



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

Corrección en embriones humanos de un alelo patogénico dominante del gen MYBPC3 mediante CRISPR/Cas9

Memoria de Trabajo

Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Septiembre 2018

Autor: CARLOS TRIGUEROS LÓPEZ

Modalidad: Artículos científicos SCI

Tutor/es: Antonio Martínez Laborda

Índice

1. RESUMEN.....	3
2.- ANTECEDENTES.....	4
2.1.- Miocardiopatía hipertrófica	4
2.1.1.-Miocardiopatía Hipertrófica Familiar (MCH).	5
2.1.2.- Síntomas de la MCH.....	6
2.1.3.-Diagnóstico.....	7
2.1.4.- Tratamiento	8
2.1.5.- Bases genéticas de la MCH.....	10
2.1.5.1 Proteínas C de unión a la miosina. Isoforma cardiaca	11
2.1.5.2. Mutación de <i>MyBPC3</i> y fenotipo.....	13
2.2. CRISPR.....	13
2.2.1 Descubrimiento de CRISPR.....	13
2.2.2. Función de CRISPR.....	15
2.2.3. Genes <i>cas</i>	15
2.2.4. Mecanismo de CRISPR/Cas9.....	16
2.2.5. Aplicaciones de la tecnología CRISPR-Cas9	17
2.2.6. Crispr-Cas9 y Terapia Génica en humanos	18
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo general	20
3.2. Objetivos específicos.....	20
4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1. Resultados	21
4.1.1. Introducción.	21
4.1.2. Realización práctica I.....	22
4.1.2.1. Ensayo 1	22
4.1.2.2. Ensayo 2	24
4.1.2.3. Ensayo 3	27
4.1.3. Realización practica II.....	30
4.1.3.1 Desarrollo y citogenética de embriones reparados	30
4.1.3.2. Consecuencias fuera del objetivo en embriones humanos reparados .	31
4.2. Discusión.....	32
5.CONCLUSIONES	36
6. BIBLIOGRAFÍA.....	37

1. RESUMEN

La edición del genoma tiene potencial para la corrección dirigida de mutaciones en la línea germinal. En este trabajo, describimos la Miocardiopatía Hipertrófica, enfermedad causada principalmente por la mutación heterocigota del gen MYBPC3, principal causa patológica de muerte súbita en personas de 20 a 35 años, y exponemos su tratamiento actual. Además, hacemos una revisión del sistema CRISPR, específicamente CRISPR-cas9, un sistema encontrado en distintas bacterias que les confiere inmunidad adaptativa, exponiendo su descubrimiento, evolución y funcionamiento además de sus posibles utilidades en la actualidad y, principalmente su aplicación en terapia génica en humanos.

Por este motivo realizamos una revisión sistemática del estudio *Corrección de la mutación de un gen patogénico en embriones humanos*, en el que observamos la implantación del sistema CRISPR en embriones humanos. Las roturas inducidas por este sistema en el alelo paterno mutante se repararon predominantemente usando el gen homólogo de tipo salvaje en lugar de una plantilla de ADN sintético. Al modular la etapa del ciclo celular en la que se indujo el corte, pudieron evitar el mosaicismo en la escisión de embriones y lograr un alto rendimiento de embriones homocigóticos que portan el gen MYBPC3 de tipo salvaje sin evidencia de mutaciones fuera del objetivo. La eficiencia, precisión y seguridad del enfoque presentado sugieren que tiene potencial para ser utilizado para la corrección de mutaciones hereditarias en embriones humanos. Sin embargo, surgieron detractores de estos resultados, exponiendo que estos estaban causados por grandes deleciones del genoma provocado por CRISPR-Cas9, lo que no permitía la amplificación del gen mutante por PCR, por lo que los homocigotos medidos eran realmente los alelos de tipo silvestre. Queda así reflejada, por tanto, la necesidad de continuar con los estudios.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Miocardiopatía hipertrófica

La miocardiopatía hipertrófica es una enfermedad que se manifiesta, generalmente, como un engrosamiento (hipertrofia) de las paredes del miocardio (Figura 1). Afecta en su mayoría al ventrículo izquierdo, aunque pueden estar afectadas otras zonas, como el septo medial, el ápex, etc.

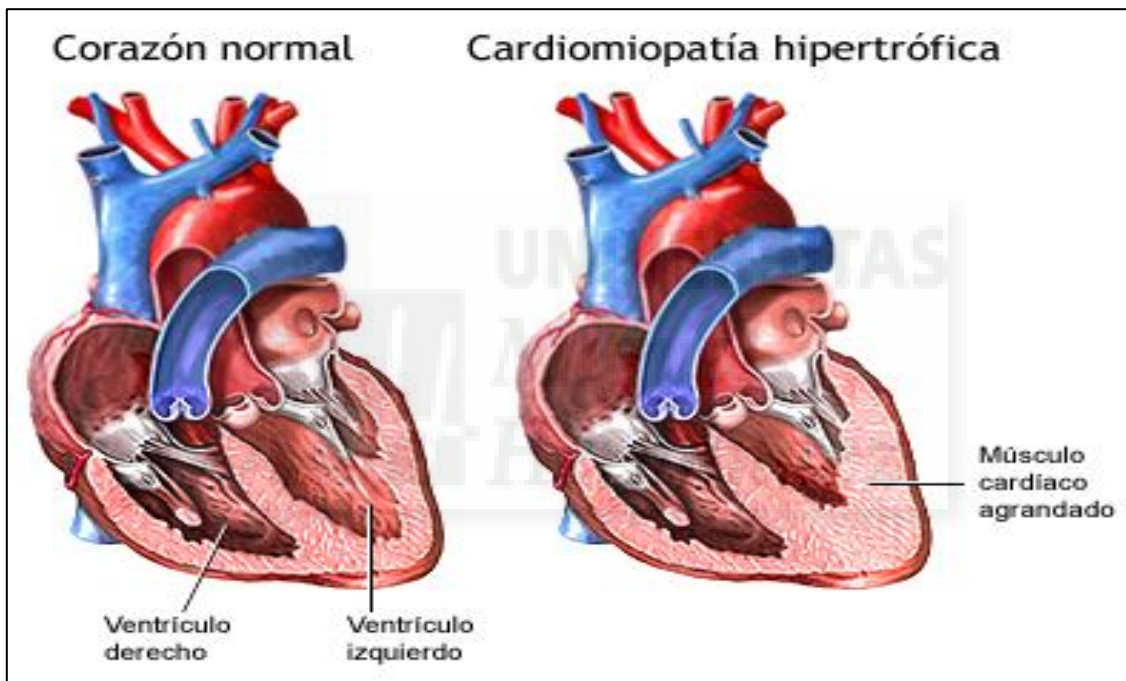


Figura 1. Comparación de un corazón normal con un corazón con cardiomiopatía hipertrófica.

Esta enfermedad puede presentarse generalmente de dos formas bien diferenciadas:

Primaria o forma familiar (MCH). Es la más frecuente. Se debe a la presencia de mutaciones en los genes responsables de diferentes proteínas del músculo del corazón. Su herencia es autosómica dominante y, por tanto, la probabilidad

de que un progenitor heterocigoto trasmite la mutación a cada uno de sus hijos es del 50%.

Secundaria a otras enfermedades. Causadas por enfermedades del metabolismo, neurológicas y endocrinológicas.

2.1.1.-Miocardiopatía Hipertrófica Familiar (MCH).

Debido al alto porcentaje de enfermos que presentan MCH hereditaria, es necesario centrarse, principalmente, en esta forma de la enfermedad, y en las características que presenta.

Se trata de un síndrome con herencia autosómica dominante. La expresión de la enfermedad varía considerablemente, no sólo entre las distintas familias portadoras de una determinada mutación, sino también dentro de una misma familia¹. Así, no es raro que una misma mutación se comporte de manera distinta dependiendo del individuo que la posea, lo que sugiere que la manifestación de la enfermedad puede estar influenciada por condicionantes como el sexo, la edad y factores genéticos (otras mutaciones, polimorfismos, genes modificadores) y ambientales.

Esta enfermedad puede ocasionar principalmente dos cuadros clínicos: MCH obstructiva y MCH no obstructiva.

La **MCH obstructiva** se presenta en la mayoría de las personas con miocardiopatía hipertrófica. En esta forma de la enfermedad, la pared entre los ventrículos se agranda y obstruye el flujo sanguíneo, por lo que el corazón tiene que realizar un mayor esfuerzo para llevar a cabo su función. Alrededor del 70% de las personas con MCH experimentan síntomas obstructivos, y son éstas las que presentan peor pronóstico.

En la **MCH no obstructiva**, no hay una obstrucción significativa del flujo de sangre. Sin embargo, el ventrículo izquierdo tiende a volverse rígido, lo que reduce la cantidad de sangre que puede contener y la cantidad de ésta que se bombea con cada latido del corazón. Esta forma supone alrededor del 30% de las personas que presentan la enfermedad.

Suele aparecer en la adolescencia o en la edad adulta, con una prevalencia de 1 entre 500 y supone la primera causa de muerte súbita entre los menores de 35 años. El 25% de los casos se dan en personas mayores, de las cuales la mitad presentan la forma obstructiva de la enfermedad. En cuanto a la infancia, los casos son más escasos, aunque no inexistentes.

2.1.2.- Síntomas de la MCH

Gran parte de las personas que presentan miocardiopatía hipertrófica no muestran síntomas visibles. En muchas ocasiones, el primer síntoma manifestado es la muerte súbita.

En caso de aparición de otros síntomas, son comunes en la enfermedad:

- Disnea.
- Dolor torácico.
- Fatiga
- Palpitaciones.
- Mareo.
- Pérdida de conocimiento.
- Arritmias.

En general, los síntomas tienden a mantenerse estables durante toda la vida, aunque, en ocasiones, empeoran con el paso del tiempo, dando lugar a complicaciones más graves, como:

Fibrilación auricular.

Muerte cardíaca súbita.

Obstrucciones del flujo sanguíneo.

Miocardiopatía dilatada.

Problemas en la válvula mitral.

Insuficiencia cardíaca.

