

La tecnología CRISPR/Cas y su aplicación en la clínica médica

Damia Romero-Moya* y Alessandra Giorgetti

Regenerative Medicine Program, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Barcelona, España

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/Cas9 es un sistema natural de defensa bacteriana descubierto por Mojica et al.^{1,2} y adaptado como herramienta de edición genética por el grupo de Charpentier y Doudna³, quienes recibieron el Premio Nobel en 2020. Cas9 es una nucleasa, una proteína con capacidad para cortar ADN de doble cadena en sitios específicos, guiada por un ARN guía (ARNg). La unión de la Cas9 con el ARNg forma un complejo ribonucleoproteico (RNP). Este complejo es el encargado de reconocer una secuencia de ADN y cortar. Para que esto ocurra, es imprescindible la presencia de una secuencia PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), que en el caso de Cas9 es NGG. Esta secuencia específica es esencial para que Cas9 reconozca y corte el ADN en el sitio deseado. En la mayoría de los organismos, cuando se genera el corte del ADN se activa la maquinaria de reparación, que tiene principalmente dos rutas: la NHEJ (*Non-Homologous End Joining*), de alta eficiencia y que no requiere molde, aunque frecuentemente introduce inserciones o deleciones (*indels*), y la HDR (*Homology-Directed Repair*), más lenta y dependiente de una secuencia molde, pero con elevada fidelidad en la reparación. En la edición génica se utiliza la vía HDR para introducir o reparar mutaciones añadiendo una secuencia molde.

Las hemoglobinopatías, como la anemia falciforme y la beta-talasemia, son trastornos monogénicos causados por mutaciones en el gen *HBB* que codifica la cadena β de la hemoglobina (β -globina)⁴. En la anemia falciforme, la mutación puntual c.20A>T (p.Glu6Val) origina la variante defectuosa HbS. Por otro lado, en la beta-talasemia se han descrito más de 350 mutaciones que afectan la síntesis de β -globina⁴. Estas enfermedades

presentan un amplio espectro clínico y, hasta la fecha, el único tratamiento curativo disponible es el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. Por ello, la edición génica de células madre hematopoyéticas (CMH) mediante CRISPR/Cas9 se perfila como una alternativa prometedora.

Una estrategia lógica sería la corrección directa de las mutaciones puntuales, pero esta aproximación conlleva diversos retos. En primer lugar, se requiere un ARNg que distinga específicamente el alelo mutado sin afectar al alelo sano, minimizando los efectos fuera de objetivo (*off-target*). En segundo lugar, es fundamental favorecer la reparación por la vía de HDR, ya que la NHEJ podría inducir *indels* que agraven la mutación existente^{5,6}. Además, es necesaria la introducción de un molde de ADN, lo cual podría aumentar la toxicidad celular y activar una respuesta inmunitaria⁶. Incluso si se superan estos obstáculos técnicos, es esencial lograr una eficiencia de edición suficiente para garantizar un número adecuado de células corregidas que permita la reconstitución hematopoyética tras la infusión en el paciente. Para optimizar este proceso, se han desarrollado metodologías que combinan el complejo RNP de CRISPR con virus adenoasociados (AAV) para introducir la plantilla de reparación^{7,8}. No obstante, algunos estudios han señalado que esta combinación puede inducir una respuesta inflamatoria y activar la vía del p53, lo que podría comprometer la viabilidad de las células editadas⁹.

Alternativamente, en los últimos años han surgido dos estrategias innovadoras para la corrección genética directa sin generar *indels*: los editores de base (BE, *Base Editors*)¹⁰ y los editores primarios (PE, *Prime Editors*)¹¹. Estas tecnologías permiten realizar

*Correspondencia:

Damia Romero-Moya
E-mail: dromero@idibell.cat

Recibido: 06-07-2025

Aceptado: 06-08-2025

DOI: 10.24875/SANGRE.M25000058

Disponible en internet: 02-10-2025

Sangre. 2025;44(Supl 2):31-32

www.revistasangre.com

0036-4355 / © 2025 Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. Publicado por Permanyer. Éste es un artículo *open access* bajo la licencia CC BY-NC-ND (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

modificaciones genéticas sin necesidad de cortar el ADN ni de introducir una secuencia molde de ADN. Los BE están formados por una Cas9 catalíticamente inactiva fusionada a una enzima desaminasa, como adenina base editor (ABE) o citosina base editor (CBE). A diferencia del sistema CRISPR/Cas9 convencional, los BE generan sustituciones puntuales específicas de bases (A→G o C→T) sin provocar roturas de doble cadena. Sin embargo, estas herramientas presentan algunas limitaciones importantes. Los cambios nucleotídicos solo pueden introducirse dentro de una ventana de edición específica, determinada por la posición relativa al sitio PAM. Además, puede ocurrir un efecto «espectador», es decir, modificaciones no deseadas en otras bases dentro del rango de acción de la desaminasa, lo que puede comprometer la precisión de la edición. Por otro lado, los PE representan una evolución aún más precisa de la edición genética. Esta tecnología combina una Cas9 nickasa con una transcriptasa inversa, y utiliza el *prime editing gARN* (pegARN). Este pegARN no solo dirige la Cas9 al sitio deseado del genoma, sino que también contiene la secuencia molde de ADN que será copiada directamente al genoma por la transcriptasa inversa. Los PE permiten realizar un rango más amplio de modificaciones, así como inserciones y deleciones pequeñas, sin requerir cortes de doble cadena ni plantillas exógenas.

