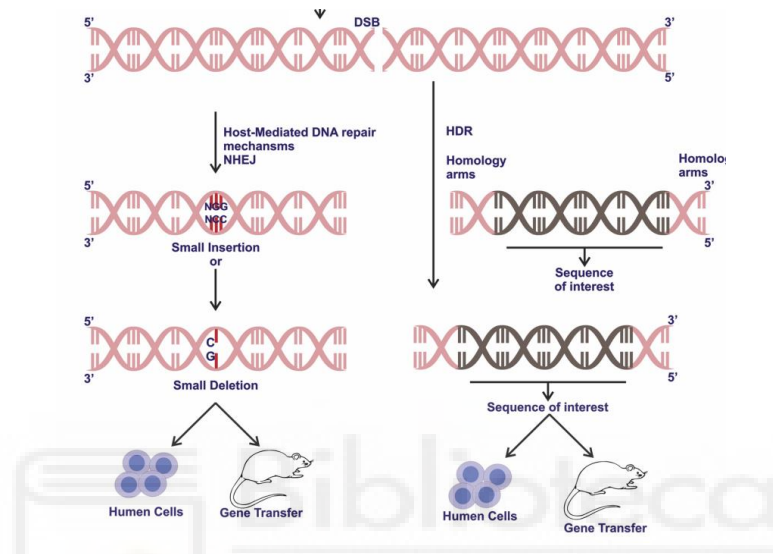


Figura 4. Mecanismos de reparación de ADN que se producen al aplicar CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genética.

Potencial uso de CRISPR/Cas9 en enfermedades autoinmunes

Las enfermedades autoinmunes se destacan por su complejidad clínica, la dificultad en el diagnóstico y un tratamiento complejo. A pesar de los notables avances de los últimos años, la etiología de estas enfermedades sigue siendo en gran medida desconocida en muchos casos. En el origen de estas patologías, intervienen diversos factores que convergen para dar lugar a las variadas enfermedades autoinmunes, ya sean específicas de órganos o de naturaleza sistémica. Estos elementos incluyen la pérdida de mecanismos de tolerancia, factores genéticos de susceptibilidad, influencias ambientales como agentes patógenos, sustancias inorgánicas, hormonas y factores inmunológicos¹⁰.

En términos generales, se estima que la causa principal de estas enfermedades radica en una respuesta inapropiada del sistema inmune contra los tejidos de nuestro

organismo. Ejemplos como la artritis reumatoide (AR) o la diabetes tipo I (DM1) son ejemplos evidentes de este tipo de patologías, las cuales poseen una notable relevancia clínica en la actualidad.

Por otro lado, la identificación precisa de los factores mencionados anteriormente no solo contribuirá al mejor entendimiento de los diversos mecanismos involucrados en estas complejas enfermedades, sino que también posibilitará la mejora de las herramientas terapéuticas para afrontarlas de manera eficaz.

Actualmente, el tratamiento de las enfermedades autoinmunes suele estar dirigido hacia el uso de inmunosupresores, cuyo objetivo es controlar la respuesta inmune. Sin embargo, estudios recientes han evaluado la técnica CRISPR/Cas9 como potencial terapia inmunológica en enfermedades autoinmunes, ya que varias de estas enfermedades podrían ser objetivos clínicos viables¹⁰.

Esta técnica se podría emplear en estudios de genómica funcional tanto in vitro como in vivo, con el fin de esclarecer el papel, tanto individual como combinado, de los polimorfismos identificados mediante estudios de asociación a nivel genético (GWAS). Esto se lograría mediante la creación de modelos celulares y animales. Además, CRISPR/Cas9 podría desempeñar un papel crucial en la terapia personalizada al corregir mutaciones, adaptándose a estrategias específicas para cada paciente¹⁰.

En el ámbito terapéutico actual, la terapia génica ha experimentado un notable aumento de interés gracias a sus perspectivas prometedoras. Esta modalidad de tratamiento se destaca por su enfoque en la regulación de la inflamación, que es una de las manifestaciones más comunes en enfermedades autoinmunes, centrándose en la modulación de sus principales mediadores, entre los cuales se destacan las citoquinas y los linfocitos.

Este enfoque innovador no solo mitigaría la inflamación, sino que también marcaría un acontecimiento significativo en la búsqueda de tratamientos más precisos y personalizados para diversas condiciones médicas, especialmente en enfermedades autoinmune.

5. OBJETIVOS

Objetivo general:

Realizar una revisión bibliográfica en las principales bases de datos con el objetivo de analizar y estudiar las actuales aplicaciones de la técnica CRISPR/Cas9 en enfermedades autoinmunes, para obtener una visión integral de cómo esta técnica está siendo utilizada en la investigación y potencialmente en el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

Objetivos específicos:

- Explorar el impacto de la investigación actual con CRISPR/Cas9 en enfermedades autoinmunes, especialmente en la identificación de polimorfismos de nucleótido único (SNP) y la comprensión de variantes reguladoras asociadas a fenotipos de enfermedades.
- Analizar el avance de la edición del epigenoma mediante CRISPR/Cas9, resaltando su papel en la modificación específica del ADN para regular la expresión génica sin cambiar la secuencia de ADN, y su potencial en corregir desregulaciones epigenéticas asociadas a enfermedades autoinmunes.
- Examinar cómo CRISPR/Cas9 se ha utilizado como un enfoque terapéutico en enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide y la diabetes mellitus tipo 1 (DM1), y destacar su contribución al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La información fue obtenida mediante la consulta de las bases de datos PubMed y Scopus. Además, mediante el método PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses) se realizó una valoración objetiva de la información con la que se construyó esta revisión sistemática.

En primer lugar, fue necesario determinar y definir los términos de búsqueda con el objetivo de acotar la cantidad de artículos con mayor relevancia en nuestro tema de interés. Para ello se emplearon los términos “CRISPR/Cas9” y “Autoimmune diseases”.

Estos términos debían encontrarse en el título o hacer parte del abstract del artículo, además fueron añadidos al comando de búsqueda de términos en plural y otras formas de representación de la técnica CRISPR/Cas9. Todo esto con el objetivo de aumentar la especificidad y sensibilidad del proceso de búsqueda.

La ecuación de términos para la búsqueda en la base de datos PubMed fue la siguiente:

```
(((((("CRISPR-Associated Protein 9"[Mesh]) AND "Autoimmune Diseases"[Mesh]) OR (CRISPR/Cas9[Title/Abstract])) OR (CRISPR-Cas9[Title/Abstract])) AND (Autoimmune disease[Title/Abstract])) OR (((CRISPR/Cas9) OR (CRISPR-Cas9)) AND (Autoimmune disease)))
```

Para la base de datos Scopus fue necesario utilizar otra ecuación de términos, descrita a continuación:

```
TITLE-ABS-KEY((((CRISPR) OR (CRISPR/Cas9)) OR (CRISPR-Cas9)) AND (Autoimmune disease)) AND PUBYEAR > 2012 AND PUBYEAR < 2024 AND (LIMIT-TO ( DOCTYPE,"ar" ) OR LIMIT-TO ( DOCTYPE,"re" ) ) AND ( LIMIT-TO ( OA,"all" ) )
```

En la respectiva búsqueda fueron seleccionados solo aquellos artículos publicados durante el 2013 y 2023 para hacer el cribado de la información en ambas bases de datos. Por otro lado, en el proceso de selección de artículos, al ser obtenidos en dos bases de datos distintas, fue imprescindible realizar una comparación de los artículos a partir del Digital Object Identifier (DOI) para descartar la duplicidad de los artículos encontrados. Posteriormente se plantearon los criterios de inclusión y de exclusión que están expuestos a continuación:

Criterios de inclusión

- Artículos evaluados por expertos.
- Artículos o publicaciones científicas que tengan como objetivo analizar la aplicación de la técnica CRISPR/Cas9 en enfermedades autoinmunes.
- Artículos publicados a partir del año 2013.
- Artículos de acceso abierto.

Criterios de exclusión

- Artículos que evalúan el uso de la técnica CRISPR/Cas9 en otro tipo de patologías que no sean autoinmunes.
- Artículos que no contengan la palabra CRISPR/Cas9 en su título, abstracto o palabras claves.
- Artículos que no estén publicados en inglés o español.

Una vez comparadas ambas bases de datos y establecidos los criterios de inclusión y de exclusión, fueron seleccionados 6 artículos, los cuales cumplían con los criterios deseados en la revisión sistemática. En la figura 5 se puede observar el diagrama de PRISMA, donde se explica la metodología de selección para la elaboración de la revisión sistemática.

