



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

GRADO EN BIOLOGÍA

“La Fibrosis Quística y el potencial del sistema CRISPR en su cura”

“A Fibrosis Quística e o potencial do sistema CRISPR na súa cura”

“The Cystic Fibrosis and the potential of the CRISPR system in its cure.”

Trabajo de Fin de Grado



Alumna: María Fraga Lodeiro
Junio, 2020

Directora académica: María Ángeles Freire Picos

Departamento de Biología



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

M^a ANGELES FREIRE PICOS, PROFESORA TITULAR DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA EN LA UNIVERSIDADE DA CORUÑA

INFORMA

QUE EL PRESENTE TRABAJO FIN DE GRADO PRESENTADO POR LA ALUMNA MARÍA FRAGA LODEIRO TITULADO:

“La Fibrosis Quística y el potencial del sistema CRISPR en su cura”

“A Fibrosis Quística e o potencial do sistema CRISPR na súa cura”

“The Cystic Fibrosis and the potential of the CRISPR system in its cure.”

Ha sido realizado bajo mi dirección y autorizo su presentación para que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que conste firmo la presente en A Coruña a 21 de Junio de 2020

M^a Angeles Freire Picos

ÍNDICE

Resumen

Abreviaturas

1. Introducción.....	1
2. Objetivos	2
3. Materiales y métodos	2
4. Resultados	2
4.1. Proteína CFTR: estructura, biosíntesis y funciones	2
4.2. Causas genéticas y moleculares de la fibrosis quística	7
4.3. Tratamientos actuales de la fibrosis quística	9
4.3.1. Terapias moleculares.....	10
4.3.2. Terapias génicas.....	11
4.4. Sistema CRISPR/Cas: funcionamiento y aplicaciones en edición genética	12
4.5. Aplicación del sistema Crispr/Cas9 a la fibrosis quística	15
4.6. Implicaciones éticas de la edición genética	17
5. Conclusiones.....	18
6. Bibliografía	19

Resumen

La fibrosis quística es una enfermedad genética letal causada por diferentes mutaciones en el gen *cftr*, el cual codifica para un canal de cloruro situado en la mayoría de los epitelios. La función aberrante de esta proteína conduce a la formación de un moco espeso que obstruirá el órgano en cuestión, siendo los pulmones y el páncreas los más afectados. Anteriormente, el tratamiento para esta enfermedad se centraba en la mejora de la sintomatología. Gracias a los avances en el conocimiento de las bases moleculares de este trastorno, en la actualidad existen terapias dirigidas a mejorar el defecto proteico o a corregir las mutaciones subyacentes. No obstante, no se ha encontrado una cura definitiva y, con este fin, se está investigando aplicar el potencial de edición genómica del sistema CRISPR/Cas9. Sin embargo, antes de aplicar cualquier investigación con fines clínicos resulta esencial consensuar internacionalmente las normas éticas que regularán la edición de genes humanos.

Resumo

A fibrosis quística é unha enfermidade xenética letal causada por diferentes mutacións no xen *cftr*, o cal codifica para unha canle de cloruro situada na maioría dos epitelios. A función aberrante desta proteína conduce á formación dun moco espeso que obstruirá o órgano en cuestión, sendo os pulmóns e o páncreas os máis afectados. Anteriormente, o tratamento para esta enfermidade centrábase na mellora da sintomatoloxía. Grazas aos avances no coñecemento das bases moleculares deste trastorno, na actualidade existen terapias dirixidas a mellorar o defecto proteico ou a corrixir as mutacións subxacentes. Non obstante, non se encontrou unha cura definitiva e, con este fin, invéstigase aplicar o potencial de edición xenómica do sistema CRISPR/Cas9. Sen embargo, antes de aplicar calqueira investigación con fins clínicos, resulta esencial estar de acordo internecionalmente nas normas éticas que regularán a edición de xenes humanos.

Abstract

Cystic fibrosis is a lethal genetic disease caused by different mutations in the *cftr* gene, which codes for a chloride channel located in most epithelia. The aberrant function of this protein leads to the formation of thick mucus that obstructs the organ in question, with the lungs and pancreas being the most affected. Previously, treatment for this disease focused on improving symptoms. Thanks to advances in knowledge of the molecular basis of this disorder, there are currently targeted therapies to improve the protein defect or correct underlying mutations. However, a definitive cure has not been found and, to this end, the application of the genomic editing potential of the CRISPR / Cas9 system is being investigated. Nevertheless, before applying any research for clinical application, is essential an international agreement regarding the ethical norms that will regulate the editing of human genes.

Palabras clave: fibrosis quística, proteína CFTR, CRISPR/Cas9, edición genética.

Abreviaturas

ADP: adenosín difosfato.

ATP: adenosín trifosfato.

ASOs: oligonucleótidos antisentido (*AntiSense Oligonucleotides*).

cAMP: adenosín monofosfato cíclico.

Cas: endonucleasas asociadas a CRISPR (*CRISPR-Associated Proteins*).

CFTR: regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*).

CRISPR: agrupación de repeticiones cortas palindrómicas regularmente espaciadas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*).

crRNA: RNA CRISPR (*CRISPR RNA*).

DNA: ácido desoxirribonucleico.

DSB: rotura de doble cadena en el DNA (*Double Strand Break*).

EGE: Grupo Europeo de Ética en la Ciencia y las Nuevas Tecnologías (*The European Group on Ethics in Science and New Technologies*).

ENaC: canal de sodio epitelial (*Epithelial Sodium Channel*).

FQ: fibrosis quística.

F508del: delección de la fenilalanina de la posición 508.

HDR: recombinación homóloga dirigida (*Homology Directed Repair*).