2.1.3.-Diagnóstico

Debido a la variedad de los síntomas y a la gran cantidad de pacientes que sufren la enfermedad de manera asintomática, el diagnóstico de la enfermedad es difícil. Este diagnóstico suele ser realizado durante un examen o control periódico en la forma no familiar de la enfermedad o en MCH de aquellas familias que no saben que son portadoras de la mutación del gen. En caso de MCH en familias que saben que son portadoras de la mutación del gen, los familiares de primer grado (padres, hijos o hermanos) de una persona con miocardiopatía hipertrófica deberían consultar con sus médicos acerca de la necesidad de hacerse exámenes para la detección de la enfermedad.

Este diagnóstico puede ser realizado a través de varios métodos:

- A. **Electrocardiograma (ECG):** En la MCH, se observan numerosas anormalidades electrocardiográficas. El hallazgo principal en un ECG en pacientes jóvenes con miocardiopatía hipertrófica es la presencia de ondas Q patológicas. Se observan en el 30% de los casos y aparecen por el aumento de las fuerzas eléctricas que se generan en las zonas hipertrofiadas.
- B. **Radiografía de tórax:** Los hallazgos son variables. El tamaño del corazón puede oscilar desde normal a claramente aumentado, pero existe poca correlación entre el tamaño del corazón y la severidad de la enfermedad.
- C. **Ecocardiografía bidimensional:** La Ecocardiografía bidimensional es, hoy en día, la prueba de elección en la evaluación de la MCH, ya que, además de ser la más sensible para su diagnóstico, es también útil para identificar pacientes con hipertrofia localizada en lugares poco usuales o de menos frecuencia. Además, puede aportar otros aspectos de interés clínico, como son la aproximación no invasiva al

tipo de obstrucción y la valoración objetiva de cambios evolutivos o terapéuticos que puedan tener importantes implicaciones en el pronóstico de la enfermedad.

- D. **Exploración física:** Es posible detectar la enfermedad mediante un examen físico debido a que, en ocasiones, se produce un soplo sistólico característico. En este caso, debe ser confirmado el diagnóstico con otra de las pruebas anteriores.

2.1.4.- Tratamiento

Tratamiento farmacológico

El tratamiento de la MCH está dirigido fundamentalmente a aliviar los síntomas de insuficiencia cardíaca y prevención de la muerte súbita.

- **Bloqueantes beta:** Son el tratamiento de elección. Se observa mejoría de la disnea, los mareos y del síncope, junto con disminución de los síntomas obstructivos. Ejemplo: propranolol.
- **Bloqueantes de los canales de calcio:** De segunda elección, cuando fallan los bloqueantes beta. Son utilizados debido a su efecto inotrópico negativo, produciendo una mejoría de los síntomas. Además, producen una relajación ventricular que provoca la mejoría del llenado diastólico y disminución de las presiones de llenado del ventrículo izquierdo. Ejemplo: Verapamilo.
- **Diltiazem y dihidropiridinas:** A pesar de sus efectos de mejoría sobre la función diastólica, deben evitarse en la MCH debido a su notable efecto vasodilatador.

Cabe destacar que no existen estudios concluyentes de que los fármacos anteriores garanticen la prevención de la muerte súbita ni una mejora en la supervivencia del paciente, aunque sí controlan los síntomas.

Tratamiento quirúrgico

Existe un grupo de pacientes que persisten con síntomas severos a pesar de tomar una medicación máxima de los fármacos anteriormente mencionados. En estos pacientes, se recurre a tratamiento quirúrgico:

- **Miectomía septal transaórtica:** También conocida como cirugía de Morrow, se considera actualmente el tratamiento de elección. Se trata de un procedimiento a corazón abierto por el cual se elimina parte del tabique engrosado y agrandado que separa los ventrículos. La eliminación mejora el flujo sanguíneo y reduce la insuficiencia de la válvula mitral.
- **Ablación del tabique.** En la ablación del tabique, se produce un infarto de miocardio controlado mediante la inyección de alcohol a través de un catéter que se coloca en la arteria que irriga la zona. Esta necrosis y posterior fibrosis, disminuye el espesor, mejorando los síntomas de la enfermedad. Las posibles complicaciones de este procedimiento comprenden el bloqueo auriculoventricular que requiere la implantación de un marcapasos y el riesgo que supone el propio infarto miocárdico provocado. Su indicación estaría orientada fundamentalmente a pacientes de edad avanzada, o en aquéllos donde haya una contraindicación para la cirugía cardiaca.
- **Desfibrilador cardioversor implantable.** Se trata de un pequeño dispositivo que controla los latidos del corazón, implantado en el pecho como un marcapasos. Si se produce alguna alteración que podría poner en riesgo la vida del paciente, el desfibrilador administra descargas eléctricas calibradas para restablecer el ritmo cardíaco normal. El uso del desfibrilador se reserva a pacientes con una elevada probabilidad de sufrir muerte súbita por anomalías en el ritmo cardíaco.

Debido a la severidad de la enfermedad y riesgo de muerte súbita en personas jóvenes, además de la falta de una cura (únicamente se controlan los síntomas), y las dificultades que siempre suponen las intervenciones quirúrgicas, se crea la necesidad de seguir investigando. A causa de la gran

cantidad de casos debidos a la herencia familiar, se hace evidente la importancia de la genética para el estudio de las mutaciones génicas que causan la enfermedad y para la búsqueda de una solución terapéutica.

2.1.5.- Bases genéticas de la MCH

La MCH está causada, mayoritariamente, por mutaciones en alguno de los genes que codifican para las proteínas contráctiles del sarcómero, por lo que se define como una enfermedad sarcomérica². El 50-60% de los casos de MCH son debidos a la mutación de uno de estos genes, y de éstos, el 75% están causados por mutaciones en los genes *MYBPC3* o *MYH7* (Tabla 1).

HCM GENE	SYMBOL	CHROMOSOME LOCUS	% OF ALL HCM
Beta-MHC	MYH7	14q12	30-35%
Myosin-binding protein C	MYBPC3	11p11.2	20-30%
Troponin T	TNNT2	1q32	10-15%
Alfa-tropomyosin	TPM1	15q22.1	< 5%
Troponin I	TNNI3	19q13.4	< 5%
Myosin light chains Essential	MYL3	3p21	< 1%
Regulatory	MYL2	12q24.3	<1%
Actin	ACTC	15q14	< 0,5%
Titin	TTN	2q24.3	< 0,5%
Alfa-MHC	MYH6	14q12	< 0,5%

HCM = hypertrophic cardiomyopathy; MHC = myosin heavy chain.

Tabla 1. Genes causantes de la miocardiopatía hipertrófica.

La MCH familiar se relacionó con las mutaciones en el gen *MYBPC3* que codifica la proteína c-MyBPC. Estas mutaciones fueron descritas por primera vez en 1995. Desde entonces se han identificado más de 150 mutaciones en dicho gen.

Aunque existen casos de MCH con ausencia de mutación en los genes que codifican proteínas contráctiles sarcoméricas, son una gran fuente de estudio para intentar suprimir la enfermedad debido al alto porcentaje de enfermos que

genera. Se han valorado estudios en otras proteínas sarcoméricas, pero dichas mutaciones o fenotipos aparecen con muy baja frecuencia.

Un tercio de las mutaciones en el gen *MYBPC3* son sustituciones de un único aminoácido⁴ (mutaciones de cambio de sentido), otra tercera parte son deleciones o inserciones que causan un cambio de pauta en la lectura de codones, y el resto son mutaciones que causan codones *stop* (mutaciones sin sentido) y deleciones o inserciones que no producen cambio de pauta de lectura. A pesar de que está establecida la importancia de este gen en la patología de la enfermedad cardiaca, se sabe poco acerca del mecanismo por el que las mutaciones en *MYBPC3* causan MCH.

2.1.5.1 Proteínas C de unión a la miosina. Isoforma cardiaca

Estructura de la proteína C de unión a la miosina. Isoforma cardiaca

La MyBPC se purificó y caracterizó en 1973. Se encuentra ubicada sobre los filamentos gruesos en bandas discretas separadas entre sí por 43 nm. El número exacto de bandas depende del tipo de músculo. Se engloba dentro de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) intracelulares y está compuesta por dominios repetidos de tipo Ig y de tipo fibronectina (Fn). Existen tres isoformas de proteína C de unión a miosina en el ser humano, codificadas por tres genes distintos: *MYBPC1*, *MYBPC2* y *MYBPC3*. El primero se expresa en el músculo esquelético lento, el segundo en el músculo esquelético rápido y el tercero, el de interés en este trabajo, en el músculo cardíaco

Las tres isoformas de MyBPC (Figura 2) poseen 10 dominios globulares (C1-C10), el motivo *myosin-S2*, que comprende los dominios de tipo Ig C1 y C2, y la región rica en prolina/alanina (PA) antes del dominio C1. Además, la isoforma cardíaca consta de un dominio de tipo Ig adicional en el extremo N-terminal, denominado C0, una región con múltiples sitios de fosforilación (M) dentro del motivo *Myosin-S2*, entre los dominios C1 y C2, y 28 aminoácidos adicionales en el dominio C5. Estos dominios permiten a la MyBPC cardíaca (c-MyBPC) interactuar con otras proteínas sarcoméricas y ejercer diversas

funciones, como la modulación de la movilidad cabeza-cola de la miosina y la estabilización de la estructura del sarcómero.

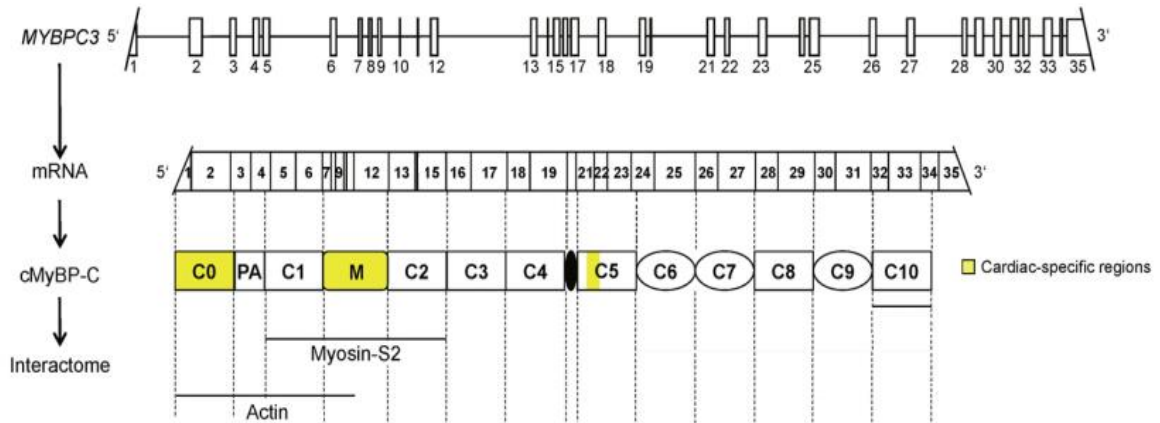


Figura 2. Composición, localización genómica y estructura de cMyBP-C. En amarillo las regiones específicas de esta proteína en comparación con otra MyBP-C.