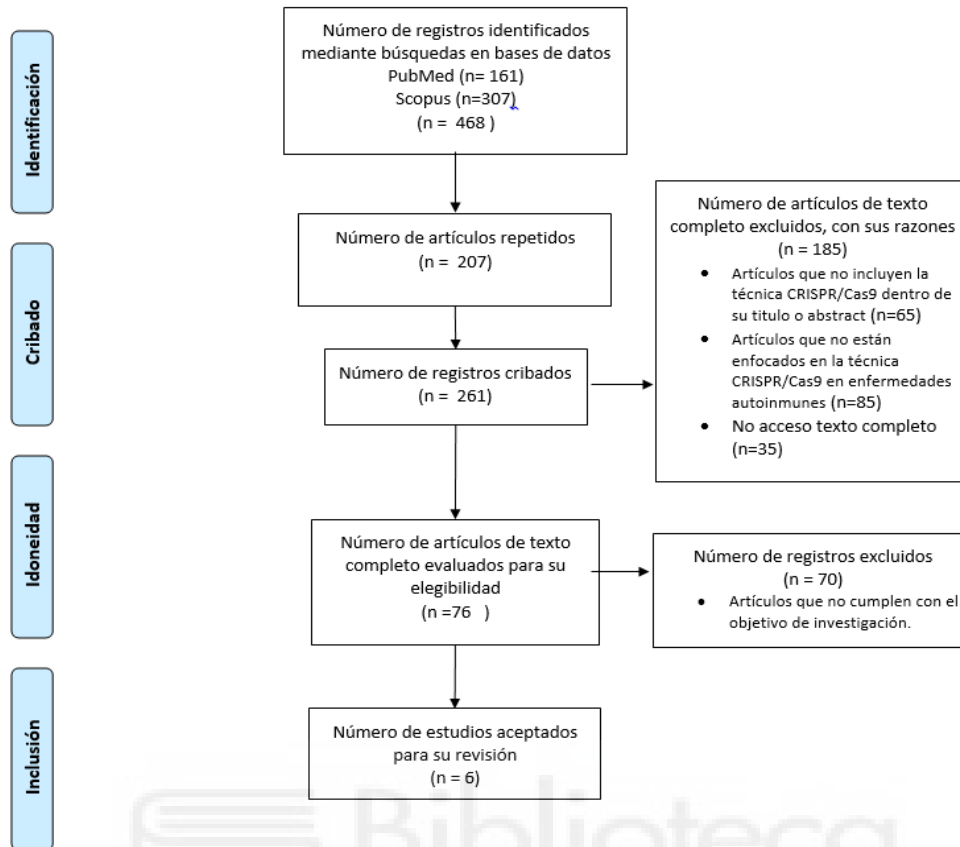


Figura 5. Flujograma selección de artículos según el método PRISMA.

6. RESULTADOS

Los 6 artículos seleccionados se encuentran expuestos en la tabla 1, de los cuales 3 fueron revisiones sistemáticas y los otros 3 estudios experimentales. Es importante mencionar que de las revisiones de Rodríguez (2019) y Lee (2022) fueron extraídos estudios importantes en el análisis, los cuales han sido referenciados dentro de la discusión.

Estudio	Tema	Diseño	Resultado	Referencia
Singh et al., 2019	Edición dirigida del genoma y epigenoma mediante CRISPR/Cas9 y sus aplicaciones terapéuticas en enfermedades mediadas por el sistema inmunológico.	Revisión sistemática	CRISPR/Cas9 puede editar el epigenoma favoreciendo la expresión o inactivación de genes involucrados en diversas enfermedades del sistema inmune.	19
Rodríguez et al., 2019	Edición del genoma: Una perspectiva sobre la aplicación de CRISPR/Cas9 para estudiar enfermedades humanas.	Revisión sistemática	CRISPR/Cas9 es una potencial herramienta para la elucidación de mecanismos de enfermedad y descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas.	11
Lee et al., 2022	Edición del Genoma Utilizando CRISPR-Cas9 y Enfermedades Autoinmunes: Una Revisión Integral.	Revisión sistemática	Aplicación CRISPR/Cas9 en diversas enfermedades autoinmunes.	15
Jing et al., 2015	Edición del Genoma Mediante CRISPR/CAS9 de miRNA-155 Inhibe la Producción de Citocinas Proinflamatorias por Células RAW264.7	Estudio experimental en modelos animales	El gen miR-155 esta involucrado en la presencia de SHIP1, este hecho hace que este gen esté involucrado en el progreso de la AR.	18
Ratiu et al., 2017	Disrupción Genética del eje AID/RAD51 Protege de Manera Similar a Ratones No Obesos Diabéticos Contra la Diabetes Tipo 1 mediante la Expansión de Linfocitos B Reguladores.	Estudio experimental en modelos animales	El eje AID/RAD51, está involucrado en el desarrollo de la DM1 en ratones	20
Zhu et al., 2019	El alelo LCK rs10914542-G se asocia con la diabetes tipo 1 en niños mediante la hiporrespuesta de las células T.	Estudio experimental in vitro en células humanas	<i>el alelo G del SNP rs10914542 en el gen LCK perjudica la activación de las células T mediada por TCR/CD3, aumentando así el riesgo de desarrollar DM1</i>	21

Tabla 1. Características y resultados de los artículos incluidos.

En esta sección, se presentan las evidencias recopiladas sobre las diversas aplicaciones de la técnica CRISPR/Cas9 en áreas de investigación actuales. Se destaca su utilidad en el estudio de polimorfismos de nucleótido único (SNP) reguladores y su papel en la patogenia de enfermedades. Además, se exploran los procesos de edición del epigenoma en células del sistema inmune. Se aborda, asimismo, la posible aplicación de esta técnica en enfermedades como la artritis reumatoide y la diabetes tipo 1, evaluando estudios tanto en modelos in vitro humanos como en modelos animales. Este análisis se lleva a cabo con el propósito de evidenciar los avances significativos de la técnica CRISPR/Cas9, especialmente enfocados en el ámbito de las enfermedades autoinmunes.

CRISPR/Cas9 Y POLIMORFISMOS DE NUCLEOTIDO ÚNICO

El desarrollo de terapias basadas en la edición del ADN tiene como objetivo la restauración de la función génica mediante la modificación o mutación de la misma. Por esta razón, es importante hablar del polimorfismo de nucleótido único (SNP), definido como la variación en la secuencia del ADN en solo un nucleótido de su

estructura, modificación que brinda información sobre la probabilidad en la que dicha diferencia en el genoma esté asociada a un fenotipo en específico, permitiendo obtener más información sobre las poblaciones a nivel genético y su correlación con ciertas enfermedades¹¹.

Además, la edición de los SNP ha sido abordada de diversas formas, tales como: el knockout de los genes causantes de enfermedades, la inserción de mutaciones protectoras o la adición terapéutica de transgenes, definidos como la transferencia de material genético de un organismo a otro de forma artificial.¹¹

Estudios genéticos poblacionales realizados con el objetivo de encontrar variaciones genéticas relacionadas con enfermedades como los GWAS, han identificado SNPs asociados con enfermedades complejas¹⁹.

Mediante estudios GWAS ha sido posible determinar, que muchos de estos SNPs se encuentran en regiones intrónica e intergénicas en el ADN, zonas de gran importancia para los elementos reguladores del gen, tales como los potenciadores o inhibidores, los cuales modulan la expresión génica¹⁹.

Para identificar SNPs reguladores, se estudia la estructura de la cromatina en diferentes células, especialmente las del sistema inmunológico para comprender mejor cómo ciertas variantes genéticas pueden influir en la regulación génica y contribuir a enfermedades. Esto se detalla ilustrativamente en la figura 6¹⁹.

Abordar estos desafíos requiere la integración de diversos conjuntos de datos ómicos, como la transcriptómica, la epigenómica, variantes genéticas derivadas de GWAS y estudios funcionales utilizando tecnologías de edición genómica, como CRISPR/Cas9, tal como se observa en la figura 6¹⁹.