HNH: dominio nucleasa de Cas9.

HITI: inserción dirigida independiente de homología (*Homology-Independent Targeted Insertion*).

mRNA: RNA mensajero.

NBD: dominio de unión a nucleótidos (*Nucleotide Binding Domain*).

NHEJ: unión de extremos no homólogos (*Non-Homologous End Joining*).

PAM: motivo adyacente al protoespaciador (*Protospacer Adjacent Motif*).

P_i: fosfato inorgánico.

PKA: proteína quinasa A.

PKC: proteína quinasa C.

PTCs: codones de terminación prematuros (*Premature Termination Codons*).

RE: retículo endoplasmático.

RNA: ácido ribonucleico.

RNasa: ribonucleasa.

RuVC: dominio con actividad nucleasa de Cas9.

sgRNA: RNA guía monohebra (*Single Guided RNA*).

siRNA: RNA pequeño interferente (*Small Interference Ribonucleic Acid*).

TMD: dominio transmembrana (*TransMembrane Domain*).

tracrRNA: molécula transactivadora de crRNA (*Trans-Activating CRISPR-RNA*).

Transportadores ABC: transportadores de casetes de unión a ATP (*ATP Binding Cassette*).

1. Introducción

La fibrosis quística (FQ) es un trastorno autosómico recesivo que afecta a aproximadamente 70.000 personas en todo el mundo (Collaco & Cutting, 2019). Esta enfermedad genética es causada por mutaciones en el gen *cftr* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), el cual codifica un canal transmembrana de iones cloruro llamado regulador de conductancia transmembrana de la FQ (CFTR, *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) (Riordan et al., 1989). Esta proteína transportadora se encuentra en la membrana apical de las células epiteliales exocrinas y su función principal es permitir la regulación de la secreción de iones cloruro. Una deficiencia en dicha proteína conduce a un desequilibrio en el movimiento de agua e iones a través del epitelio, lo que resulta en un moco engrosado, infección bacteriana crónica e inflamación, con pérdida progresiva de la función del órgano afectado (Christopher Boyd et al., 2020). Es una enfermedad multisistémica, dado que el CFTR se encuentra en la mayoría de los epitelios, pero los más afectados son los pulmones y el páncreas (Ortigosa, 2007). El defecto se hereda de manera autosómica recesiva, por lo que se requiere que ambos padres sean portadores del gen defectuoso para que el recién nacido presente la enfermedad (Óscar Fielbaum, 2011).

La incidencia de esta enfermedad alrededor del mundo no es uniforme, sino que varía en función de la ubicación geográfica y del origen étnico del individuo (Navarro, 2016). En las poblaciones caucásicas, es la enfermedad genética letal más común (O'sullivan & Freedman, 2009) y su prevalencia es mayor en Europa, América del Norte y Australia (Elborn, 2016). En los últimos años, la esperanza de vida de los pacientes se ha incrementado notablemente, de hecho, la esperanza de vida de las personas nacidas con FQ en 1950 era de 1 año y en la actualidad es de 40 años (O'sullivan & Freedman, 2009). Este aumento de la esperanza de vida es debido a la atención médica de mejor calidad, dirigida principalmente a las complicaciones respiratorias y la insuficiencia pancreática, ya que son los dos factores más determinantes en la evolución de la enfermedad (Ortigosa, 2007). En concreto, el 80% de las muertes de pacientes es con FQ son debidas a problemas en las vías respiratorias (Turcios, 2020).

Desde la secuenciación del gen *cftr* se ha conseguido avanzar en la comprensión de las causas moleculares de la enfermedad. Existen cerca de 1900 mutaciones en el gen *cftr* que afectan a diferentes aspectos de la proteína (Du et al., 2005). Como consecuencia, se han clasificado las mutaciones en 6 clases en función de sus alteraciones funcionales: falta de producción de la proteína (clase I), interrupción del tráfico por ubiquitinación y degradación (clase II), defecto en la regulación (no es activada por ATP, clase III), reducción de su actividad (clase IV), fallos en la traducción que no producen proteínas funcionales (clase V) y reducción de la estabilidad de las proteínas presentes en la membrana celular (clase VI) (O'sullivan & Freedman, 2009). La mutación más frecuente es F508del, que representa aproximadamente dos tercios de los alelos mutados en las poblaciones del norte de Europa y América del Norte (Lao et al., 2003).

Consiste en la eliminación de un residuo de fenilalanina en la posición 508 que impide la inserción del canal en membrana celular (mutación clase II) (Du et al., 2005).

El avance en el conocimiento de bases génicas de la enfermedad ha permitido la investigación de tratamientos que actúan sobre las anomalías proteicas que las distintas clases de mutaciones producen, en los que se engloban: los moduladores de proteínas, diferentes terapias génicas (como los oligonucleótidos antisentido) y sistemas de edición génica (Christopher Boyd et al., 2020). En relación a estos últimos, el sistema CRISPR (agrupación de repeticiones cortas palindrómicas regularmente espaciadas) se ha usado en diferentes estudios y la comunidad científica lo considera una potencial herramienta para la cura definitiva de esta enfermedad. No obstante, hay que tener en cuenta el evidente trasfondo ético que conlleva modificar la información genética de un ser humano.

2. Objetivos

El objetivo principal para llevar a cabo este trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre la fibrosis quística a fin de:

- Explicar las causas moleculares y genéticas de la enfermedad, aportando información sobre la proteína y el gen *cftr* así como las mutaciones que ocurren en él.
- Comentar los tratamientos que se llevan a cabo en la actualidad para combatir la enfermedad incluyendo el uso del sistema CRISPR como una potencial herramienta para curar definitivamente la enfermedad, teniendo en cuenta el dilema ético de la edición génica.