En la actualidad, la opción que parece tener mejor aceptación y más amplio espectro, independientemente de la mutación en *HBB*, es la de dirigir CRISPR hacia *BCL11A*. El factor de transcripción BCL11A regula la transición de la hemoglobina fetal (HbF) a la adulta (HbA) reprimiendo directamente el gen de la γ -globina¹². Los enfoques actuales de edición génica utilizan CRISPR/Cas9 para inactivar la región inhibidora de la γ -globina, de modo que esta siga expresándose tras el nacimiento. La reactivación de la producción de HbF atenúa la sintomatología de las hemoglobinopatías y mejora la calidad de vida de los pacientes¹³.

En nuestro laboratorio aplicamos la tecnología CRISPR para generar modelos de enfermedad, con un enfoque principal en el estudio del factor de transcripción GATA2. Las mutaciones germinales heterocigotas en este gen causan deficiencia de GATA2, un trastorno multisistémico que predispone al desarrollo de síndromes mielodisplásicos y leucemia mieloide aguda, cuyo único tratamiento curativo actual es el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos¹⁴⁻¹⁶. Hemos desarrollado modelos de esta enfermedad en células madre pluripotentes inducidas (iPSC), introduciendo la mutación germinal más frecuente en pacientes, R396Q¹⁷, así

como mutaciones somáticas en *SETBP1* y *ASXL1*, dos de los genes más recurrentemente alterados en estos síndromes, generando el primer modelo de iPSC para estudiar la deficiencia en GATA2 y su progresión a síndrome mielodisplásico o leucemia mieloide aguda mediante la adquisición de mutaciones somáticas. Adicionalmente, hemos introducido la mutación R398W en CMH derivadas de cordón umbilical (CB-CMH), utilizando una combinación de CRISPR/Cas9 con vectores AAV para lograr eficiencias de edición de hasta un 10%. Con ello, hemos generado el primer modelo humano basado en CB-CMH para estudiar esta deficiencia¹⁸. Nuestro modelo aporta la primera evidencia de que las mutaciones germinales en GATA2 alteran la regulación de la mitosis CMH, contribuyendo potencialmente a un fenotipo de envejecimiento prematuro.

Referencias

1. Mojica FJ, Ferrer C, Juez G, Rodríguez-Valera F. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol Microbiol*. 1995;17:85-93.
2. Mojica FJ, Juez G, Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol*. 1993;9:613-21.
3. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337:816-21.
4. Jones-Wonni B, Kelkar AH, Achebe MO. A review of gene therapies for hemoglobinopathies. *Hemoglobin*. 2024;48:141-52.
5. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014;157:1262-78.
6. Liao H, Wu J, VanDusen NJ, Li Y, Zheng Y. CRISPR-Cas9-mediated homology-directed repair for precise gene editing. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2024;35:102344.
7. Charlesworth CT, Camarena J, Cromer MK, Vaidyanathan S, Bak RO, Carte JM, et al. Priming human repopulating hematopoietic stem and progenitor cells for Cas9/sgRNA gene targeting. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018;12:89-104.
8. Dever DP, Bak RO, Reinisch A, Camarena J, Washington G, Nicolas CE, et al. CRISPR/Cas9 beta-globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature*. 2016;539:384-9.
9. Ferrari S, Jacob A, Beretta S, Unali G, Albano L, Vavassori V, et al. Efficient gene editing of human long-term hematopoietic stem cells validated by clonal tracking. *Nat Biotechnol*. 2020;38:1298-308.
10. Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*. 2016;533:420-4.
11. Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*. 2019;576:149-57.
12. Sankaran VG, Menne TF, Xu J, Akie TE, Lettre G, Van Handel B, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science*. 2008;322:1839-42.
13. Steinberg MH, Chui DH, Dover GJ, Sebastiani P, Alsultan A. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full? *Blood*. 2014;123:481-5.
14. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127:2391-405.
15. Wlodarski MW, Collin M, Horwitz MS. GATA2 deficiency and related myeloid neoplasms. *Semin Hematol*. 2017;54:81-6.
16. Kotmayer L, Romero-Moya D, Marin-Bejar O, Kozyra E, Catala A, Bigas A, et al. GATA2 deficiency and MDS/AML: experimental strategies for disease modelling and future therapeutic prospects. *Br J Haematol*. 2022;199:482-95.
17. Castano J, Romero-Moya D, Richaud-Patin Y, Giorgetti A. Generation of two heterozygous GATA2 CRISPR/Cas9-edited iPSC lines, R398W and R396Q, for modeling GATA2 deficiency. *Stem Cell Res*. 2021;55:102445.
18. Romero-Moya D, Marin-Bejar O, Distefano M, Pera J, Castano J, González J, et al. Multiplex CRISPR/Cas9 gene editing in human stem cells to model clonal competition in GATA2 deficiency. *Blood*. 2022;140(Suppl 1).