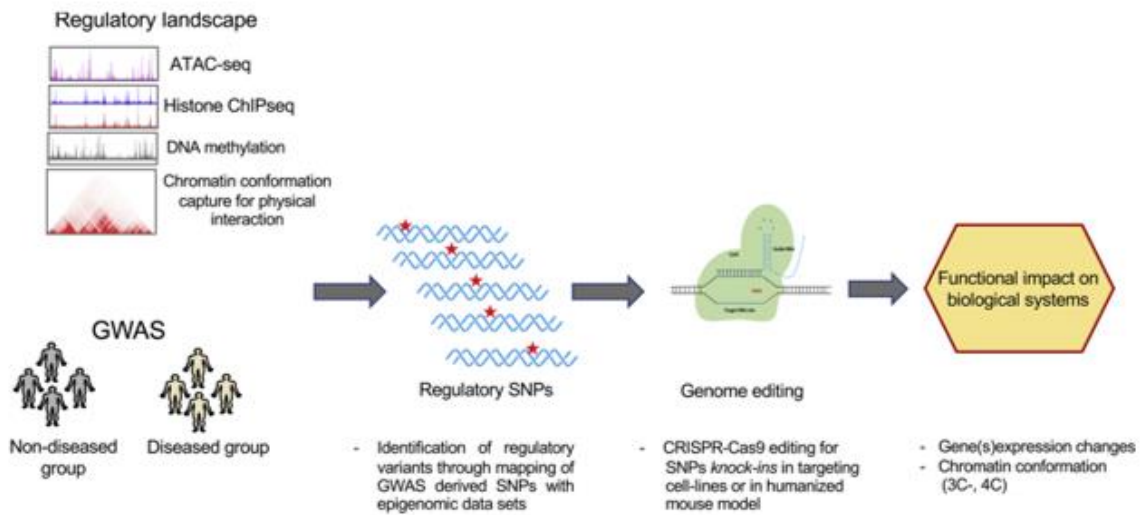


Figura 6. Análisis de la función molecular de SNPs reguladores asociados a enfermedades, los cuales han sido determinados a través de estudios GWAS y herramientas bioinformáticas. Una vez identificados estos SNPs reguladores, mediante CRISPR/Cas9 es posible insertar en el ADN de líneas celulares o modelos animales estos SNPs con el objetivo de determinar a escala laboratorio la posible implicación de estas secuencias sobre los sistemas biológicos¹⁹.

Es por esta razón que Singh (2019) menciona que es de gran importancia validar funcionalmente estas predicciones y definir las funciones moleculares de las variantes reguladoras asociadas a enfermedades, destacando su importancia en la investigación de enfermedades asociadas al sistema inmune.

EDICIÓN DEL EPIGENOMA Y MODIFICACIÓN GENÉTICA EN CELULAS DEL SISTEMA INMUNE CON CRISPR/Cas9

La epigenética es el estudio de modificaciones heredables y reversibles en la expresión génica que no se asocian a alteraciones en la secuencia del ADN, es decir, no están determinadas por alteraciones en la secuencia de genes, sino por modificaciones estructurales de la cromatina que envuelve al ADN¹⁹.

Dentro de estas modificaciones se encuentra la metilación del ADN, la modificación de histonas y la regulación mediante ARN no codificante. Estas alteraciones dan lugar a activación o inactivación de genes, afectando directamente la función celular,

modificando una gran variedad de procesos biológicos como la diferenciación celular o la respuesta a señales ambientales¹⁹.

Se sabe que la epigenética tiene un rol importante en el proceso de regulación génica, teniendo implicaciones importantes en la comprensión de enfermedades, tales como las enfermedades autoinmunes, las cuales también se asocian a factores epigenéticos¹⁹.

La epigenética desempeña un papel crucial en la regulación génica y tiene implicaciones importantes para la comprensión de enfermedades, ya que su desregulación puede dar lugar a cambios aberrantes en la expresión génica y por ende, en el desarrollo de enfermedades, como es el caso de muchas de las enfermedades autoinmunes, que pueden aparecer con el paso del tiempo debido a una exposición recurrente a diferentes factores¹⁹.

Se han llevado a cabo diferentes estudios utilizando una variante de la proteína Cas9 que carece de actividad catalítica debido a mutaciones en su dominio endonucleasa. Esta se une con reguladores epigenéticos, que pueden ser tanto activadores como depresores de la expresión génica. La función de esta unión es dirigirse a genes específicos o a elementos regulatorios en el genoma mediante un sgRNA, cuya Cas9 está inactiva¹⁹.

Este proceso guiado por sgARN permite dos tipos de modulación de la expresión génica: la represión transcripcional, que inhibe la actividad del gen y la activación, que estimula la actividad del gen. En resumen, esta técnica proporciona una herramienta versátil para modular la expresión génica de manera específica. En la figura 7 se puede observar de una forma ilustrativa las diferentes estructuras que pueden sintetizarse para llevar a cabo la regulación de la expresión génica con CRISPR/Cas9¹⁹.

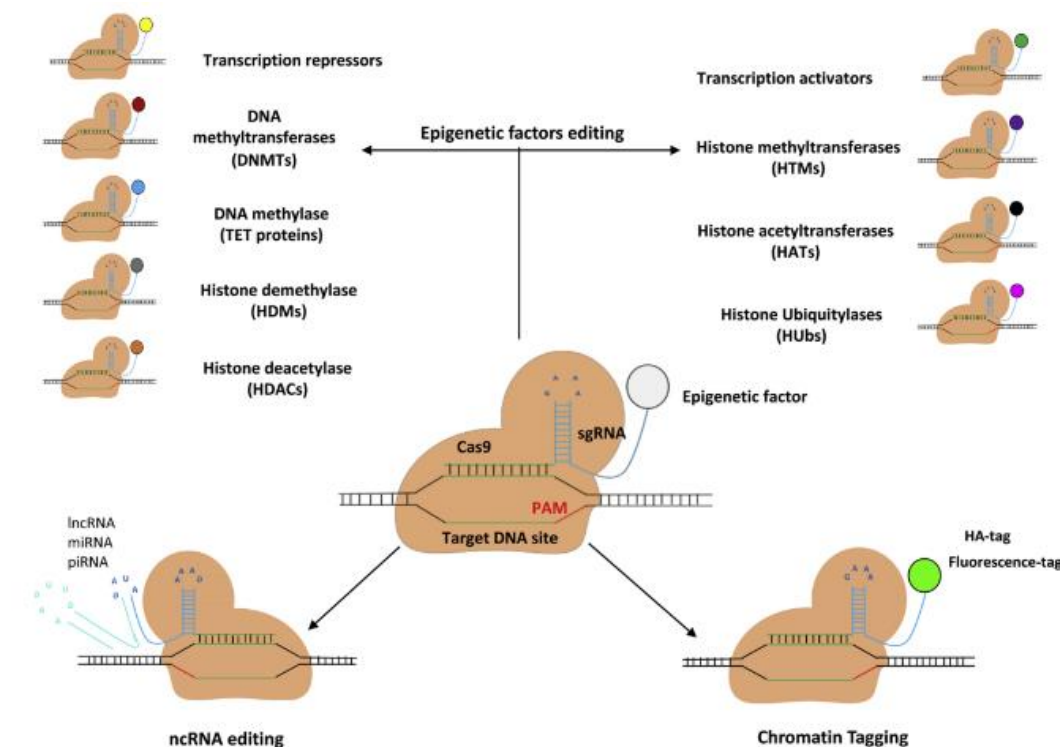


Figura 7. Edición epigenómica mediante CRISPR/Cas9.¹⁹

Adicionalmente a esto, la revisión sistemática de Singh (2019) menciona que los ARN no codificantes (ARNnc) representan otra clase de maquinaria epigenética, y la edición de ARNnc mediante la tecnología CRISPR se puede aplicar para investigar los mecanismos de expresión génica dirigidos por ARNnc (Figura 7)¹⁹.

Por otro lado, dentro de las posibles aplicaciones de esta técnica, Singh (2019) menciona que es posible marcar con una molécula fluorescente el complejo sgRNA (Figura 7) con el objetivo de visualizar el comportamiento de la cromatina, técnica que puede ser usada para definir la relación entre los diferentes estados cromatínicos y la transcripción génica que regula la programación de las células del sistema inmune durante el desarrollo y diferenciación en distintas etapas de la enfermedad, lo que permite comprender los mecanismos epigenéticos que regulan estos procesos¹⁸.

Además, es importante mencionar que la mayoría de las ediciones de epigenomas con CRISPR/Cas9 en células inmunológicas primarias se basan en la represión transcripcional de la expresión génica y solo muy pocos estudios han explorado la

activación de la expresión génica, hecho que hace urgente la investigación en procesos de activación génica¹⁹.

Signh (2019) menciona otro estudio en el que se emplea la tecnología CRISPR/Cas9, en el cual se diseñaron ARN guía cortos (dgRNAs), más cortos de lo habitual para no permitir que la Cas9 generara roturas de doble cadena en el locus objetivo. Este sistema implicó el reclutamiento de Cas9 y complejos de activación transcripcional al loci objetivo mediante dgRNAs en modelos experimentales de ratones con diabetes tipo 1 (DM1), demostrando la viabilidad de la activación de genes in vivo para mejorar síntomas de enfermedades. Este avance sugiere nuevas posibilidades para el desarrollo de terapias epigenéticas dirigidas en el tratamiento de enfermedades humanas¹⁹.