Funciones de la proteína C de unión a la miosina. Isoforma cardiaca

En un primer momento, se consideró que la MyBPC era una proteína estructural, pero parece que también posee una función reguladora, ya que hay estudios realizados en ratones, únicos animales que también presentan la isoforma cardiaca del gen, en los que la eliminación de la función mediante *knockout* (KO) demuestra que la proteína juega un papel importante en la modulación de la contractilidad muscular.

- Función estructural

La c-MyBPC contribuye significativamente a la integridad estructural y a las propiedades mecánicas del sarcómero. Posee como función principal la formación y estabilidad del filamento grueso⁴, contribuyendo a la resistencia y a mantener la correcta disposición de las cabezas de miosina. También ayuda a la consolidación de la estructura proporcionando una unión mecánica entre los filamentos finos y gruesos.

- Función reguladora

La fosforilación de la c-MyBPC es esencial para el normal funcionamiento del corazón y para la regulación del miocardio. Se desconoce con cuántos sitios de fosforilación cuenta la c-MyBPC, pero niveles adecuados de proteína fosforilada le confieren al individuo propiedades cardioprotectoras, disminuyendo así, hasta en un 60 %, la insuficiencia cardíaca y el daño isquémico. Además, a través de la fosforilación, se modula la función contráctil.

Por otro lado, se ha demostrado⁵ que la falta de c-MyBPC:

- Reduce la sensibilidad al Ca^{2+} , dependiente de la longitud del sarcómero.
- Disminuye significativamente la sensibilidad al Ca^{2+} que produce la proteína quinasa A (PKA).

2.1.5.2. Mutación de *MyBPC3* y fenotipo

En el caso concreto de los portadores de la mutación en el gen *MyBPC3*, la expresión fenotípica de la enfermedad se puede manifestar tanto como una hipertrofia severa a edades tempranas como una forma suave durante la edad adulta

El fenotipo de los pacientes con MCH y mutación en el gen *MyBPC3* puede ser consecuencia de una única mutación o de más de una, ya que pueden existir mutaciones adicionales en este gen o en otros relacionados. Además, en el gen *MyBPC3*, con frecuencia, se identifican mutaciones nuevas que aparecen en una única familia. En estos casos, la asignación de la mutación como causa de enfermedad es difícil si la penetrancia es incompleta.

2.2. CRISPR

2.2.1 Descubrimiento de CRISPR

Todo empezó cuando Francisco Mojica comenzó sus estudios de doctorado en 1989 en la Universidad de Alicante, investigando en *Haloflex mediterranei*, un

microbio archaea (un grupo de microorganismos unicelulares que, al igual que las bacterias, tienen morfología procariota) con extrema tolerancia a la sal. Su director de tesis había comprobado que la concentración de sal del medio de crecimiento parecía afectar la forma en que las enzimas de restricción cortaban el genoma microbiano, y Mojica se propuso caracterizar los fragmentos alterados.

En el primer fragmento de DNA que examinó, Mojica encontró una estructura inesperada: copias múltiples de una secuencia palindrómica repetida de 30 bases, separadas por espaciadores de aproximadamente 36 bases, que no se parecían a ninguna familia de repeticiones conocidas en microbios. Pronto descubrió repeticiones similares en otros microbios del reino de las archaea.

Comprobó la existencia de otros estudios similares en cuanto a este hallazgo y descubrió una publicación de un grupo japonés en el que se mencionaba una secuencia repetida con una estructura similar en *Escherichia coli*, aunque no con la misma secuencia que la de *Haloferax*. Mojica se dio cuenta de que la presencia de tales estructuras similares en ambos microbios debía señalar una función importante en procariotas.

Llamó a dichas repeticiones *short regularly spaced repeats* (SRSRs), en español repeticiones cortas regularmente espaciadas, aunque el nombre de éstas cambiaría más tarde a ***clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)***, en español **repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas**. En los siguientes años, se siguieron encontrando dichas secuencias palindrómicas en microbios diferentes, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium difficile*, y la bacteria de la peste *Yersinia pestis*. Además, se observó la presencia de genes específicos asociados a CRISPR (genes *cas*), situados cerca.

En un principio se propuso que CRISPR estaba involucrado en la regulación de genes, en la división de replicones, en la reparación de DNA, además, de otras funciones. Pero no se consiguió ninguna evidencia de que esto fuera así.

2.2.2. Función de CRISPR

Siguieron los estudios en cuanto a la función de CRISPR, y los investigadores, entre ellos Mojica, se centraron en las secuencias de bases que separaban (espaciadores) las secuencias repetidas. Observaron que muchos de estos espaciadores eran secuencias encontradas en el DNA de bacteriófagos que atacaban a las bacterias, y no sólo eso, sino que las cepas que poseían dichos espaciadores eran inmunes al ataque de estos bacteriófagos.

Por tanto, quedó demostrado que los loci CRISPR contenían las instrucciones para un sistema inmune adaptativo que protege a los microbios contra infecciones específicas. Por otra parte, se comprobó que, además, los microbios son capaces de, tras un primer ataque de un plásmido o fago, interiorizar un fragmento de su DNA, que le conferirá inmunidad sobre este invasor para siguientes ataques⁶.

2.2.3. Genes cas

Los genes asociados a CRISPR, llamados *cas*, son genes situados en lugares próximos al loci de CRISPR. La función de la mayoría de los genes *cas* es la de modificar el fragmento de DNA del virus o plásmido invasor para que pueda ser internalizado como espaciador en el loci CRISPR. Otros, como *cas9*, tienen su función en la inmunidad adaptativa de la bacteria.

Se han hallado muchos genes *cas* diferentes. El sistema actual de clasificación los agrupa en tres tipos principales de sistemas CRISPR-Cas, con *cas3*, *cas9* (anteriormente *csn1*) y *cas10* siendo los genes característicos de los sistemas de tipo I, tipo II y tipo III, respectivamente. Esta clasificación se ha realizado mediante la identificación de varios elementos distintivos en la organización genómica de dichos sistemas. Los genes *cas1* y *cas2* suelen formar parte de todos los sistemas CRISPR-Cas. Se pueden encontrar distintas formas de estos sistemas en un mismo individuo sugiriendo que son compatibles e incluso podrían compartir elementos.

De estos tres tipos principales nos centraremos en el tipo II y su gen *cas* característico, el *cas9*.

2.2.4. Mecanismo de CRISPR/Cas9

Todos los sistemas de tipo II CRISPR-Cas contienen, además de *cas9* como gen principal, el par de genes *cas1* y *cas2* que se requieren para la adquisición del espaciador a partir del DNA del organismo invasor. Este grupo se subdivide a su vez en tres subtipos con características similares, pero que se diferencian en algunos de sus componentes.

El gen *cas9* codifica una nucleasa, la enzima Cas9, con dos sitios de corte activos en el DNA (HNH y RuvC), uno para cada hebra de la doble hélice. Gracias a esta actividad, es capaz de provocar la degradación del DNA del agente invasor, otorgando así inmunidad a la bacteria.

En la Figura 3, se describe paso a paso el funcionamiento del complejo CRISPR/Cas9 de tipo II.

- En 5A, se observa la estructura, que contiene una matriz CRISPR, cuatro genes que codifican proteínas (*cas9*, *cas1*, *cas2* y *csn2*) y un gen para el *tracrRNA*. La matriz CRISPR contiene regiones repetidas (diamantes negros) separadas por regiones espaciadoras derivadas de fagos y otros elementos genéticos invasores (rectángulos coloreados).
- En 5B, se produce la transcripción de la matriz CRISPR y el *tracrRNA*, dando lugar a un pre-crRNA largo y un *tracrRNA*.
- En 5C, estos dos RNA hibridan a través de secuencias complementarias y se procesan a formas más cortas, con la ayuda de Cas9 y la RNasa III. Las secuencias repetidas de la matriz CRISPR son las encargadas de la asociación con el *tracrRNA*, dando lugar a su estructura característica.
- En 5D, el complejo resultante (Cas9 + *tracrRNA* + crRNA) comienza a buscar las secuencias de DNA complementarias a la secuencia del espaciador, que se muestra en rojo. El reconocimiento de la diana

también requiere la presencia de un **protospacer adjacent motif** (sitio PAM), en azul en la imagen, compuesto por dos nucleótidos de guanina y otro nucleótido cualquiera, que participa en una mejor unión.

- En 5E, una vez se ha unido Cas9 a la diana, tras la hibridación de ésta con el crRNA, la enzima corta el DNA en ambas hebras 3 pb por delante del sitio PAM.