3. Materiales y métodos

Para la realización de la revisión bibliográfica se llevó a cabo una búsqueda tanto de artículos de revisión como de investigación científica en las bases de datos de PubMed (del NIH, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>) y de Google Scholar. Para citar los artículos y realizar la bibliografía se ha usado el gestor bibliográfico Mendeley.

4. Resultados

4.1. Proteína CFTR: estructura, biosíntesis y funciones

La fibrosis quística está causada por mutaciones en el gen *cftr*, el cual codifica para CFTR, un canal de cloro regulado por cAMP que pertenece a la familia de transportadores de casetes de unión a ATP (familia ABC, *ATP binding cassette*) (Riordan et al., 1989). Este canal iónico reside en las membranas apicales y en los endosomas de las células epiteliales que recubren las vías respiratorias, el

intestino y una variedad de glándulas exocrinas, donde juega un papel clave en la homeostasis de la sal (cloruro sódico) y el agua (Jilling et al., 1997). Una deficiencia en dicha proteína origina secreciones anormalmente viscosas en las vías respiratorias de los pulmones y en los conductos del páncreas, que causan obstrucciones que conducen a inflamación, daño tisular y destrucción de ambos sistemas de órganos. También se ven afectados otros sistemas orgánicos que contienen epitelios, como las glándulas sudoríparas, el conducto biliar del hígado, el tracto reproductor masculino y el intestino (Elborn, 2016).

Como el resto de miembros de la familia de proteínas ABC, CFTR está compuesta por 4 dominios (Figura 1): dos dominios transmembrana (TMDs del inglés *transmembrane domains*), generalmente compuestos por 6 segmentos transmembrana, y dos dominios de unión a nucleótidos citosólicos (NBDs del inglés *nucleotide binding domain*), en este caso el ATP (Sheppard & Welsh, 1999). Además, CFTR contiene un dominio regulador (R) ubicado en el citoplasma entre los complejos MSD-NBD. Este dominio contiene múltiples residuos consenso de serina/treonina que son sitios de fosforilación para varias proteínas quinasas, en las que se incluyen la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA, *protein kinase A*) y la proteína quinasa C (PKC, *protein kinase C*) (Hwang et al., 2018).

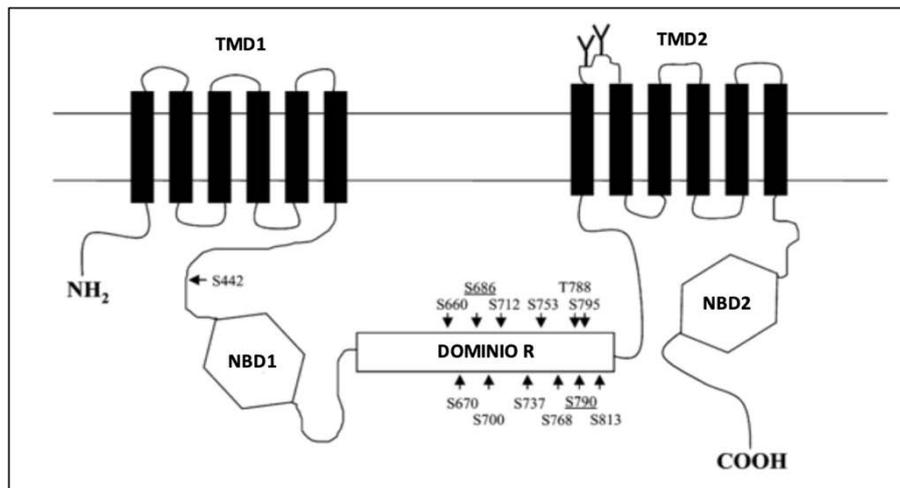


Figura 1. Estructura esquemática de la proteína CFTR con sus diferentes partes: dominios transmembrana (TMD1 y TMD2), dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2), dominio regulador, dominio amino-terminal (NH₂) y dominio carboxilo-terminal (COOH). Además, se representan los sitios de fosforilación de PKA (señalados con una flecha) y de PKC (señalados con una flecha y subrayados). Modificado de Vankeerberghen et al., 2002.

El gen *cftr* se traduce como una proteína de aproximadamente 140 kDa (1480 aminoácidos) que requiere ser procesada para convertirse en una forma madura de 180kDa (Riordan et al., 1989). Mediante un proceso co-traduccional, la proteína se asocia a la membrana del retículo endoplasmático (RE) a través del traslocón Sec61, sufriendo una N-glicosilación en una región extracelular de TMD2 (las glicosilaciones se pueden observar tanto en la Figura 1 como en la Figura 2). Como consecuencia, el peso molecular de la proteína CFTR aumenta de 140kDa a 150 kDa. Posteriormente, gracias a proteínas chaperonas, como calnexina y Hsp70, el polipéptido se pliega correctamente en el interior del RE y

se vuelve resistente a las proteasas citosólicas. No obstante, este proceso de plegado es muy poco eficiente y solamente el 25% de los productos de la traducción alcanzan un plegamiento correcto y pueden abandonar el RE, el resto se degrada en una vía dependiente de ubiquitina por el complejo citosólico proteasoma 26S (Vankeerberghen et al., 2002). La ubiquitinación juega un papel importante en el proceso de biosíntesis de CFTR y se ha demostrado que los polipéptidos CFTR están ubiquinados antes de que se complete la traducción. El equilibrio entre la desubiquinación por unas isopeptidasas y el alargamiento de la cadena de ubiquitina determina si continúa el proceso de maduración (se traslada a las pilas del Aparato de Golgi) o se degrada por el complejo proteasoma 26S (Figura 2) (Gadsby & Nairn, 1994).