De manera general, CRISPR/Cas9 podría ayudar en la modulación de las células inmunitarias, con el objetivo de modificar los procesos intracelulares asociados con la señalización de citoquinas, la migración y activación celular y la inflamación¹⁸.

Un claro ejemplo de esta tendencia se observa en un reciente estudio en el cual se utilizaron las técnicas de edición genética CRISPR/Cas9 para modificar células T, logrando que expresaran receptores de autoanticuerpos quiméricos (CAARs). Estos autoanticuerpos quiméricos demostraron su capacidad para guiar y dirigir a las células T, facilitando la eliminación de las células B autoreactivas. Este fenómeno condujo a una disminución sustancial de la respuesta inflamatoria en una enfermedad autoinmune específica, el penfigo vulgar, mediada por anticuerpos¹⁹.

Este descubrimiento sugiere que las células T que expresan receptores de autoanticuerpos quiméricos (T-CAAR) podrían representar una estrategia eficaz para dirigir las células B autoreactivas en enfermedades autoinmunes impulsadas por anticuerpos. Además, resalta el potencial beneficioso de la técnica CRISPR/Cas9 para mejorar la especificidad y eficacia de las células T-CAAR, abriendo nuevas posibilidades en la investigación y tratamiento de enfermedades autoinmunes¹⁹.

La información proporcionada nos brinda una perspectiva valiosa sobre las inmunoterapias basadas en la edición genética. Estas innovadoras aproximaciones

prometen tratamientos más específicos y de mayor duración para combatir enfermedades. La capacidad de modificar genéticamente células del sistema inmunológico abre la puerta a estrategias terapéuticas altamente personalizadas y potencialmente más efectivas. Este enfoque no solo representa un avance emocionante en la búsqueda de tratamientos para diversas enfermedades, sino que también destaca la importancia de la investigación continua en el campo de la edición genética y la inmunoterapia.

CRISPR/Cas9 EN ARTRITIS REUMATOIDE

El aumento de la prevalencia de las enfermedades reumáticas actualmente las ha puesto en el punto de mira de muchas investigaciones con CRISPR/Cas9 ya que estas se pueden clasificar desde enfermedades auto inflamatorias monogénicas raras hasta enfermedades autoinmunes poligénicas complejas. Por un lado, altos niveles de IL-1 caracterizan a las enfermedades autoinflamatorias monogénicas debido a mutaciones en el gen NLRP3. Sin embargo, por otro lado, en las enfermedades autoinmunes poligénicas como la artritis reumatoide (AR), hay múltiples factores medio ambientales y genéticos involucrados¹¹.

La AR afecta a más de 21 millones de personas en todo el mundo, siendo reconocida como una enfermedad autoinmune que impacta directamente en las articulaciones. Se caracteriza por la infiltración de macrófagos y linfocitos, la proliferación de fibroblastos sinoviales y, en última instancia, la destrucción articular. A pesar de la diversidad de tratamientos disponibles actualmente, cuyo propósito es ralentizar la progresión de la enfermedad y mitigar el daño en las articulaciones, es importante destacar que la terapia génica o celular ha recibido una atención limitada en la investigación y aplicación clínica. Este campo emergente posee un potencial innovador significativo, y la exploración más profunda de estas modalidades podría abrir nuevas perspectivas en el manejo de la artritis reumatoide¹⁸.

Rodriguez (2019) en su revisión sistemática menciona 3 estudios realizados con el objetivo de observar la posible aplicación de CRISPR/Cas9 en AR.

En el primer estudio llevado a cabo por Yang (2014), se estableció un modelo in vitro e in vivo utilizando la tecnología CRISPR/Cas9. Se empleó la herramienta CRISPR/Cas9 para suprimir la expresión del gen del agrecano (ACAN), desempeñando este gen un papel esencial en la estructura y función del cartílago articular. Este proceso se llevó a cabo en una línea celular de condrosarcoma de rata que expresaba de manera estable la enzima Cas9. El objetivo principal de esta investigación fue analizar las interacciones que regulan la función, diferenciación y homeostasis condrocítica. Además, se buscó caracterizar la respuesta de los condrocitos frente a la pérdida de la expresión de ACAN y comprender su implicación en el desarrollo del condrosarcoma¹².

Yang (2014) determinó que la pérdida de la expresión de agrecano, conseguida gracias al uso de la tecnología CRISPR/Cas9, afecta directamente a la síntesis de la matriz rica en glucosaminoglicanos y que esta juega un papel fundamental en la respuesta inmunitaria ya que su ausencia dio lugar a un aumento de la reactividad del sistema inmune huésped sobre el condrosarcoma, inhibiendo su proliferación.

Por otro lado, en otro estudio, Tang (2014) empleó la técnica CRISPR/Cas9 en una línea celular de macrófagos murinos denominada RAW264.7. Esta línea celular fue genéticamente modificada con CRISPR/Cas9 con el propósito de alterar la estructura del gen RASGRP3 para inhibir su expresión. RASGRP3 codifica una proteína que activa las GTPasas Ras y Rap1, reconocidas por su papel crucial en la transducción de señales intracelulares. Esta investigación concluyó que el gen RASGRP3 limita la respuesta inflamatoria mediante la activación de Rap1, obstaculizando la producción de interleucina-6 (IL-6) inducida por los receptores tipo Toll 3/4/9 y aliviando la artritis inducida por colágeno. Estos hallazgos sugieren que RASGRP3 desempeña un papel clave en prevenir una respuesta inflamatoria excesiva¹⁴.

Por último, en su revisión, Rodríguez menciona el estudio de Brunger (2017), el cual usó CRISPR/Cas9 para editar genéticamente células madre pluripotentes murinas, a las cuales se les modificó el gen CCL2. Este gen modula la distribución de monocitos, macrófagos, basófilos y linfocitos T, a través de moduladores proinflamatorios como

la interleucina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), citocinas proinflamatorias que en la AR se encuentran de forma desregulada¹⁴.

Mediante CRISPR/Cas9, Brunger y colaboradores insertaron en el locus del gen CCL2 genes que son antagonistas de citocinas como la IL-1 y el TNF- α . Todo esto con el propósito de conferir a las células la capacidad de autoregularse en respuesta a la activación por citocinas y controlar la respuesta inflamatoria mediada por IL-1 y TNF- α mediante mecanismos de retroalimentación. Este resultado podría dar lugar a la posibilidad de incorporar el sistema CRISPR/Cas9 en terapias génicas individualizadas¹⁴.

Otro estudio interesante y prometedor, ya independiente y fuera de la revisión sistemática de Rodríguez y colaboradores, fue el de Jing (2015), el cual fue capaz de mutar con éxito el gen endógeno miR-155 en una línea celular de macrófagos murinos RAW264.7. Este gen (miR-155) se encuentra dentro del locus del gen BIC, que está localizado en el Cromosoma 16 en ratones y en el Cromosoma 21 en humanos y se ha vinculado con la patogénesis de la AR en modelos clínicos y experimentales, ya que se encuentra aumentado en la membrana y líquido sinovial de pacientes con AR¹⁸.

Mediante la técnica CRISPR/Cas9, fue posible obtener clones con distinto grado de eliminación del gen miR-155, los 6 clones obtenidos se ilustran en la figura 8a. De estos 6 clones solo los D4 y D6 presentaron una disminución significativa del gen miR-155 (figura 8b)¹⁸.

Los análisis adicionales mostraron que los clones D4 y D6 de miR-155 conseguían aumentar la expresión SHIP1 (figura 8c), una proteína que tiene un efecto inhibitor sobre la producción de moléculas proinflamatorias que sintetizan los macrófagos. En la figura 8d se observa como la cantidad de esta proteína es mucho mayor en el clon D6 que en el control, lo que les permitió inferir que conforme el gen miR-155 esté más afectado estructuralmente, mayor será la presencia de SHIP1 y por consecuencia el progreso de la AR podría modularse de una forma más eficaz¹⁸.