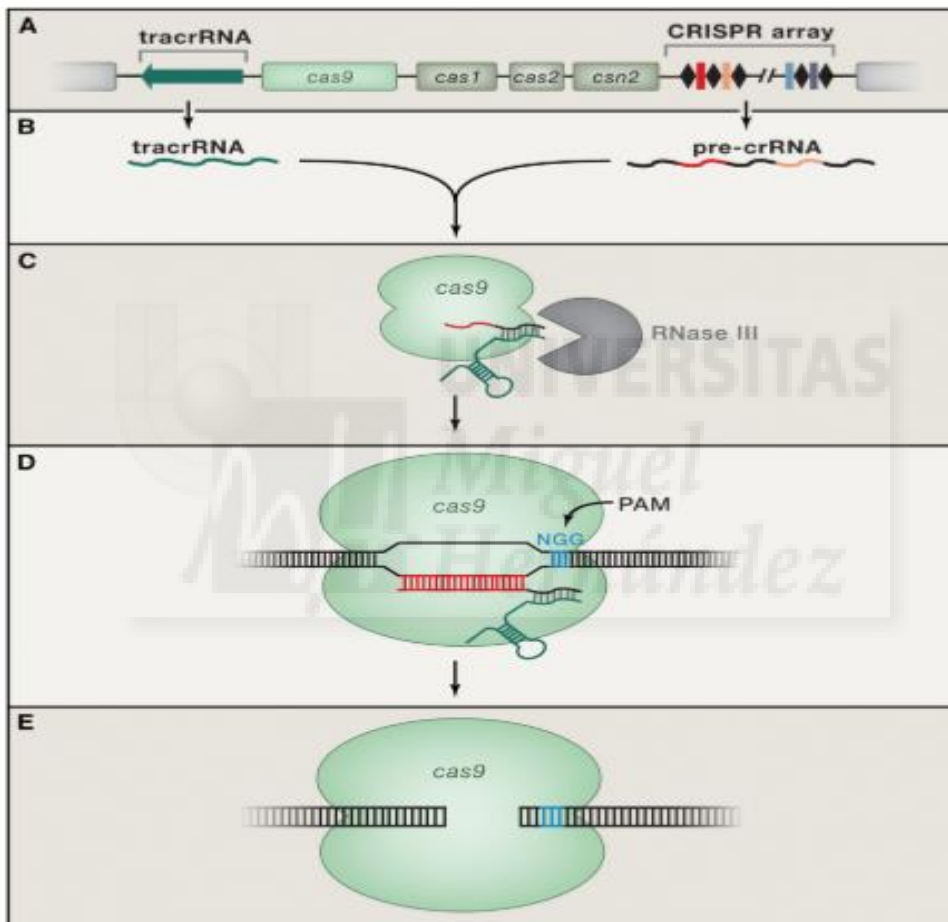


Figura 3. Etapas del mecanismo de CRISPR.

2.2.5. Aplicaciones de la tecnología CRISPR-Cas9

Desde que se ha descubierto el funcionamiento de CRISPR-Cas9, se han realizado miles de estudios y propuestas de posibles aplicaciones beneficiosas de este sistema.

Inicialmente, se tomó como principal objeto de estudio a las bacterias, ya que es donde se había descubierto, siendo utilizado para la identificación de cepas o tipado. Pero rápidamente se procedió a la realización de estudios de su aplicación en organismos más complejos.

Se han determinado utilidades en **Agricultura**, otorgando a los cultivos resistencias específicas, en **Alimentación**, consiguiendo así evitar ciertas alergias, pero la tecnología CRISPR tiene, como principal función, su uso en **Terapia Génica en humanos**.

2.2.6. Crispr-Cas9 y Terapia Génica en humanos

Las nuevas técnicas han supuesto una mejora en el tratamiento y prevención de muchas enfermedades de alto impacto en la sociedad actual. Gracias a éstas, los investigadores pueden editar o modular directamente la función de las secuencias de DNA en su contexto endógeno, en casi cualquier organismo que se propongan, lo que les ha permitido identificar las variaciones genéticas causales de estas enfermedades. En resumen, la terapia génica se refiere al proceso de hacer modificaciones dirigidas al genoma, sus contextos (por ejemplo, marcas epigenéticas), o sus resultados (por ejemplo, transcripciones).

Los genomas eucariotas contienen miles de millones de bases de DNA y son difíciles de manipular. Uno de los avances en la manipulación de los genomas ha sido el desarrollo de modificaciones en los genes por recombinación homóloga (HDR), en la que se introducen plantillas de reparación exógenas que poseen homología con las secuencias a reparar. Una serie de estudios⁷ llevaron a la conclusión de que las roturas de doble cadena de DNA pueden ser utilizadas para la edición de los genomas mediante HDR. Estos estudios también habían demostrado que, en ausencia de una plantilla de reparación por homología, se inducen inserciones o deleciones (indels) por reparación por unión de extremos no mediada por homología (NHEJ) (Figura 4).

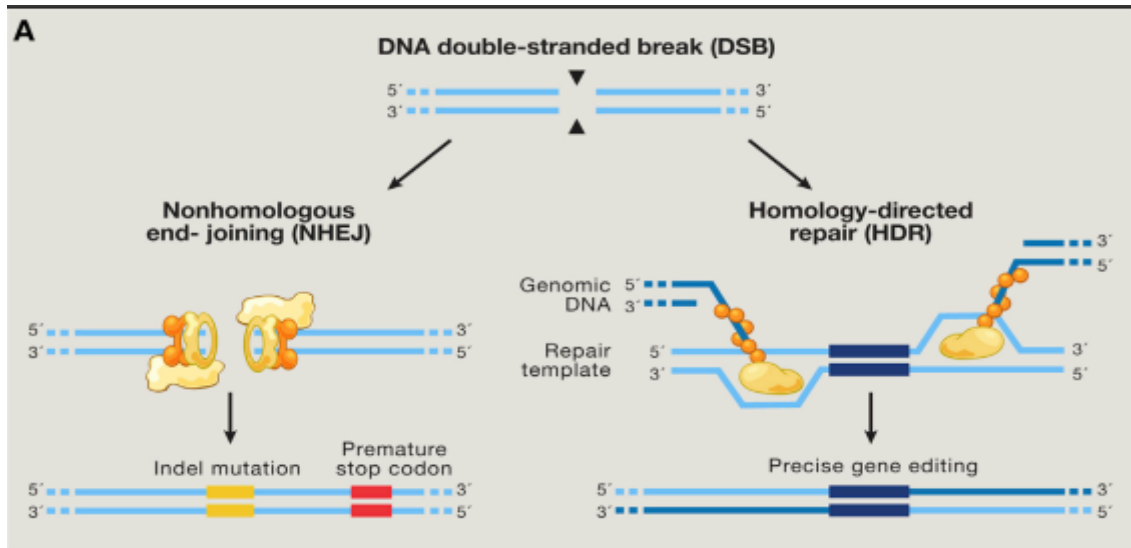


Figura 4. Imagen de las 2 posibles posibilidades de reparación de las roturas de doble cadena en el DNA. A la derecha, **reparación por HDR** (útil para la edición génica) y en la izquierda, **reparación por NHEJ** que introduce indels que dan lugar a codones de parada prematuros.

La nucleasa Cas9 está dirigida por una cadena corta de ARN, que reconoce el ADN diana, mediante emparejamiento de bases, siendo el elemento fundamental para la especificidad de CRISPR-Cas9, además de la presencia de un sitio PAM cercano a esta región. Esta secuencia, que suele ser la complementaria a una parte del bacteriófago invasor, puede ser fácilmente reemplazada por una secuencia de interés para reorientar la nucleasa Cas9 hacia la secuencia de un gen de interés para la generación de roturas de doble cadena que son posteriormente reparadas. Esta característica, combinada con su gran especificidad, ha convertido a CRISPR-Cas9 en el sistema más prometedor de todos los existentes.

Como mayor desventaja del uso de CRISPR-Cas9, encontramos los altos niveles de reparación del DNA no mediada por homología (NHEJ). Esto da lugar a la introducción de indels, que cambian la pauta de lectura incrementando la probabilidad de que se formen tripletes de bases que codifiquen para un codón de stop, lo que suele ser muy perjudicial para la función de los genes.

Para minimizar este problema e incrementar la especificidad, los dominios nucleasa de Cas9 pueden ser mutados independientemente el uno del otro, bloqueando la actividad de HNH o RuvC, lo que convierte la enzima en una nucleasa de DNA capaz de introducir un corte en sólo una de las hebras del DNA⁸.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo es realizar una revisión del estudio **Corrección de la mutación de un gen patogénico en embriones humanos**, exponiendo y explicando resultados y alternativas a las conclusiones obtenidas, aportando como antecedentes los genes implicados y la tecnología aplicada en él.

3.2. Objetivos específicos

- Definir la Miocardiopatía Periférica, describiendo sus síntomas y posibles alternativas terapéuticas y dar una explicación de la necesidad de encontrar una forma de remediarla.
- Relacionar la enfermedad con los genes que están implicados en su aparición y describir las posibles mutaciones que aparecen en estos con más frecuencia.
- Definir el sistema CRISPR, específicamente CRISPR-Cas9, tanto en su forma natural en bacterias como su posible aplicación para el tratamiento en terapia génica.
- Sintetizar la información, tanto teórica como práctica, hallada en el estudio principal, y exponerla de una forma clara y concisa.
- Discutir los resultados obtenidos, aportando datos hallados en otros estudios, exponiendo posibilidades alternativas para una correcta interpretación de éstos.

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Introducción.

El artículo *Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos* (en español, **Corrección de la mutación de un gen patogénico en embriones humanos**)⁹, se centra en la corrección de una mutación autosómica dominante en el gen *MYBPC3*, cuya herencia en una única copia provoca síntomas clínicos de MCH.

Una posibilidad para prevenirla transmisión de segunda generación es el diagnóstico genético preimplantacional (DGP), que implica el análisis del DNA de los embriones obtenidos tras fertilización *in vitro* (FIV) para seleccionarlos que no llevan la mutación. Cuando sólo uno de los padres lleva una mutación en heterocigosis, el 50% de los embriones debe estar libre de mutación y disponible para la transferencia, mientras que los embriones portadores restantes se descartan. Según los autores del artículo, la corrección genética permitiría el rescate de embriones mutantes, aumentando la cantidad de embriones disponibles para la transferencia, lo que, en última instancia, mejoraría las tasas de embarazo.

En particular, CRISPR-Cas9 es una herramienta versátil para reconocer secuencias genómicas específicas e inducir cortes de doble hebra. A continuación, estos cortes se resuelven principalmente mediante mecanismos de reparación de DNA endógenos, usando principalmente una vía de unión de extremos no homólogos (NHEJ). Obviamente, NHEJ es inapropiado para aplicaciones de corrección de genes, porque introduce mutaciones adicionales en la forma de inserciones o deleciones, comúnmente denominadas indels. En algunos casos, sin embargo, las células diana activan una vía de reparación de ADN alternativa, llamada reparación dirigida por homología (HDR), que utiliza

como plantilla el cromosoma homólogo no mutante o una molécula de DNA exógeno suministrada, lo que lleva a la corrección del alelo mutante.