En el caso de las CFTR que presentan la mutación F508del (delección de la Fenilalanina 508), que es la mutación más frecuente, el proceso de plegamiento es completamente ineficiente, ya que la totalidad de las proteínas mutantes se degradan (Figura 2). Esto se debe a que, al contrario de lo que ocurre con las CFTR de tipo salvaje, en el caso de las mutantes las proteínas calnexina y Hsp70 permanecen unidas a CFTR en todo momento. La proteína calnexina retiene la proteína en la membrana del RE, mientras que se forma el complejo Hsp70-CHIP, que facilita la degradación de las formas inmaduras de CFTR (Pind et al., 1994). La proteína CHIP tiene un dominio TRP que le permite interactuar con Hsp70 y un motivo U-box gracias al cual interactúa con subunidades del proteasoma. La degradación por parte del proteasoma 26S se produce en el citosol, por lo que la proteína mal plegada debe salir del RE por el traslocón Sec61 (Vankeerberghen et al., 2002). Por lo tanto, el nivel de expresión de CHIP determina la cantidad de CFTR ubiquinado y, como consecuencia, degradado. Las diferencias entre células en la expresión de CHIP podrían dar como resultado una distribución específica de tipo de célula de CFTR en la membrana celular (Meacham et al., 2001).

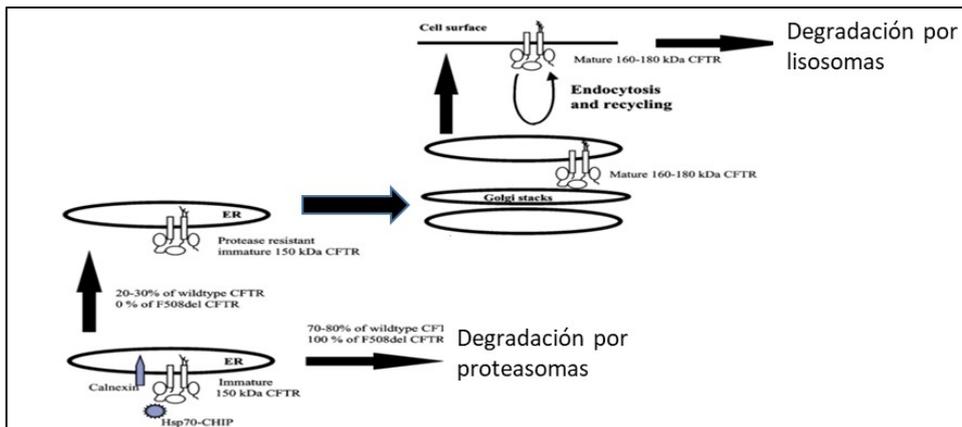


Figura 2. Esquema de la ruta de maduración que siguen las proteínas CFTR desde el RE hasta la membrana plasmática. Tanto el CFTR de tipo salvaje como el mutante F508del ingresan al retículo endoplasmático durante los procesos de transporte co-traduccionales. Posteriormente, el CFTR de tipo salvaje se pliega con la ayuda de chaperonas, como calnexina y Hsp70-CHIP, en una forma resistente a la proteasa que puede salir del RE y madurará aún más en las pilas de Golgi antes de que llegue a la superficie celular. Aproximadamente el 25% de las proteínas CFTR se pliegan correctamente, el resto serán degradados por el proteasoma. Una vez presente en la membrana celular, la proteína se recicla a través de ciclos de endocitosis y exocitosis. La proteína finalmente se degrada en los lisosomas. Modificado de Vankeerberghen et al., 2002.

Por el contrario, si CFTR continúa con el proceso de maduración, la proteína se trasladará a las pilas del Aparato de Golgi. Los grupos de glicosilación se modifican adicionalmente para formar una proteína madura de 170 kDa que posteriormente se integrará en la membrana plasmática (Vankeerberghen et al., 2002). Una vez presente en la superficie celular, el CFTR se somete a ciclos de endocitosis a través de vesículas recubiertas de clatrina y se recicla de nuevo a la membrana celular (Lukacs et al., 1997). Este proceso de reciclaje está regulado por cAMP, de tal manera que un aumento de este nucleótido da como resultado un aumento neto en la cantidad de proteínas CFTR presentes en la membrana celular porque inhibe la internalización (Prince et al., 1994). La proteína madura tiene una vida media de 16 h y finalmente es reclutada de la membrana celular para ser dirigida a los lisosomas para degradación (Jilling et al., 1997).

La regulación de la expresión de CFTR es, por lo tanto, muy compleja tanto en el nivel transcripcional mediante el inicio de la transcripción, la posición de los sitios de inicio de la transcripción y la formación de transcripciones empalmadas alternativamente, como en el nivel (post) traduccionales donde el equilibrio entre la maduración de proteínas y la degradación está determinado por al menos dos factores, la ubiquitinación y la acción de diferentes chaperonas (Jilling et al., 1997).