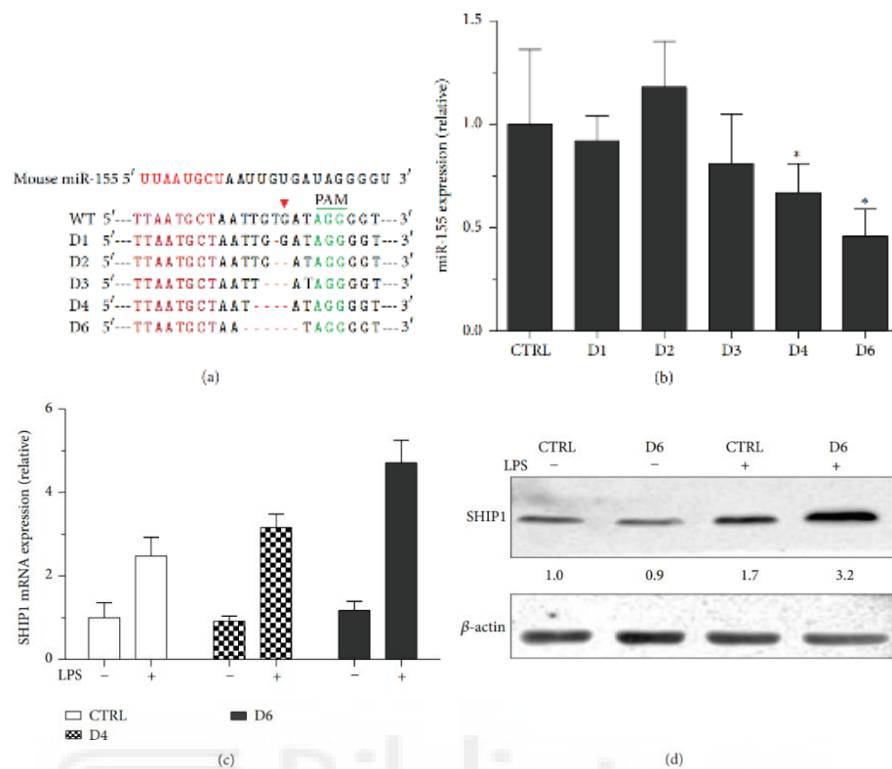


Figura 8. (a) Secuencia nucleotídica de los clones de miR-155 mutado y su (b) expresión en cada uno de ellos. (c) Expresión de SHIP1 en el control, D4 y D6 estimulados con LPS y (d) comparación de la cantidad de la proteína SHIP1 en control y D6¹⁸.

Sin embargo, otro hecho interesante ha sido el traslado de la técnica CRISPR/Cas9 en modelos celulares humanos, tal como lo menciona Lee (2022) en su revisión sistemática, en donde cita 1 estudio que fue realizados en un modelo celular humano para la AR¹⁵.

Un análisis incluido en esta nueva revisión sistemática, resalta que el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) intergénico rs6927172, situado en la región 6q23 del cromosoma, se encuentra asociado con la evolución de la artritis reumatoide (AR), según revela un estudio exhaustivo de asociación genómica. La investigación de Yu (2016) identifica diversos genes circundantes en la ubicación del SNP, entre ellos IL20RA, IL22RA2, IFNGR1, OLIG3 y TNFAIP3. A pesar de esta diversidad génica en la zona, la aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 para modificar la región del SNP reveló una disminución significativa solo en la expresión de los genes TNFAIP3 y

OLIG3. Estos dos genes, conocidos por su participación en procesos inflamatorios y de regulación celular, refuerzan su relevancia en la progresión de la AR^{15,17}.

Este hallazgo sugiere una fuerte conexión entre el marcador genético rs69271772 y los genes TNFAIP3 y OLIG3 en el contexto de la AR, proporcionando una visión más detallada de los mecanismos subyacentes en la patogénesis de la enfermedad. La disminución selectiva en la expresión de TNFAIP3 y OLIG3 tras la modificación del SNP resalta la importancia de estos genes en la regulación precisa de los procesos inflamatorios, apuntando hacia posibles objetivos terapéuticos específicos para abordar la evolución de la artritis reumatoide¹⁷.

CRISPR/Cas9 EN DIABETES MELLITUS

En la actualidad la diabetes mellitus tiene una gran relevancia a nivel poblacional debido a su gran incidencia. Según el informe del año 2015 de la Federación Internacional de Diabetes alrededor de 415 millones de personas en el mundo padecen diabetes y estima que esta cifra hacia el año 2040 aumentará a más de 640 millones²⁰.

Dentro de las manifestaciones de la diabetes mellitus, se encuentran los niveles elevados de glucosa en sangre, dando lugar a síntomas como poliuria, polidipsia y pérdida de peso. Se sabe que la diabetes se desarrolla debido a una deficiencia en la producción funcional de insulina, la cual puede surgir de una secreción anormal de insulina o a una disminución en la respuesta fisiológica a esta hormona²⁰.

La diabetes se puede clasificar en varios tipos 1 y 2, siendo la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) una forma especialmente relevante ya que se caracteriza por una respuesta autoinmune que da lugar a la destrucción de las células beta en el páncreas, quienes son responsables de la síntesis de insulina²⁰.

La DM1 es comúnmente diagnóstica a edades tempranas, lo que implica un control continuo de la enfermedad mediante la administración de insulina, debido a que el cuerpo no puede producir esta hormona de forma natural.

En este contexto, la aplicación de tecnologías innovadoras como la edición genómica mediante CRISPR/Cas9 tiene el potencial de ofrecer avances científicos en la comprensión de los factores genéticos asociados a la DM1 y, en última instancia, en el desarrollo de enfoques terapéuticos más específicos y personalizados²⁰.

Se sabe que los linfocitos B desempeñan un rol clave en el desarrollo de la DM1, ya que actúan como células presentadoras de antígeno que favorecen la expansión de linfocitos T autoreactivos patógenos que atacaran a los islotes B del páncreas²⁰.

Además, los autoanticuerpos de IgG, que se encuentran en individuos que presentan un alto riesgo de desarrollar DM1, sugieren que las células B que los producen han experimentado procesos de maduración de afinidad, como la recombinación de cambio de clase (CSR) y la hipermutación somática (SHM)²⁰.

Esta información condujo a la investigación de Ratiu (2017), donde el uso fundamental de CRISPR/Cas9 permitió llevar a cabo la ablación genética del eje AID/RAD51. La proteína desaminasa de citidina inducida por activación (AID), expresada por el gen *Aicda*, juega un papel crucial en la inducción del CSR y la SHM en linfocitos B. AID introduce mutaciones puntuales y roturas de doble cadena en las secuencias génicas de inmunoglobulinas, siendo esto esencial para la diversificación y función del sistema inmunológico. Sin embargo, en ocasiones, la enzima AID puede generar roturas de doble cadena en otras partes del genoma, las cuales son reparadas mediante HR modulada por el complejo RAD51. En ausencia de este proceso de reparación, las células B en las que se ha iniciado la diversificación y cambio de clase experimentarán la muerte celular²⁰.

Ratiu (2017) para evaluar el sistema AID/RAD51 diseñó un modelo a partir de 2 cigotos de especies de ratón distintos, los ratones NOD que eran más propensos a desarrollar autoinmunidad y los B6 que no eran propensos a desarrollar

autoinmunidad. A los NOD, mediante CRISPR/Cas9 los modificó genéticamente para llevar a cabo la ablación del gen *Aicda*, todo esto con el objetivo de evaluar el papel de este gen en el desarrollo de DM1²⁰.

Como se aprecia en la Figura 9A, los niveles de expresión basal del gen *Aicda*, esenciales para la inducción de CSR y SHM, son significativamente más elevados en los linfocitos B de ratones NOD (susceptibles a la autoinmunidad) en comparación con los de ratones B6 (no susceptibles a la autoinmunidad). Este descubrimiento sugiere la posible existencia de un mayor número de linfocitos B activados por autoantígenos en los ratones NOD en contraste con los ratones B6²⁰.

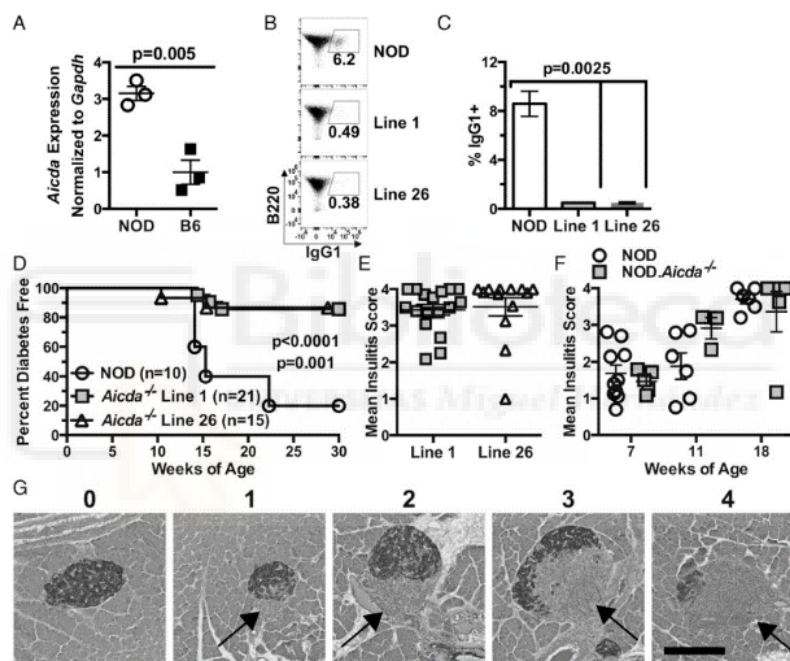


Figura 9. (A) Niveles de expresión del gen *Aicda* en linfocitos B extraídos de NOD y B6, (B) Citometría de flujo que muestra el cambio de clase de los linfocitos B a IgG1 en NOD y las líneas 1 y 26, (C) Porcentaje de IgG1 determinada en NOD, línea 1 y 26, (D) Incidencia de DM1 en NOD, Línea 1 y 26, (E) Puntuaciones de insulítis en una escala de 0 (sin lesiones visibles) a 4 (destrucción del 75 al 100% de los islotes) en NOD, línea 1 y 26, (F) Evaluación desarrollo de insulítis en NOD y NOD.*Aicda* durante 18 semanas, (G) Representación de los islotes para cada nivel de la escala, la flecha indica el punto de infiltración linfocítica en los islotes²⁰.