Aunque las mutaciones homocigotas hubieran sido más deseables para la corrección de genes, la generación de embriones humanos homocigotos con fines de investigación es prácticamente imposible. Las mutaciones homocigotas de *MYBPC3* en adultos son extremadamente raras debido a la gravedad de los síntomas clínicos y la aparición temprana de la enfermedad. Así, el trabajo refiere específicamente a la mutación *MYBPC3*^{ΔGAGT}, una delección de cuatro pares de bases (pb) en el gen *MYBPC3*. Esta es introducida en cigotos humanos por los espermatozoides de un varón portador heterocigoto, mientras que los ovocitos obtenidos de mujeres sanas proporcionaron únicamente el alelo normal silvestre. Por tanto, por vía materna se transfiere sólo el alelo silvestre, mientras que por vía paterna se transfiere con igual probabilidad (50%) el alelo silvestre y el alelo mutante.

4.1.2. Realización práctica I

En este artículo, se exponen tres ensayos con sus resultados sobre la viabilidad y capacidad de CRISPR-Cas9 para su utilización en la terapia génica y, en particular, para determinar si puede emplearse para eliminar la mutación en el gen *MYBPC3*, causante de la MCH.

4.1.2.1. Ensayo 1

Se generaron células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) mediante la utilización de fibroblastos de un paciente de sexo masculino adulto con MCH familiar bien documentada, causada por la delección *MYBPC3*^{ΔGAGT}, dominante en heterocigosis. Por otro lado, se diseñaron dos construcciones de RNA de guía única (sgRNA), que poseen directamente la conformación necesaria para la actuación de CRISPR-Cas9, dirigidas específicamente a la delección *MYBPC3*^{ΔGAGT}, junto con dos plantillas exógenas de oligodesoxinucleótidos de

cadena única (ssODN), con homología a la región seleccionada para que sean utilizadas como molde de la reparación de la delección a través de la vía HDR. Para diferenciar las secuencias de los ssODN de la del alelo silvestre, se introdujeron dos sustituciones sinónimas de un único nucleótido en cada plantilla de ssODN. Por tanto, se utilizó por una parte un sistema CRISPR-Cas9-1 junto con ssODN1 y, por otra parte, otro sistema CRISPR-Cas9-2 junto con ssODN2. Además de los ssODN, estos dos sistemas CRISPR-Cas9 se diferencian entre sí en el número de pares de bases de los sgRNA que poseen homología con el DNA diana, 19 pb para el sistema CRISPR-Cas9-1 y 20 pb para el CRISPR-Cas9-2 (Figura 5). Cada experimento de transfección implicó la introducción en las iPSCs de un plásmido para expresar un sgRNA, otro plásmido con el gen que codifica la proteína Cas9 y un ssODN.

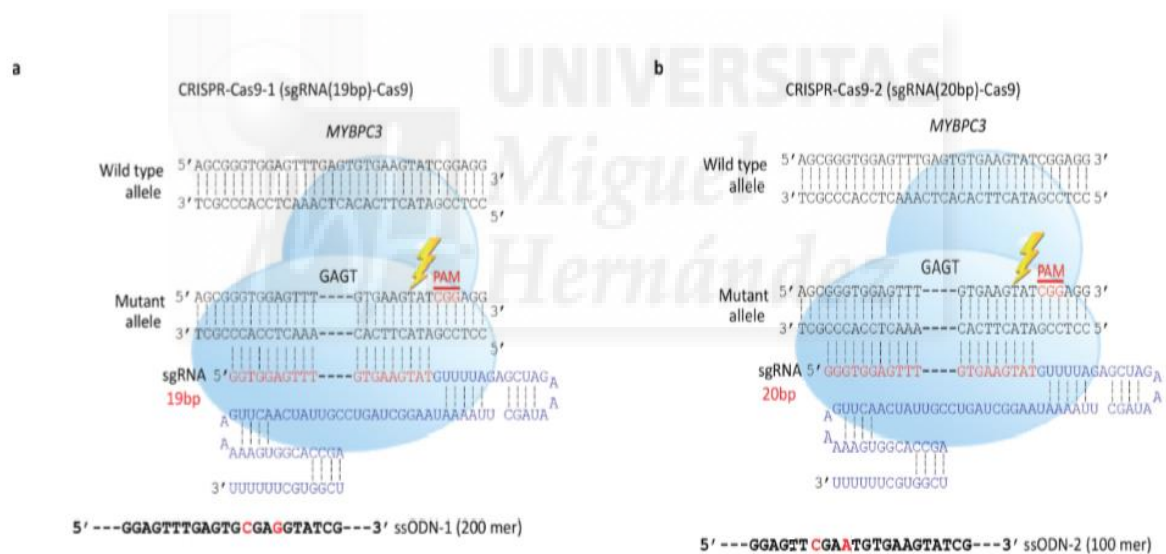


Figura 5. Estructura y diferencias de las construcciones utilizadas. Se muestran las secuencias de los alelos silvestre y mutante del varón heterocigoto. El sgRNA aúna en una única molécula las propiedades del crRNA y del tracrRNA del sistema CRISPR-Cas9. a) Unión del sgRNA mediante homología por reconocimiento de 19 pb (CRISPR-Cas9-1) y estructura de ssODN-1. b) Unión del sgRNA mediante homología por reconocimiento de 20 pb (CRISPR-Cas9-2) y estructura de ssODN-2. Los nucleótidos en color rojo de los ssODN indican los cambios sinónimos respecto al alelo silvestre aportado por los progenitores. También se indica en rojo el *protospacer adjacent motif* (PAM), necesario para la acción de CRISPR-Cas9.

De 61 clones iPSC transfectados, 44 (72.1%) no fueron corregidos, ya que no sufrieron ningún cambio. De los 17 restantes, 10 (58,8 %) fueron reparados por NHEJ y contenían varios indels adyacentes al sitio de la mutación. Los 7 clones restantes (41,2%) fueron reparados por HDR usando ssODN-1 como molde. Así, la eficacia total de actuación para CRISPR-Cas9-1 fue del 27,9% (17/61), y el 41.2% (7/17) de los corregidos fueron reparados por HDR (Tabla 2).

La eficacia de la modificación con CRISPR-Cas9-2 fue del 13.1% (23/175) y sólo el 13% de éstos (3/23) fueron reparados por HDR. De esos 3 clones, 2 fueron reparados usando el oligonucleótido ssODN-2 mientras que el tercer clon fue reparado usando como molde el alelo silvestre aportado por la madre.

Tipo de CRISPR-cas9	Clones analizados	Clones corregidos	Clones corregidos por NHEJ	Clones corregidos por HDR usando ssODN	Clones corregidos por HDR usando alelo silvestre	Eficiencia de HDR
1	61	17(27,9%)	10(58,8%)	7	0	41,2% (7/17)
2	175	23(13,1%)	20(86,9%)	2	1	13%(3/23)

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos en el ensayo.

Estos resultados indican una alta especificidad de los sgRNA, ya que ningún alelo silvestre sufrió modificación alguna. Además, se observa que CRISPR-Cas9-1 posee un mayor porcentaje de reparaciones por HDR que CRISPR-Cas9-2, mostrándose más útil para el objetivo de ser utilizado en terapia génica, por lo que será el sistema utilizado en los siguientes ensayos.

4.1.2.2. Ensayo 2

Este ensayo se realizó en cigotos humanos producidos mediante la fertilización de ovocitos portadores del alelo silvestre con espermatozoides del varón

heterocigoto para la mutación $MYBPC3^{\Delta GAGT}$, de manera que cabe esperar que la mitad de los cigotos heredaran el alelo silvestre paterno y la otra mitad el alelo mutante. Se llevó a cabo una microinyección de una mezcla conteniendo el sgRNA, la proteína Cas9 y una cadena molde ssODN en el citoplasma de cigotos en fase S, 18 h después de la fertilización (Figura 6). Los cigotos inyectados y los controles intactos (no inyectados) se cultivaron durante 3 días, y se procedió al aislamiento y análisis de cada blastómero embrionario individual por secuenciación.

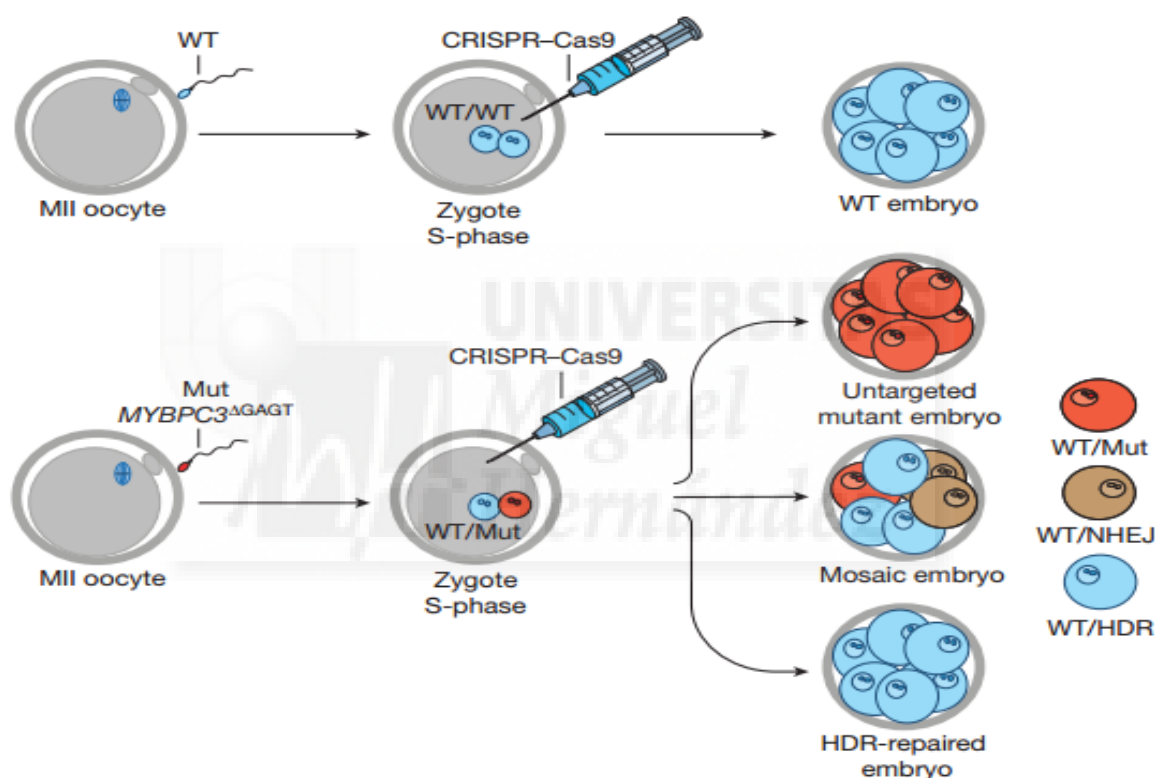


Figura 6. Esquema de la realización del ensayo.