La función más reconocida de la proteína CFTR es la de ser un canal de cloruro regulado por cAMP. No obstante, desempeña otras funciones como la secreción de iones bicarbonato, que regula el pH del líquido de la superficie de las vías respiratorias, y la inhibición del canal de sodio epitelial (ENaC, *epithelial sodium channel*) (Palma et al., 2017). Los dominios MSD forman un poro selectivo para los iones Cl^- cuya apertura y cierre está regulada por dos procesos: fosforilación del dominio R por PKA e hidrólisis de ATP por NBDs (Csanády et al., 2019). Un modelo sencillo de cómo se produce la regulación de los CFTR se explica a continuación. Cuando el dominio R de CFTR está parcialmente fosforilado, solo el NBD1 podrá unir e hidrolizar ATP, lo que dará como resultado breves aperturas del canal y el Cl^- será transportado a favor de gradiente electroquímico. Cuando el dominio R está completamente fosforilado, el NBD2 podrá unirse a ATP. De esta forma, se logra una estabilización del estado abierto y se observarán aperturas largas del canal. Cuando el ATP se hidroliza en NBD2 y los productos de hidrolización (ADP y P_i) se liberan en ambos NBD, el canal se cerrará. Finalmente, el dominio R es desfosforilado por fosfatasa (por ejemplo, PP2A y PP2C) y los NBDs ya no pueden unirse a ATP y el canal permanecerá

en el estado cerrado hasta que el dominio R se vuelva a fosforilar por PKA (Anderson et al., 1991).

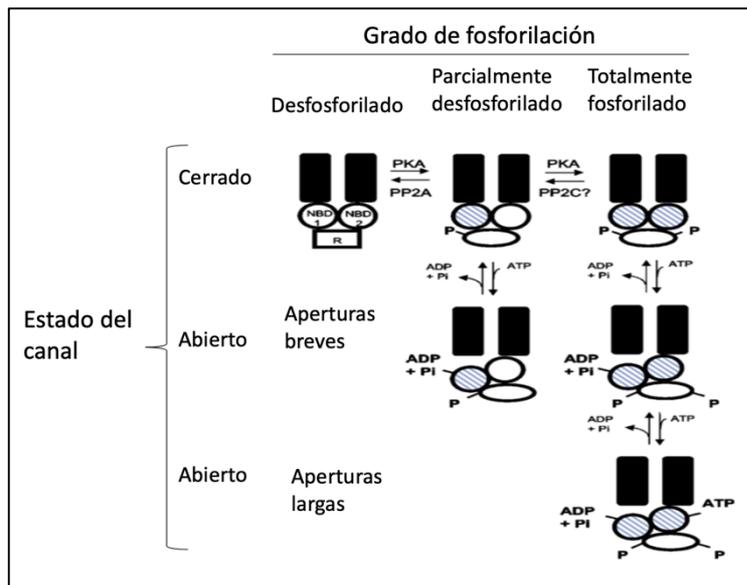


Figura 3. Esquema del funcionamiento del canal de cloro CFTR regulado por la fosforilación de PKA y la hidrólisis de ATP por parte de los NBDs Modificado de Vankeerberghen et al., 2002.

A diferencia de la mayoría de transportadores ABC, en los cuales los NBDs se unen e hidrolizan ATP para bombear activamente un sustrato a través de las membranas, en el CFTR los iones cloruro fluyen pasivamente a favor de gradiente electroquímico. En este caso, los NBDs se encargan de la apertura y cierre del poro transmembrana (Gadsby & Nairn, 1994).

Aunque el transporte de los iones Cl^- sea la función más conocida de CFTR, algunas otras funciones que desempeña pueden ser igual de importantes para causar la enfermedad. Además de transportar iones Cl^- , el canal CFTR también moviliza iones bicarbonato (HCO^-). En la FQ los iones HCO^- no se transportan y como consecuencia el pH extracelular es más ácido, causando en último término una hiperabsorción de Na^+ y la consiguiente deshidratación (Tang et al., 2008). Además, al canal CFTR se le atribuyen otras funciones: acidificación de los orgánulos intracelulares, regulación del transporte de vesículas intracelulares, la migración celular etc. (O'sullivan & Freedman, 2009).

La interacción del CFTR con otros canales iónicos, especialmente el canal de sodio epitelial (ENaC), y las interacciones del CFTR con las vías celulares relacionadas con la inflamación podrían ser importantes en la fisiopatología de la enfermedad (Elborn, 2016). La deficiencia de la proteína CFTR es especialmente importante en los pulmones y en el páncreas, donde las mutaciones de la CFTR producen secreciones anormalmente viscosas que causan obstrucciones que conducen a inflamación, daño tisular y destrucción de ambos sistemas de órganos. Además, también se ven afectadas las glándulas sudoríparas (Cutting, 2015).

La FQ afecta fuertemente a los pulmones, de hecho, aproximadamente un 80% de las muertes de pacientes con esta enfermedad se deben a complicaciones respiratorias (Turcios, 2020). La principal función de CFTR en los pulmones es mantener la capa de líquido superficial y regular el canal ENaC. En la FQ el CFTR no funciona y el ENaC está desregulado, esto implica un aumento en la reabsorción de sodio y agua, que conlleva la formación de un líquido viscoso (Palma et al., 2017). Como consecuencia, se pierde el aclaramiento mucociliar, es decir, los cilios no son capaces de mover esa capa de líquido con el fin de arrastrar las partículas nocivas y que sean deglutidas. La pérdida de este fenómeno provoca que se favorezcan las infecciones recurrentes (Elborn, 2016). El ciclo progresivo de daño pulmonar producido por taponamiento mucoso recurrente, infección e inflamación forman la base de la patología pulmonar por FQ (Boyle & de Boeck, 2013). Por otro lado, en el páncreas la FQ produce una pérdida de función exocrina. Como consecuencia, se produce una importante desnutrición que lleva a la muerte en la primera década de vida de la mayoría de pacientes no tratados (Cutting, 2015).