Posteriormente, para determinar si la expresión de *Aicda* por parte de los linfocitos B en ratones de la cepa NOD era crucial para su actividad, utilizaron la tecnología CRISPR/Cas9 para dirigirse directamente a los exones 1 (línea 1) o 2 (línea 26) del gen *Aicda* en los cigotos NOD, con el objetivo de inhibir su expresión y de esta forma generar líneas puras de ratones con estas modificaciones genéticas específicas²⁰.

Luego evaluaron la capacidad de los linfocitos B purificados de estas líneas modificadas genéticamente para someterse a la CSR al isotipo IgG1 después de la estimulación in vitro con anti-CD40 e IL-4 en un entorno de laboratorio y se obtuvieron los resultados de la figura 9B y 9C. En estas figuras se puede observar que los linfocitos B de ratones NOD modificados genéticamente tenían una disminución significativa en la CSR, sugiriendo que la expresión de *Aicda* es importante para esta actividad²⁰.

Posteriormente, los autores de este trabajo determinaron la tasa de desarrollo de diabetes en las 2 líneas (1 y 26) frente a el control NOD, y como se puede observar en la figura 9D ambas líneas mostraron una tasa de desarrollo significativamente reducida en comparación con el control NOD. Adicionalmente, un hallazgo interesante fue que, aunque los ratones de las líneas 1 y 26 permanecieron libres de DM1 al final del estudio, aún mostraron niveles significativos de insulinitis (inflamación de los islotes pancreáticos) (Figura 9E)²⁰.

Se evaluó también la progresión de la insulinitis a lo largo del tiempo (7, 11 y 18 semanas), sin embargo, como se observa en la figura 9F y 9G, no se produjo un retraso significativo en los ratones de las líneas 1 y 26 (NOD.*Aicda*) en comparación con los ratones control NOD, lo que indica que esto no podría explicar la resistencia al desarrollo de DM1 en estas líneas²⁰.

Posterior a estos análisis se evaluó la expresión de CD73+ por parte de los linfocitos B en los ratones NOD y los NOD.*Aicda*, ya que esta proteína cumple un papel fundamental en la regulación del sistema inmune. Como se puede observar en la figura 10A, los ratones NOD.*Aicda* presentaron un porcentaje mayor de CD73+ con respecto a los NOD²⁰.

Debido a esto, fueron transferidos linfocitos T de ratones NOD a un modelo de ratones deficiente de linfocitos (NOD.Scid) con el objetivo de inducirles diabetes, una vez transferidos los linfocitos T, se dividieron en 2 grupos: Total B-cell, a los que se les transfirieron células B normales y CD73-B-cell, que se les transfirió células B deficientes en CD73+. Todo esto con el objetivo de examinar cómo la presencia o

ausencia del subconjunto CD73+ en los linfocitos B afecta el desarrollo de la T1D en los receptores NOD-scid²⁰.

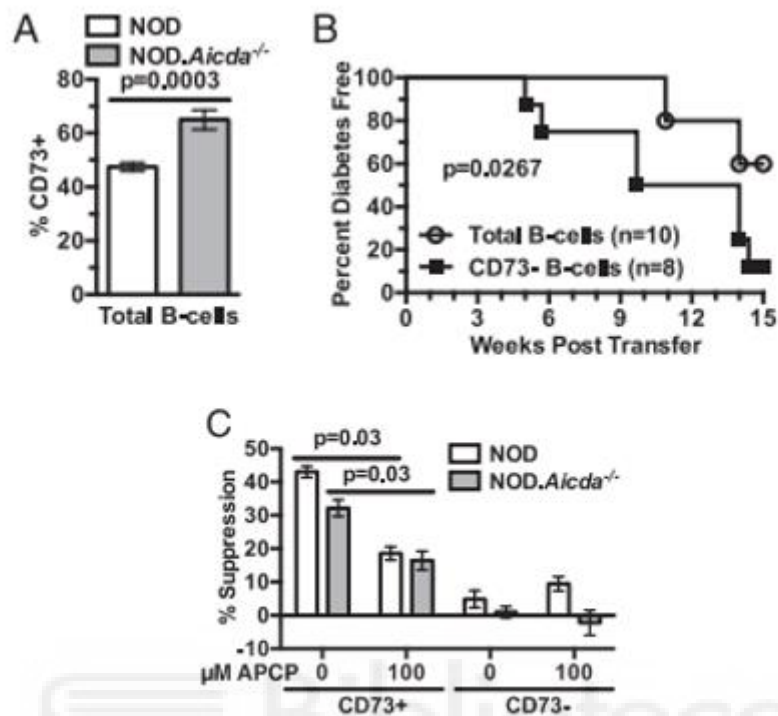


Figura 10. (A) Porcentaje de expresión de linfocitos B CD73+ en NOD y NOD.Aicda, (B) Desarrollo de DM1 en CD73-B-cells y Total B-cell, (C) Porcentaje de supresión observado en NOD y NOD.Aicda²⁰.

Como se observa en la figura 10B, el desarrollo de DM1 fue más rápido en el grupo CD73-B-cell, lo que permitió inferir que la protección observada en el grupo Total B-cells se debe, al menos en parte, a la expansión de poblaciones específicas de linfocitos B CD73+, que tienen la capacidad de regular las respuestas patogénicas de las células T ²⁰.

En la figura 10C se contrastaron los modelos NOD y NOD.Aicda para examinar si los linfocitos B ejercen efectos supresores sobre las células T patogénicas a través de la actividad reguladora mediada por el subconjunto CD73+. A estos dos modelos, al igual que el apartado anterior, se les transfirió células B normales y también células B con ausencia de CD73 y adicional a esto fueron estimulados con APCP, que tiene una acción inhibitoria en distintos procesos celulares específicos²⁰.

Los resultados de la figura 10C indican que, el grupo de los linfocitos B CD73+ de ratones NOD y NOD.*Aicda* presentaron una proliferación de células T muy similar. En contraste con en el grupo de linfocitos B CD73- , en donde la proliferación celular de células T es mayor en NOD que en NOD.*Aicda*. Por otro lado, al comparar ambos grupos se observa que la proliferación de células T en el grupo de linfocitos B CD73+ es mucho mayor que el conjunto de linfocitos B CD73-. Adicional a eso, es importante mencionar que la diferencia dentro de cada grupo se debe a la presencia del inhibidor de CD73, el APCP²⁰.

En resumen, estos hallazgos sugieren que los linfocitos B CD73+ expandidos en ratones NOD.*Aicda* pueden ejercer efectos supresores sobre la DM1 y que las interacciones entre estos linfocitos B y las células T pueden modularse a través de la vía de señalización de CD73²⁰.

Rutio (2017) llegó a la conclusión de que la interrupción genética del eje AID/RAD51, inhibe de manera significativa el desarrollo de la DM1 en ratones NOD debido a su efecto inmunosupresor al modular la expansión de poblaciones específicas de linfocitos B CD73+, que tienen la capacidad de regular las respuestas patogénicas de las células T. Además, infirió a partir de estos resultados que, aunque los procesos de cambio de clase (CSR) y mutación somática (SHM) son procesos intrínsecos importantes en la patogénesis de la DM1 en los linfocitos B, su ausencia no disminuye el desarrollo de células T autoreactivas. Estos estudios iniciales apuntan hacia la posibilidad de que la orientación terapéutica del eje AID/RAD51 en los linfocitos B sea una vía hasta ahora no explorada para el desarrollo de terapias destinadas a la DM1²⁰.