La secuenciación de 83 blastómeros individuales obtenidos de 19 embriones control, procedentes de cigotos no inyectados, mostró que 9 (47.4%) eran homocigotos silvestres ($MYBPC3^{WT/WT}$) y 10 (52.6%) heterocigotos, portadores del alelo materno silvestre y el alelo paterno mutante ($MYBPC3^{WT/\Delta GAGT}$) (Figura 7A). Esta distribución era la esperada (50% de cada tipo) y demuestra que la muestra de espermatozoides contenía el mismo número de espermatozoides silvestres y mutantes con motilidad y eficacia de fertilización similares.

Entre 54 embriones inyectados con CRISPR-Cas9, 36 (66,7%) fueron homocigotos para el alelo silvestre, por lo que cada blastómero era genóticamente *MYBPC3^{WT/WT}*. De los 18 restantes (33,3%), 5 fueron heterocigotos completos, en los que cada uno de sus blastómeros era genóticamente *MYBPC3^{WT/ΔGAGT}*, y 13 mostraron mosaicismo, es decir, poseían más de un genotipo en sus blastómeros. De estos embriones mosaico, todos poseían al menos un blastómero heterocigótico con el alelo silvestre y el alelo mutante con la deleción, genotipo *MYBPC3^{WT/ΔGAGT}*, o con el alelo silvestre y con un alelo portador de un indel característico de NHEJ, genotipo *MYBPC3^{WT/NHEJ}*, lo que sugiere que estos embriones se originaron a partir de cigotos heterocigotos (Figura 7 A, B, C).

Por tanto, de los 18 embriones procedentes de cigotos heterocigotos, CRISPR-Cas9 había actuado en 13 de ellos (72,2%), porcentaje mucho más alto que en el ensayo anterior con iPSCs (27,9%) (Figura 7D), explicado porque la microinyección en los cigotos es una técnica mucho más eficaz que la transfección de iPSCs. Además, se observa que de los 55 blastómeros de los 13 embriones sobre los que actuó CRISPR-Cas9, 35 (66,3%) fueron reparados mediante HDR, aunque utilizando, inesperadamente, como molde el alelo silvestre materno, no encontrándose ninguno que tomara como molde el ssODN (Figura 7D). De hecho, se produjo corrección mediante HDR en 7 de los embriones sin necesidad de añadir el ssODN (Figura 7B).

Los cálculos anteriores están realizados teniendo en cuenta sólo los embriones mosaicos. No obstante, también cabe la posibilidad de que todos los blastómeros individuales de un embrión hayan reparado la deleción *MYBPC3^{ΔGAGT}* por HDR utilizando el alelo materno de tipo silvestre como molde (*MYBPC3^{WT/HDR}*), siendo éstos indistinguibles de los embriones procedentes de cigotos que han recibido el alelo silvestre de ambos progenitores y, por tanto, incluidos en el grupo de homocigóticos silvestres. Estos datos se reafirman al comprobar el aumento de homocigotos silvestres en los embriones inyectados (66,7%) respecto a los controles (47,4 %) (Figura 7A).

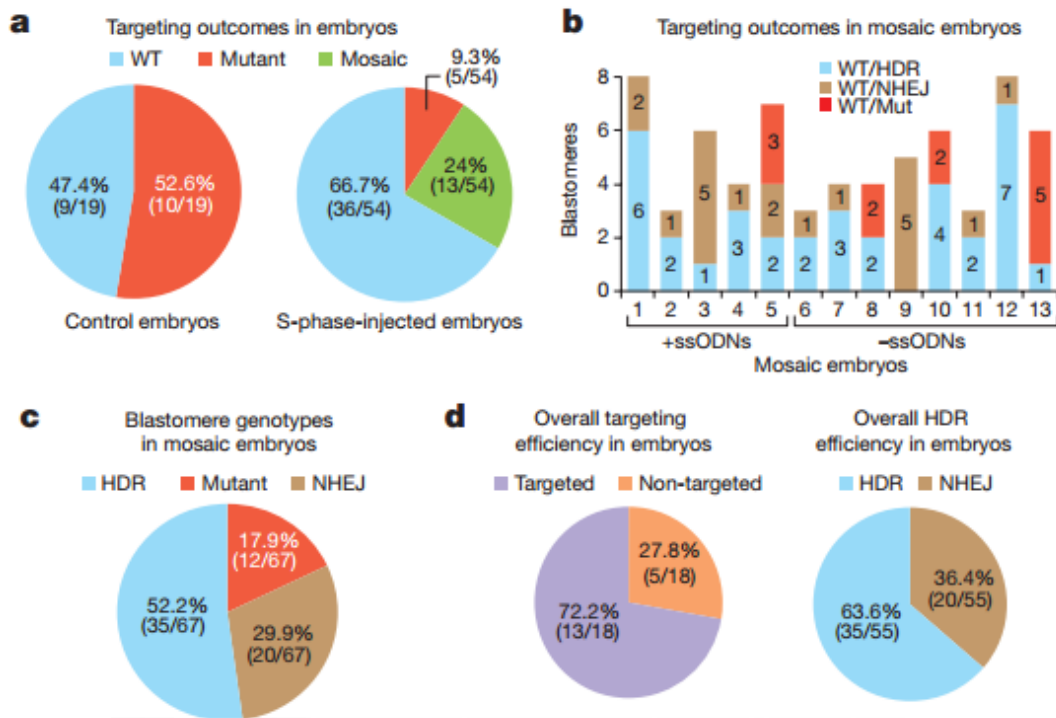


Figura 7. Exposición de los resultados obtenidos en el ensayo 2. a) Diferencias obtenidas en el genotipo entre los embriones control y los embriones inyectados con CRISPR-Cas9. b) Estructura y genotipos de los blastómeros en los embriones mosaico. c) Comparación del número de blastómeros mutantes, blastómeros reparados por HDR y blastómeros reparados por NHEJ en los embriones mosaico. d) Cantidad de embriones mutantes en los que CRISPR-Cas9 actúa y comparación del porcentaje de reparaciones realizadas de las dos formas posibles (HDR y NHEJ)

La comparación de los resultados de ambos ensayos sugiere que los embriones humanos emplean mecanismos de reparación del DNA distintos a los de las células somáticas o pluripotentes, probablemente reflejando requisitos evolutivos para un control riguroso sobre la fidelidad del genoma en la línea germinal.

4.1.2.3. Ensayo 3

Cabe destacar que la obtención de embriones mosaicos no es un resultado deseable, ya que estos embriones no son válidos para la aplicación clínica. Se estudió entonces el motivo de la aparición de este tipo de embriones y la forma de evitarla.

La mayoría de los embriones mosaico del estudio anterior (11 de 13) sólo poseían dos genotipos $MYBPC3^{WT/HDR}$ y $MYBPC3^{WT/NHEJ}$, o $MYBPC3^{WT/HDR}$ y $MYBPC3^{WT/\Delta GAGT}$, lo que sugiere que en el momento de actuación de CRISPR-Cas9 ya había dos copias del alelo mutante (Figura 8A). Hay dos posibles explicaciones para este resultado:

- 1) en el momento de la inyección, el cigoto había completado la replicación de su DNA y ya había producido dos alelos mutantes;
- 2) CRISPR-Cas9 se mantuvo activo después de la división del cigoto, actuando en estadios posteriores en los que ya hay dos alelos mutantes.

La solución a ambas alternativas, según el artículo, es realizar la co-inyección del espermatozoide junto con el CRISPR-Cas9 en el ovocito en fase MII, permitiendo la edición del genoma cuando el pronúcleo masculino todavía contiene, con total seguridad, una sola copia del alelo mutante (Figura 10A).

Por lo tanto, CRISPR-Cas9 se mezcló con la suspensión de espermatozoides y se co-inyectó en ovocitos en esta fase. Tal y como se realizó en el ensayo anterior, 3 días después de la fertilización se procedió al aislamiento y análisis de cada blastómero embrionario individual por secuenciación. El resultado fue que todos los blastómeros de 16 embriones de 58 inyectados fueron inequívocamente heterocigotos con genotipo $MYBPC3^{WT/NHEJ}$. Los 42 embriones restantes (72.4%) presentaron blastómeros homocigotos silvestres, $MYBPC3^{WT/WT}$ (Figura 8B). De éstos, 41 eran embriones homocigóticos uniformes que consistían en blastómeros $MYBPC3^{WT/WT}$ portadores de alelos silvestres indistinguibles. El embrión restante poseía 7 blastómeros homocigotos silvestres, 4 de genotipo $MYBPC3^{WT/WT}$, pero reparados por HDR mediante el ssODN, y 3 también homocigóticos con alelos silvestres indistinguibles, lo que sugiere reparación mediante HDR empleando el alelo silvestre materno como molde. No se detectaron blastómeros heterocigóticos con alelos mutantes $MYBPC3^{\Delta GAGT}$, lo que indica un 100% de eficacia en la actuación de CRISPR-Cas9, mucho mayor que la del ensayo anterior (72,2%). Además, sólo uno de los embriones poseyó más de un genotipo en sus

blastómeros, lo que indica una marcada reducción del mosaicismo en embriones inyectados en fase MII. El único embrión mosaico posee todos los blastómeros reparados por HDR, por lo que podría ser elegible para la transferencia.