En las glándulas sudoríparas, en condiciones normales tanto los iones de sodio como los iones cloruro se reabsorben debido al gradiente electroquímico. No obstante, cuando CFTR presenta mutaciones, el Cl^- del lumen no se reabsorbe y este exceso de cargas negativas en el exterior de la célula despolariza la membrana apical, lo que dificulta la reabsorción de Na^+ por la atracción entre cargas opuestas. Como consecuencia, ambos iones se acumulan en la luz de los conductos y se produce una liberación de gran cantidad de cloruro sódico durante la sudoración. De hecho, la prueba diagnóstica tradicional para la FQ consiste en realizar un test del sudor del paciente para comprobar sus niveles de NaCl (Palma et al., 2017). Además, el conducto biliar, el tracto reproductor masculino y el intestino también se pueden ver afectados a lo largo del transcurso de la enfermedad.

4.2. Causas genéticas y moleculares de la fibrosis quística

La fibrosis quística es una enfermedad genética causada por diferentes mutaciones en el gen *cftr* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), que codifica para la proteína CFTR (O'sullivan & Freedman, 2009). El gen *cftr* se localiza en el cromosoma 7 humano (concretamente en la región q31), tiene un tamaño de 250 kb y contiene 27 exones (Figura 4) (Csanády et al., 2017). La enfermedad presenta un patrón de herencia recesivo clásico, es decir, una persona debe tener una mutación CFTR patológica en cada cromosoma para desarrollar el fenotipo de la enfermedad (Boyle & de Boeck, 2013). Debido a su gran tamaño, ofrece un extenso blanco mutacional y por el momento se han descrito más de 2000 mutaciones. El 40% de las mutaciones conocidas hasta ahora causa el cambio de 1 sólo aminoácido, el 35% altera el procesamiento de RNA, el 4% implica grandes reorganizaciones de la CFTR, el 1% afecta a las regiones promotoras, el 13% se consideran neutrales y el 7% desconocidas (*Cystic Fibrosis Mutation Database*, 2011) (Figura 4).

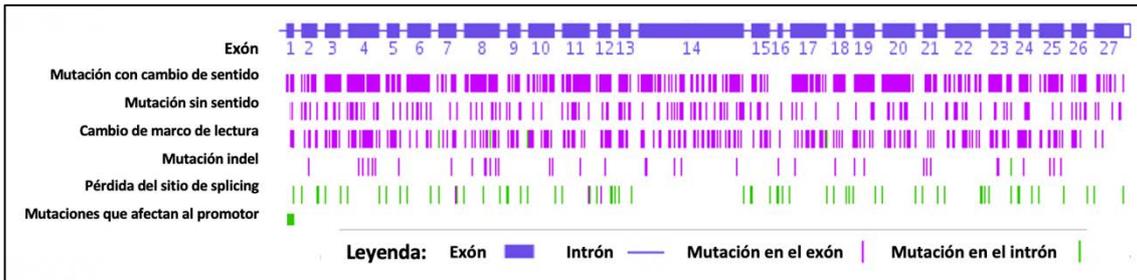


Figura 4. Representación esquemática del gen *cftr* con sus 27 exones (en morado) y las diferentes mutaciones que afectan a los exones (en fucsia) y a los intrones (verde). Se puede observar las distintas mutaciones que afectan a cada región del gen. (Indel: inserción o delección). Modificado de *Cystic Fibrosis Mutation Database*, 2011.

Tradicionalmente se han clasificado las mutaciones en 6 clases en función del proceso que se ve afectado (biosíntesis, procesamiento y estabilidad en la membrana celular) (Figura 5) (Sloane & Rowe, 2010). No obstante, la agrupación de una mutación en una clase a veces puede ser problemática, ya que múltiples procesos pueden verse alterados por una sola variante. Un ejemplo de esto es F508del, la mutación más frecuente del gen *cftr*, causa un plegamiento incorrecto de CFTR y la posterior degradación de la mayor parte de la proteína sintetizada (Cutting, 2015).

Las mutaciones de Clase I se caracterizan porque no permiten producir proteínas CFTR funcionales. La mayoría son mutaciones sin sentido que causan codones de parada prematuros. Otras mutaciones que se incluyen en esta clase son: mutaciones de empalme canónico y deleciones cromosómicas.

Las mutaciones de clase II provocan un plegamiento incorrecto de las proteínas, lo que evita el tráfico de CFTR desde el RE hasta la membrana plasmática. En su lugar, serán degradadas por el proteasoma. Como consecuencia, muy poco CFTR funcional llegará a la membrana celular. En esta clase se encuentra la mutación F508del, la cual es la mutación más común del gen *cftr* en humanos. Casi el 90% de los pacientes con FQ a nivel mundial presentan esta mutación en al alelo del gen CFTR, y aproximadamente el 50% son homocigotos (la presentan en ambos alelos), lo cual agrava la situación.

En las clases III y IV, el CFTR alcanza la membrana celular pero las mutaciones evitan el correcto funcionamiento del canal. En la clase III existe una activación anormal, lo que causa una reducción en el tiempo de apertura del canal. Las mutaciones de la clase IV se caracterizan por una conductividad reducida del poro, es decir, a diferencia de las de clase III, la actividad se reduce incluso cuando está abierto.

Dentro de la clase V se agrupan las mutaciones que provocan una función inadecuada de CFTR debido a la cantidad reducida de CFTR normal en la membrana. Generalmente son mutaciones en los intrones que reducen la eficiencia de la producción de la proteína porque afectan al empalme.

Finalmente, las mutaciones de clase VI son poco frecuentes, al igual que las de clase V, provocan cantidades reducidas de CFTR funcional en la superficie celular, pero esta vez se debe a la disminución de la estabilidad del CFTR maduro en la membrana celular (Boyle & de Boeck, 2013).