Otro estudio interesante fue el diseñado por Zhu (2019), quien dispuso de un modelo celular humano para evaluar el rol que presentaban los SNPs del gen de la tirosina quinasa específica de linfocitos (LCK) en la DM1. Este gen participa en la elección y maduración de linfocitos T en el timo y en la función de los linfocitos T maduros. Se sabe que los linfocitos T autoreactivos son una de las causas que generan la destrucción de las células que componen los islotes que tienen la función de producir la insulina en el páncreas. Es por esta razón que es interesante abordar el desarrollo de DM1 a partir del estudio del gen LCK²¹.

Para llevar a cabo el reclutamiento de las muestras, Zhu (2019) extrajo sangre de un total de 589 pacientes pediátricos con DM1 y de 576 niños sanos. Posteriormente, una vez obtenidas las muestras de sangre, fue necesario extraer su ADN. Aquellas secuencias de ADN que contenían los SNPs de interés fueron amplificadas mediante un proceso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se seleccionaron específicamente 7 SNPs debido a su potencial asociación con el desarrollo de la DM1²¹.

Una vez seleccionados los SNPs, se procedió a hacer un análisis estadístico, en donde se determinó que el SNP rs10914542, tenía una asociación significativa con la posibilidad de desarrollar DM1. Además, este SNP presentaba 2 frecuencias alélicas (C y G) y 3 frecuencias genotípicas (CC, CG y GG)²¹.

Zhu (2019) para identificar como el SNP rs10914542 participaba en el desarrollo de la enfermedad DM1, cultivó las células T obtenidas en las muestras de sangre para poder dar lugar a la modificación del gen LCK mediante CRISPR/Cas9, con el objetivo de que presentaran las mismas posibles frecuencias alélicas y genotípicas de rs10914542 y de esta forma evaluar su función.

Como se menciona anteriormente el gen LCK participa en la activación de linfocitos T y por esta razón Zhu (2019) decidió evaluar la actividad de este gen mediante la respuesta proliferativa mediada por TCR/CD3, en la figura 11 se pueden observar los resultados de la respuesta proliferativa en linfocitos T modificados genéticamente, los cuales son portadores de los genotipos CC, CG y GG.

Los resultados de la Figura 11 señalan que de los tres genotipos identificados para el SNP rs10914542, los genotipos CG y GG mostraron una respuesta proliferativa considerablemente menor en comparación con el genotipo CC. Por lo tanto, resultó crucial evaluar la respuesta proliferativa de los alelos C y G para determinar cuál de estos dos alelos estaba predominantemente involucrado en el desarrollo de la

diabetes tipo 1 (DM1). En la Figura 12 se presentan los resultados de esta consideración.

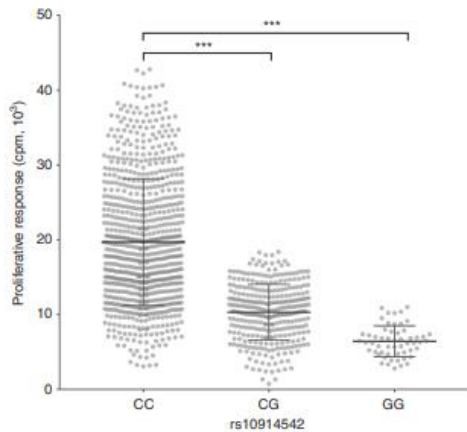


Figura 11. La respuesta proliferativa mediada por (TCR)/CD3 en linfocitos T portadores de los genotipos rs10914542 CC, CG y GG²¹.

La Figura 12 muestra que, entre los dos alelos posibles del SNP rs10914542, el alelo G presenta una respuesta proliferativa significativamente inferior en comparación con el alelo C. Según Zhu (2019), este descubrimiento lleva a la conclusión de que el alelo G del SNP rs10914542 en el gen LCK afecta negativamente la activación de las células T mediada por TCR/CD3, aumentando así el riesgo de desarrollar diabetes tipo 1 (DM1).

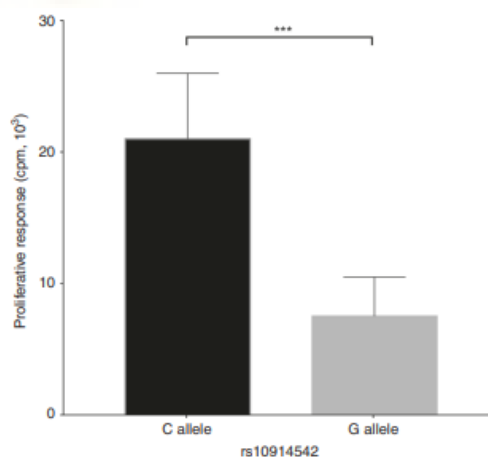


Figura 12. Respuesta proliferativa mediada por (TCR)/CD3 en los linfocitos T transfectados con el alelo-C de rs10914542 de LCK y el alelo-G de rs10914542 de LCK, respectivamente²¹.

De manera general, esta asociación entre la variante genética y la susceptibilidad a la DM1 aporta una comprensión más profunda de los mecanismos subyacentes a esta enfermedad autoinmune y posibles dianas terapéuticas en terapia génica.

7. DISCUSIÓN

En esta revisión bibliográfica, se han podido comprobar las diversas aplicaciones de la técnica CRISPR/Cas9 en el contexto de las enfermedades autoinmunes, destacando su impacto en la investigación actual y sus perspectivas futuras.

En primer lugar, es particularmente revolucionario observar cómo CRISPR/Cas9, ha permitido abrir un campo de investigación interesante para evaluar los polimorfismos de nucleótido único (SNP), permitiendo la identificación de las funciones moleculares de las variantes reguladoras asociadas a un fenotipo de enfermedades.

La aplicación de CRISPR/Cas9 en este campo no solo revela la complejidad genética subyacente en las enfermedades autoinmunes, sino que también resalta la importancia de estas variantes en la modulación de funciones importantes en el sistema inmune, proporcionando una valiosa herramienta para profundizar la comprensión molecular de estas enfermedades.

Sin embargo, es importante mencionar que la aplicación de CRISPR/Cas9 en este campo tiene retos bastante grandes para llegar a ser del todo eficiente en el futuro, uno de ellos es debido a la generalización que se puede llegar a obviar en estudios genéticos poblacionales, debido a que normalmente este tipo de estudios se centran en poblaciones específicas, y muchas veces esos resultados no pueden generalizarse completamente a otras poblaciones.

Además, también hay que tener en cuenta la variabilidad interindividual, ya que la respuesta de diferentes individuos a las mismas variantes genéticas puede variar, hecho que hace más compleja la asociación de fenotipos basada únicamente en la información genética.

Por otro lado, es importante mencionar que otro avance relevante ha sido la edición del epigenoma con CRISPR/Cas9, procedimiento que permite una modificación específica del ADN con el objetivo de regular la expresión génica sin cambiar la secuencia de ADN. Es posible considerar esta técnica como una herramienta prometedora para corregir desregulaciones epigenéticas asociadas a enfermedades, incluyendo las autoinmunes, abriendo nuevas perspectivas terapéuticas en el control y desarrollo de estas patologías

Dado que la mayoría de las modificaciones epigenéticas con CRISPR/Cas9 se centran en la represión transcripcional de la expresión génica, según se indica en los resultados, es fundamental destacar la relevancia de extender esta técnica a los procesos de activación génica. Esta área aún no está completamente explorada y, sin duda, posee un gran potencial para desentrañar los intrincados mecanismos de enfermedades autoinmunes. Estas enfermedades presentan mecanismos de acción sumamente complejos, así como posibles terapias asociadas a CRISPR/Cas9 que podrían estimular la actividad génica con el fin de abordarlas. Es crucial reconocer esta perspectiva para avanzar en la comprensión y tratamiento efectivo de dichas patologías.

También es importante señalar que la aplicación de esta técnica en la edición del epigenoma tiene el potencial de enriquecer los estudios sobre la estructura de la cromatina. Esto permitirá una mejor comprensión de cómo ciertas variantes genéticas afectan la regulación génica. El propósito fundamental es avanzar hacia una comprensión más profunda de estos procesos, lo que podría conducir al desarrollo de terapias más efectivas en el futuro.

Por último, el enfoque terapéutico de CRISPR/Cas9 en enfermedades autoinmunes como AR y DT1 promete el desarrollo de nuevas terapias más precisas y personalizadas debido al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas que esta técnica ha permitido evidenciar. Resaltando que esta técnica puede redefinir la investigación en enfermedades autoinmunes y sugiere un futuro prometedor en la medicina personalizada.