Cabe destacar el aumento obtenido en el porcentaje de embriones silvestres $MYBPC3^{WT/WT}$, 72,4%, respecto al 47,4% observado en los controles (Figura 10C). Este incremento es el más alto de todos los ensayos, frente al 66,7% obtenido tras la inyección de cigotos en fase S. Se observa corrección mediante HDR empleando como molde el alelo silvestre materno, tanto si se co-inyecta ssODN como si no (Figura 8D). Teniendo en cuenta que, dada la transmisión de los alelos silvestre y mutante a través del espermatozoides, del 50% para cada uno de ellos, cabe esperar que la mitad de las fecundaciones den lugar a cigotos homocigotos silvestres, $MYBPC3^{WT/WT}$, y la otra mitad a cigotos heterocigotos $MYBPC3^{WT/\Delta GAGT}$, restando un 50% al 72,4% obtenido en el ensayo de co-inyección en ovocitos MII y al 66,7% logrado en la inyección en cigotos en fase S, se obtiene una eficacia hipotética de obtención de embriones silvestres del 22,4% en el primer caso y del 16,7% en el segundo (Figura 8E).

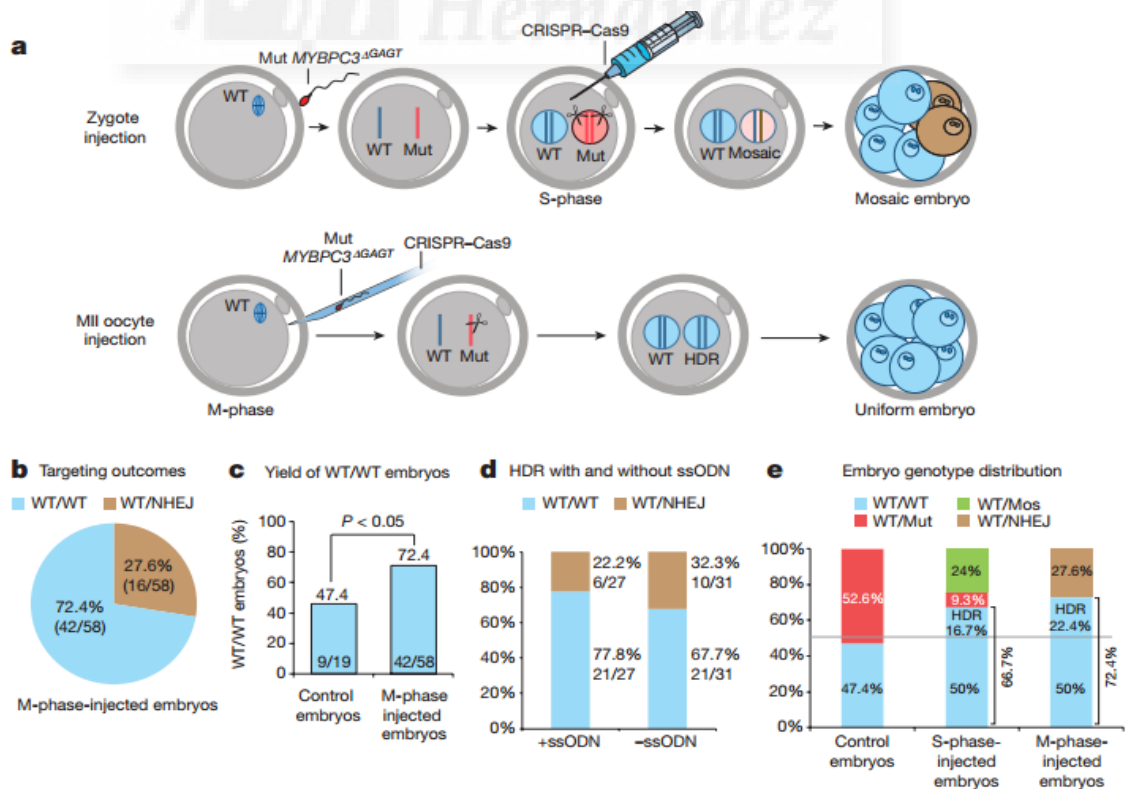


Figura 8. Exposición de los resultados obtenidos en el ensayo 3. a) Esquema de la realización de los ensayos 2 (inyección de CRISPR-Cas9 en fase S) y 3 (inyección de CRISPR-Cas9 en fase MII). b) Genotipos y porcentaje de éstos en los embriones estudiados. c) Diferencia de embriones homocigotos silvestres obtenidos en el grupo control y en embriones co-inyectados en fase MII. d) Proporción genotípica de embriones obtenidos introduciendo el oligonucleótido ssODN y sin introducirlo. e) Comparación de la distribución genotípica de los embriones control, los embriones inyectados en fase S (ensayo 2) y los embriones co-inyectados en fase M (ensayo 3).

En resumen, la administración de CRISPR-Cas9 en ovocitos en fase MII proporciona una acción más eficaz de esta herramienta y una mayor proporción de reparación por HDR, al tiempo que elimina el mosaicismo.

4.1.3. Realización practica II

Debido a los buenos resultados obtenidos, se llevaron a cabo otros dos ensayos, tomando como base los anteriores, en los cuales se observaron la progresión de los embriones modificados y la presencia o ausencia de alteración en otros lugares del genoma.

4.1.3.1 Desarrollo y citogenética de embriones reparados

Para realizar este ensayo, se procedió al cultivo de embriones inyectados con CRISPR-Cas9, observándose su desarrollo. De forma similar a los controles intactos, el 72,7% (16/22) de los embriones inyectados en fase MII se desarrolló hasta la etapa de ocho células y el 50.0% (11/22) progresó a blastocistos. Además, para realizar un análisis más exhaustivo y disponer de material suficiente para realizar observaciones citogenéticas, se obtuvieron seis líneas celulares a partir de estos blastocistos y una línea de un blastocisto control. El análisis de estas líneas reveló que cuatro líneas tratadas con CRISPR-Cas9 (ES-WT1, ES-WT2, ES-WT3 y ES-WT4) y una línea control (ES-C1) eran genotípicamente MYBPC3^{WT/WT} mientras que las dos líneas celulares restantes, inyectadas con CRISPR-Cas9 (ES-Mut1 y ES-Mut2)

eran $MYBPC3^{WT/NHEJ}$. No se detectó ningún cambio significativo con los embriones del grupo control.

Estos resultados siguen poniendo de manifiesto la alta eficacia de actuación de CRISPR-Cas9 en embriones humanos inyectados en fase MII, además de demostrar, que los embriones humanos tratados con CRISPR-Cas9 muestran un desarrollo normal a blastocistos. La realización de cariotipos con bandeo G revela, además, que no se producen anomalías citogenéticas.

4.1.3.2. Consecuencias fuera del objetivo en embriones humanos reparados

Un problema de seguridad con respecto a la aplicación clínica de la corrección del gen en embriones humanos mediante la utilización de CRISPR-Cas9 es que éste puede inducir mutaciones no deseadas fuera del objetivo, en regiones del genoma con alta homología a la secuencia diana. Para comprobar la magnitud de este problema, se realizó un análisis por secuenciación del genoma completo del DNA del varón heterocigoto.

Tras el análisis, se identificaron 16 posibles sitios fuera de la secuencia diana con elevada homología al alelo mutante $MYBPC3^{\Delta GAGT}$ y 7 sitios adicionales, de menor homología, pero posibles lugares de corte de CRISPR-Cas9.

A continuación, se secuenciaron y analizaron estos sitios en cada blastómero de dos embriones control no tratados, dos embriones mosaicos y uno homocigótico silvestre derivado de cigotos inyectados en fase S, y dos embriones, uno homocigoto silvestre y otro heterocigoto $MYBPC3^{WT/\Delta GAGT}$, inyectados en fase MII. No se detectó ninguna modificación fuera del locus diana en ninguno de los 28 blastómeros seleccionados. La utilización de otras técnicas de secuenciación no mostró tampoco modificaciones fuera de la secuencia diana. Por tanto, en resumen, se demuestra la alta especificidad de CRISPR-Cas9 y su seguridad en cuanto a la no producción de alteraciones en otras regiones del genoma.

En conclusión, tras todos estos ensayos realizados, se puede concluir que la terapia génica con CRISPR -Cas9 tiene un gran futuro por delante, ya que posee una notable eficacia de acción y una elevada frecuencia de HDR. Sin embargo, debido a la posibilidad de reparación por NHEJ (reparación no deseada), la edición del genoma realizada mediante esta técnica debe optimizarse aún más antes de que pueda considerarse su aplicación clínica.

4.2. Discusión

La elevada eficacia de corrección hacia el alelo silvestre mediante HDR obtenida en este artículo no dejó a nadie indiferente. Rápidamente, medios de todo tipo, tanto físicos como electrónicos, se hicieron eco del documento y de los posibles beneficios que éste podría tener en la sociedad, ya que suponía un gran avance para la resolución de muchas enfermedades con un componente hereditario de tipo dominante y daba esperanzas a parejas con el deseo de tener hijos propios.

Sin embargo, con el paso del tiempo, varios grupos de investigación expertos en la materia han puesto en duda los resultados obtenidos¹⁰. Estas dudas se fundamentan en los siguientes hechos:

- **La forma en la que se demuestra la corrección no es, según estos profesionales, la correcta.** El estudio se basa en demostrar la ausencia del alelo mutante de partida, heredado del varón heterocigoto, una vez el embrión ha sido tratado con CRISPR-Cas9. Sin embargo, lo que debería de comprobarse es si ha habido una verdadera corrección de la mutación. En el artículo, se menciona que el análisis de los embriones se realiza por secuenciación, tras amplificación por PCR de la región implicada, pero los autores no indican si su estrategia permitía detectar la incorporación de la secuencia silvestre del cromosoma materno en la rotura inducida en el homólogo paterno.
- **El gran aumento obtenido en el porcentaje de embriones que se reparan mediante HDR respecto a otros trabajos.** Existen muchos

estudios, tanto en animales (ratones principalmente) como en humanos, en los que se demuestra que CRISPR-Cas9 tiene preferencia por la reparación no homóloga de la rotura, por lo que, aunque un aumento de la reparación homóloga es posible, se considera un porcentaje demasiado alto.