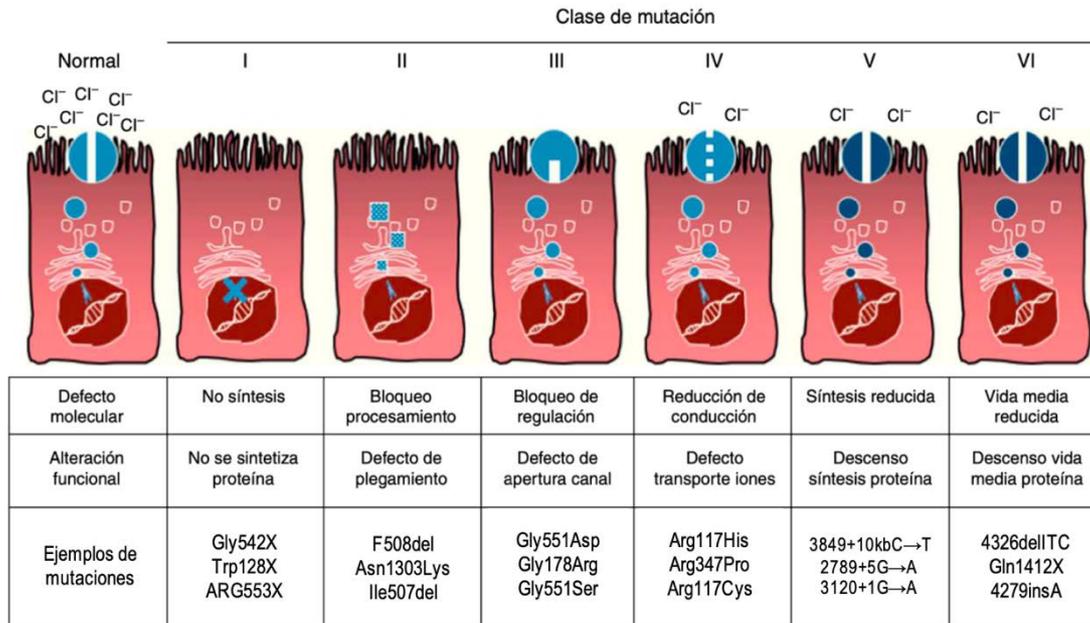


Figura 5. Esquema en el que se muestran las distintas clases de mutaciones y el caso de una proteína CFTR funcional normal. Cada clase va acompañada de una ilustración, el defecto molecular que causa la mutación, la alteración que provoca en la proteína CFTR y ejemplos. El círculo azul de gran tamaño representa el canal unido a la membrana y en blanco podemos ver su capacidad de apertura. Modificado de Quintana-Gallego et al., 2014.

Como se ha mencionado anteriormente, la mutación F508del es la más común y representa aproximadamente el 70% de los alelos mutados de la FQ en todo el mundo, el 30% de los alelos restantes muestra una gran heterogeneidad (Bobadilla et al., 2002). Debido a su elevada frecuencia, los esfuerzos médicos en desarrollar una cura definitiva para la FQ están centrados sobre todo en solucionar este caso. La mutación F508del causa un plegamiento incorrecto de CFTR y en último término, conduce a la degradación intracelular de la proteína (mutación de clase II) (Sloane & Rowe, 2010). Debido a que el proceso de reconocimiento y degradación de la proteína mal plegada no es 100% eficiente, algunos individuos con esta mutación pueden exhibir niveles bajos de expresión superficial de F508del CFTR y, por tanto, una actividad parcial del canal iónico y un fenotipo de FQ más leve. Estos pacientes podrían ser más susceptibles a una reparación de la proteína (Bronsveld et al., 2001).

4.3. Tratamientos actuales de la fibrosis quística

Anteriormente, el tratamiento de la FQ se centraba únicamente en la mejora sintomática y la prevención de complicaciones. Actualmente, gracias a los avances en el estudio de la enfermedad, el objetivo es corregir el defecto básico que la subyace. Para ello existen 2 enfoques diferentes: la terapia molecular, encaminada a corregir el defecto a nivel de la proteína (fármacos moduladores) y la terapia génica, dirigida a corregir la alteración génica (nucleótidos antisentido, vectores virales etc.) (Quintana-Gallego et al., 2014). Además, los medicamentos para mejorar la sintomatología de los pacientes se han mejorado (Rafeeq & Murad, 2017). Un resumen de los distintos tipos de tratamiento de la FQ se muestra a continuación en la Tabla 1:

Tratamientos en la fibrosis quística		
Vía de actuación	Objetivo	Medicamentos/Técnicas
Mejora sintomática	<ul style="list-style-type: none"> • Infección pulmonar • Inflamación pulmonar • Problemas nutricionales • Deshidratación 	<ul style="list-style-type: none"> → Antibióticos (azitromicina, amoxicilina...) → Esteroides y antiinflamatorios no esteroideos → Enzimas pancreáticas, multivitaminas y antioxidantes → Bloqueadores de canales de Na, diluyentes de moco y soluciones salinas hipertónicas
Terapias moleculares (moduladores)	<ul style="list-style-type: none"> • Defectos en la proteína 	<ul style="list-style-type: none"> → Supresores PTCs (Gentamicina y Altaruren) → Potenciadores (Ivacaftor) → Correctores (Lumacaftor)
Terapias génicas	<ul style="list-style-type: none"> • Mutaciones genéticas 	<ul style="list-style-type: none"> → Vectores virales (adenovirus y virus adenoasociados) → Vectores no virales (liposomas y nanopartículas sintéticas) → Moléculas de RNA pequeño interferente → Oligonucleótidos antisentido → Sistemas de edición genética (sistema CRISPR)

Tabla 1. Diferentes tratamientos en la fibrosis quística. Existen 3 vías para tratar la enfermedad: mejorar la sintomatología, terapias moleculares o terapias génicas. En la tabla se muestran los objetivos de cada una de ellas, así como los principales fármacos/técnicas que se emplean según el tipo de objetivo.