Los resultados de los estudios incluidos en la revisión en lo que respecta a AR y DM1 abordaron cuestiones fundamentales en biología, como la función del agregano en el cartílago articular, la regulación de la respuesta inflamatoria en macrófagos, la capacidad de autoregulación de las células frente a la activación por citocinas y el control en la modulación de la respuesta de los linfocitos T.

Es un hecho y avance interesante la capacidad de insertar genes antagonistas mediante CRISPR/Cas9 en locus específicos (como IL-1 y TNF- α), proceso que ofrece la posibilidad de desarrollar terapias génicas para modular respuestas inflamatorias de manera controlada. Esto podría tener aplicaciones potenciales en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas, muchas de ellas de carácter autoinmune.

Por otro, la manipulación precisa de genes mediante CRISPR/Cas9 permitió estudiar los mecanismos regulatorios subyacentes en diversos procesos biológicos, como la diferenciación condrocítica, la respuesta inflamatoria y la expresión de microARNs. Esto proporciona información valiosa sobre las funciones específicas de los genes y sus implicaciones en enfermedades.

Además, la posibilidad de modificar genes específicos asociados a enfermedades, como el polimorfismo de rs6927172 y rs10914542 relacionado con la AR y DM1, respectivamente, sugiere el desarrollo de terapias personalizadas. La modificación de genes vinculados a condiciones específicas podría abrir la puerta a tratamientos más eficaces y adaptados a las características genéticas individuales.

Al comparar los tratamientos actuales utilizados en enfermedades autoinmunes con la terapia génica mediante CRISPR/Cas9, se evidencia que la terapia génica posee un enfoque más específico y personalizado. No obstante, enfrenta desafíos relacionados con el desarrollo, la seguridad y la ética. A pesar de que los tratamientos actuales son efectivos, suelen generar efectos secundarios significativos debido a su menor especificidad, y presentan limitaciones a largo plazo como resultado. El progreso futuro en este campo dependerá de superar los desafíos inherentes a ambos enfoques y de mejorar la comprensión de sus aplicaciones respectivas.

En líneas generales, CRISPR/Cas9 ha demostrado avances prometedores no solo en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, sino también en diversas afecciones. Se han realizado estudios focalizados en el desarrollo de terapias contra el cáncer, así como en infecciones virales como el VIH, dengue o zika, y otras enfermedades genéticas, incluyendo la distrofia muscular de Duchenne. Además, la tecnología CRISPR/Cas9 se emplea en la creación de modelos animales representativos de enfermedades humanas, facilitando la evaluación de fármacos y terapias.^{22,23}

También es importante mencionar que CRISPR/Cas9, a pesar de sus beneficios, presenta riesgos en su aplicación en humanos. Estos incluyen efectos no deseados tales como: respuestas inmunológicas adversas, preocupaciones éticas y de consentimiento o incertidumbre sobre los efectos a largo plazo. Es por esta razón que la investigación y regulación rigurosas son cruciales para abordar estos riesgos y garantizar la seguridad y eficacia de las terapias basadas en CRISPR/Cas9.

8. CONCLUSIONES

- CRISPR/Cas9 ha avanzado en la comprensión de variantes genéticas asociadas a enfermedades autoinmunes, especialmente en la evaluación de polimorfismos de nucleótido único (SNP).
- La edición del epigenoma con CRISPR/Cas9 abre nuevas perspectivas terapéuticas, pero la aplicación eficiente presenta retos.
- CRISPR/Cas9 permite terapias más personalizadas al insertar genes antagonistas y modificar genes específicos vinculados a condiciones particulares.
- CRISPR/Cas9 ofrece un enfoque más específico y personalizado en comparación con tratamientos actuales, aunque enfrenta desafíos. Los tratamientos actuales, aunque efectivos, pueden tener efectos secundarios significativos debido a su menor especificidad.
- A pesar de los beneficios, la aplicación de CRISPR/Cas9 en humanos presenta riesgos, como respuestas inmunológicas adversas. La investigación y regulación rigurosas son esenciales para garantizar la seguridad y eficacia de estas terapias.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Doudna J, Charpentier E, Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012 Agosto 17; 337(6096): p. 816-821.
2. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*. 1987 Diciembre; 169(12).
3. Matinez Mojica FJ, Juez G, Rodriguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular microbiology*. 1993 Agosto; 9(3).
4. Martinez Mojica FJ, Diez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular microbiology*. 2000 Abril; 36(1).
5. Martinez Mojica F, Diez-Villaseñor C, Garcia-Martinez J, Soria E. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Molecular Evolution*. 2005 Febrero; 60(2).
6. Karginov, F. V., & Hannon, G. J. (2010). The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Molecular cell*, 37(1), 7-19.
7. Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. *Annual review of biophysics*, 46, 505-529.
8. Bannikov, A. V., & Lavrov, A. V. (2017). CRISPR/CAS9, the king of genome editing tools. *Molecular Biology*, 51(4), 514-525.
9. Ishino, Y., Krupovic, M., & Forterre, P. (2018). History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *Journal of bacteriology*, 200(7), 10-1128.
10. Dra, J. A. N. (2012). Inmunopatogenia de las enfermedades autoinmunes. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(4), 464-472.
11. Rodríguez-Rodríguez, D. R., Ramírez-Solís, R., Garza-Elizondo, M. A., Garza-Rodríguez, M. D. L., & Barrera-Saldaña, H. A. (2019). Genome editing: A perspective on the application of CRISPR/Cas9 to study human diseases. *International journal of molecular medicine*, 43(4), 1559-1574.

12. Yang M, Zhang L, Stevens J and Gibson G: CRISPR/Cas9 mediated generation of stable chondrocyte cell lines with targeted gene knockouts; analysis of an aggrecan knockout cell line. *Bone* 69: 118-125, 2014.
13. Tang S, Chen T, Yu Z, Zhu X, Yang M, Xie B, Li N, Cao X and Wang J: RasGRP3 limits toll-like receptor-triggered inflammatory response in macrophages by activating Rap1 small GTPase. *Nat Commun* 5: 4657, 2014.
14. Brunger JM, Zutshi A, Willard VP, Gersbach CA and Guilak F: Genome engineering of stem cells for autonomously regulated, closed-loop delivery of biologic drugs. *Stem Cell Reports* 8: 1202-1213, 2017.
15. Lee, M. H., Shin, J. I., Yang, J. W., Lee, K. H., Cha, D. H., Hong, J. B., ... & Smith, L. (2022). Genome editing using CRISPR-Cas9 and autoimmune diseases: a comprehensive review. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1337.
16. Yang, J.; McGovern, A.; Martin, P.; Duffus, K.; Ge, X.; Zarrineh, P.; Morris, A.P.; Adamson, A.; Fraser, P.; Rattray, M.; et al. Analysis of chromatin organization and gene expression in t cells identifies functional genes for rheumatoid arthritis. *Nat. Commun.* 2020, 11, 4402.
17. Yu, D.; Jin, Z.; Liu, X.; Gao, W.; Gao, X.; Zhang, S.; Ma, S.; Yu, J.; Wang, S. Manipulation of an ra-associated intergenic snp by crispr/cas9 system alters expression of multiple genes at the tnfaip3 locus, poster presentation abstracts. *Int. J. Rheum. Dis.* 2016, 19 (Suppl. S2), 89
18. Jing, W.; Zhang, X.; Sun, W.; Hou, X.; Yao, Z.; Zhu, Y. Crispr/cas9-mediated genome editing of mirna-155 inhibits proinflammatory cytokine production by raw264.7 cells. *Biomed. Res. Int.* 2015, 2015, 326042.
19. Singh, D. D., Hawkins, R. D., Lahesmaa, R., & Tripathi, S. K. (2019, December). CRISPR/Cas9 guided genome and epigenome engineering and its therapeutic applications in immune mediated diseases. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 96, pp. 32-43). Academic Press.
20. Ratiu, J. J., Racine, J. J., Hasham, M. G., Wang, Q., Branca, J. A., Chapman, H. D., ... & Serreze, D. V. (2017). Genetic and small molecule disruption of the AID/RAD51 axis similarly protects nonobese diabetic mice from type 1 diabetes through expansion of regulatory B lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 198(11), 4255-4267.

21. Zhu, Q., Wang, J., Zhang, L., Bian, W., Lin, M., Xu, X., & Zhou, X. (2019). LCK rs10914542-G allele associates with type 1 diabetes in children via T cell hyporesponsiveness. *Pediatric Research*, 86(3), 311-315.
22. Chen, M., Mao, A., Xu, M., Weng, Q., Mao, J., & Ji, J. (2019). CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges. *Cancer letters*, 447, 48-55.
23. Bhowmik, R., & Chaubey, B. (2022). CRISPR/Cas9: a tool to eradicate HIV-1. *AIDS Research and Therapy*, 19(1), 1-14.