- El hecho más significativo por el que estos profesionales difieren de los investigadores que realizaron el estudio y rechazan, en su mayoría, los resultados obtenidos, es **la corrección de la rotura usando como molde el alelo silvestre del cromosoma materno**. Sugieren que, en los momentos de la inyección del sistema CRISPR-Cas9, tanto en fase S (ensayo 2) como en fase M (ensayo 3), los cromosomas provenientes de ambos progenitores se encuentran aislados el uno del otro en los pronúcleos masculino y femenino. Existen otros estudios genéticos realizados en los cuales la reparación producida por HDR tomando como molde el alelo silvestre es posible, pero suceden en menos del 10% de las ocasiones, y no poseen muchas características comunes con el estudio de *Ma et al.* Por tanto, aunque la reparación utilizando el cromosoma homólogo no puede ser excluida totalmente, la separación física de los genomas maternos y paternos sería un gran impedimento.

Tras la fecundación, se forman distintos núcleos materno y paterno (pronúcleos), de modo que los dos genomas están separados en una célula que tiene más de 100 μm de diámetro (Figura 9 C, E). Durante la primera interfase, los pronúcleos materno y paterno migran desde el sitio de su formación hacia el centro del cigoto, pero la separación persiste en esta fase (Figura 9 C, D, E). Los genomas materno y paterno se someten a la replicación del DNA en núcleos separados y comienzan la primera mitosis como entidades separadas (Figura 9 C, D, E). La fusión de ambos núcleos no ocurre hasta que la acción de los microtúbulos ensambla ambos genomas en la metafase de la primera mitosis (Figura 9 C, E).

Por lo tanto, ya que se requiere la interacción directa entre los genomas materno y paterno para la reparación mediante HDR empleando el cromosoma homólogo materno como molde, dicha interacción no puede ocurrir hasta la metafase de la primera división mitótica, de manera que, tras la inyección de CRISPR en fases anteriores, es aparentemente imposible que este tipo de reparación ocurra.

¿Qué explicación alternativa se puede dar a los resultados obtenidos en el estudio?

Los argumentos se centran sobre todo en la forma de análisis de los resultados. Para poder realizar la secuenciación en el estudio, se lleva a cabo la amplificación mediante PCR de una secuencia de unas 534 pb donde se localiza la mutación. Es posible que la endonucleasa Cas9 elimine la secuencia de unión de uno de los dos cebadores necesarios, haciendo que esta región no se amplifique. Por tanto, las únicas secuencias amplificadas por PCR y analizadas posteriormente mediante secuenciación serían las provenientes del alelo materno (Figura 9 A, B). Esta hipótesis es capaz de dar explicación a los altos porcentajes de genotipos silvestres obtenidos sin que se produzca la reparación por HDR utilizando como molde el alelo materno.

Para que esta hipótesis pueda ser plausible, CRISPR-Cas9 debería producir deleciones más grandes de las esperadas por los investigadores en el artículo. Existen estudios realizados en ratones en los que estas deleciones más grandes, de hasta 600 pb, han sido probadas¹¹. Puesto que la mutación está localizada a unas 200 pb del sitio de unión de uno de los cebadores, deleciones algo mayores de 200 pb podrían ser suficientes para eliminar este sitio de unión del cebador y conducir solamente a la amplificación del alelo materno (Figura 9 A, B), dando la apariencia engañosa de una corrección del alelo paterno.

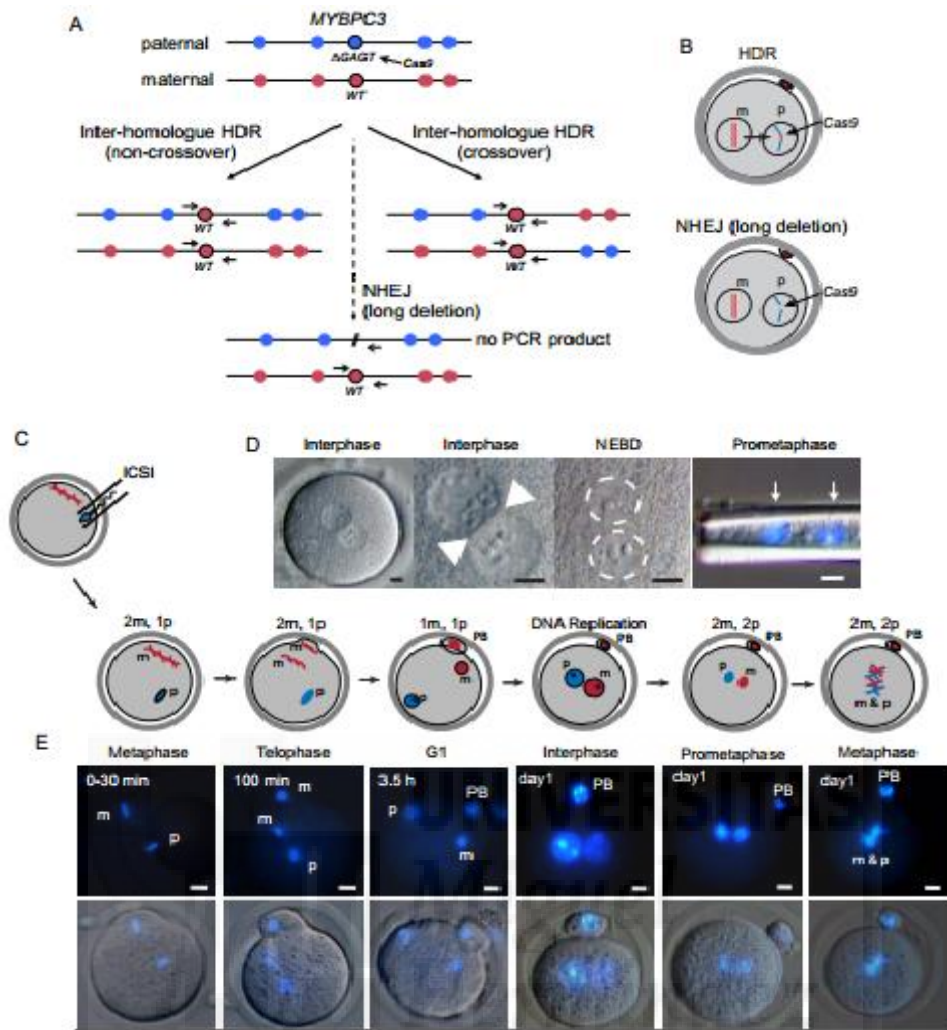


Figura 9. Restricciones en la edición de genes por recombinación entre cromosomas homólogos en embriones humanos. A) Posibles resultados de reparación después de un corte inducido por Cas9 en el locus *MYBPC3*^{ΔGAGT} paterno. Los círculos rojos y azules indican variantes genéticas maternas y paternas únicas, respectivamente. El resultado de la reparación por HDR puede aparecer con o sin entrecruzamiento entre ambos cromosomas homólogos. También son posibles largas deleciones producidas por NHEJ, dando como resultado la eliminación del sitio de unión para uno de los cebadores utilizados para el genotipado. B). Esquema de posibles resultados de reparación después del corte producido por Cas9. C) Esquema de la inyección intracitoplásmica de esperma (ICSI) seguida de la progresión del ciclo celular durante el día 1 de desarrollo. El número de genomas maternos y paternos está indicado en cada fase. D) Progresión de cigotos humanos a través del primer ciclo celular desde la etapa de dos pronúcleos hasta prometafase. E) Progresión del ciclo celular durante el día 1 en cigotos de ratón fertilizados. De 23 cigotos de ratón, ninguno mostró contacto directo entre los genomas materno y paterno hasta la metafase de la primera división mitótica.

5.CONCLUSIONES

- Debido al alto porcentaje de enfermos que presentan MCH hereditaria, y al alto porcentaje de mortalidad que provoca en pacientes jóvenes, es necesario centrarse, principalmente, en la corrección de esta forma de la enfermedad, y en las características que presenta.
- La corrección mediante edición génica de la mutación del gen MYBPC3, principal causante de MCH, sería una alternativa importante para los tratamientos actuales de la enfermedad, permitiendo eliminar ésta antes del nacimiento.
- El uso de CRISPR-Cas9 es una buena opción para llevar a cabo esta corrección, pero hay que tener en cuenta la posible reparación de los cortes del genoma por recombinación no homóloga (NHEJ), que daría lugar a la inviabilidad del individuo, principal desventaja de este sistema.
- Por tanto, CRISPR-Cas9 es una herramienta útil con mucho futuro por delante. No obstante, es necesario realizar más estudios sobre ella, repitiendo los experimentos aquí expuestos, intentando subsanar los errores encontrados y comprobando la veracidad de los resultados, y si no es así, seguir trabajando para encontrar la viabilidad de su uso.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Erdmann J, Raible J, Maki-Abadi J, Hummel M, Hammann J, Wollnik B y cols. Spectrum of clinical phenotypes and gene variants in cardiac myosin-binding protein C mutation carriers with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(2):322-330.
2. Watkins H, Conner D, Thierfelder L, Jarcho JA, MacCrea C, McKenna WJ y cols. Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Genetics* 1995;11: 434-437.
3. Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C y cols. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 2003;107:2227–2232.
4. Freiburg A, Gautel M. A molecular map of the interactions between titin and myosinbinding protein C. Implications for sarcomeric assembly in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Biochem* 1996;235(1-2):317-323.
5. Cazorla O, Szilagyi S, Vignier N, Salazar G, Kramer E, Vassort G y cols. Length and protein kinase A modulations of myocytes in cardiac myosin binding protein C-deficient mice. *Cardiovasc Res* 2006;69:370-380.
6. Lander ES. The Heroes of CRISPR. *Cell*. 2016;164: 18-28.
7. Haber JE. Lucky breaks: analysis of recombination in *Saccharomyces*. *Mutat. Res.* 2000; 451: 53-69.
8. Ma H; Marti-Gutierrez N; Park SW ; Wu J; Lee Y; Suzuki K y cols. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*. 2017; 548: 413-419.
9. Egli D; Zuccaro MV; Kosicki M; Church GM; Bradley A; Jasin M. Inter-homologue repair in fertilized human eggs?.2017; 1-6.
10. Shin HY; Wang C; Lee HK; Yoo KH; Zeng X; Kuhns T y cols. CRIPR/ Cas 9 targeting events cause complex deletions and insertions at 17 sites in the mouse genome. *Nature* 2017; 1-10.

12. Hsu PD; Lander ES; Zhang F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*. 2014;157;1262-1278.