4.3.1. Terapias moleculares

Los moduladores de CFTR son un grupo de medicamentos que actúan sobre la actividad de la proteína CFTR. Dentro de los fármacos moduladores se han identificado 3 grupos principales y cada uno actúa sobre distintas clases de mutaciones (Derichs, 2013).

En primer lugar, los supresores de codones de parada prematura (supresores PTC, del inglés *Premature Termination Codons*) actúan sobre las mutaciones sin sentido (pertenecientes a la clase I). Estos fármacos evitan la identificación del codón de parada prematuro por parte del ribosoma, por lo que la proteína puede traducirse al completo (Quintana-Gallego et al., 2014). Los aminoglucósidos fueron los primeros PTCs usados, concretamente la Gentamicina (Howard et al., 1996). Posteriormente, se sintetizaron moléculas como el Altaruren o PTC124 (Welch et al., 2007). No obstante, los resultados de estos medicamentos no fueron los esperados. Por lo tanto, hasta la fecha no hay medicamentos totalmente eficaces para las mutaciones de clase I, que están presentes en aproximadamente 10% de pacientes con FQ (de la Hoz et al., 2019).

En segundo lugar, los denominados potenciadores de CFTR tienen como objetivo mejorar la función de la proteína CFTR que está presente en la superficie celular. Este grupo de medicamentos pueden actuar por tanto sobre las mutaciones de clases III, IV, V y VI (Quintana-Gallego et al., 2014). El Ivacaftor (VX-770) es el fármaco más conocido dentro de este grupo (Sloane & Rowe, 2010).

Por último, los denominados fármacos correctores de CFTR están diseñados para corregir el tráfico de proteínas plegadas incorrectamente (mutación de clase II) hasta la membrana celular, donde podría hacer su función casi con normalidad. Este tipo de mutaciones están presentes en un elevado número de pacientes con FQ, ya que incluyen la mutación más frecuente de la enfermedad, la mutación F508del. Por lo tanto, son un objetivo primordial en la

investigación de la FQ (Quintana-Gallego et al., 2014). El Lumacaftor (VX-809) es el medicamento más desarrollado entre los fármacos correctores (Solomon et al., 2015).

Los moduladores de CFTR ofrecen oportunidades terapéuticas para un amplio abanico de mutaciones CFTR, que engloban a aproximadamente el 90% de los pacientes con FQ (Christopher Boyd et al., 2020). Sin embargo, el resto de pacientes (como aquellos con mutaciones de clase I), no son susceptibles de terapias moduladoras o no les proporcionan una solución eficaz. Por lo tanto, se requieren terapias alternativas para estos casos, las cuales se explican a continuación.

4.3.2. Terapias génicas

Actualmente, numerosos enfoques genéticos parecen ser una solución prometedora para todo tipo de pacientes, independientemente de la mutación que presenten. Tras conseguir la clonación del gen *cftr*, la investigación en la cura de esta enfermedad se centró en la terapia de reemplazo génico, es decir, introducir un gen de tipo salvaje en las células que presentaban mutaciones. Sin embargo, las dificultades para encontrar un vector de transferencia génica capaz de superar la capa de moco de las vías aéreas y los mecanismos de defensa inmunológica ralentizó la investigación (Quon & Rowe, 2016).

Los esfuerzos iniciales de terapia génica se centraron en los vectores de adenovirus y virus adenoasociados (que requiere la coinfección con adenovirus para replicarse). Se ha conseguido expresar mRNA de la proteína CFTR usando estos vectores, no obstante, el efecto disminuye después de la administración debido a una respuesta inmune contra el vector (Harvey et al., 1999). Posteriormente, la atención se centró en los vectores no virales debido al menor riesgo de provocar una respuesta inmune en el paciente, por ejemplo, los vectores liposomales (como GL67), en los que se introduce DNA plasmídico que codifica el gen CFTR. No obstante, las cargas positivas de los liposomas pueden interactuar con los componentes del moco (cargado negativamente), reduciendo así la penetración del vector en la capa mucosa (Hyde et al., 2000). Por tanto, una solución alternativa que se está estudiando son las nanopartículas sintéticas, como por ejemplo el uso de polímeros biodegradables para hacer partículas que puedan alcanzar el epitelio subyacente (Suk et al., 2014).

Otra estrategia genética usada en el tratamiento de la FQ es la técnica del RNA interferente pequeño (siRNA, del inglés *small interference RNA*). En la FQ el ENaC está desregulado, por lo que hay un aumento de la absorción de Na⁺ y, como consecuencia, de la absorción de agua en las células epiteliales de las superficies respiratorias. Esto hace aumentar el grosor y la viscosidad de la mucosidad, lo cual constituye una de las patologías más perjudiciales en la FQ (Boucher, 2007). Por tanto, la inhibición de ENaC es una diana terapéutica para corregir la deshidratación del líquido de las superficies respiratorias característica de la FQ. La técnica del siRNA permite la regulación génica debido a la capacidad de la molécula de siRNA de silenciar la expresión de determinados genes. Son moléculas de RNA diseñadas para que sean perfectamente complementarias al gen que se pretende silenciar. Debido al emparejamiento Watson-Crick, el siRNA permanecerá unido al gen en cuestión

y esto impedirá su expresión (López et al., 2007). En el caso de la FQ, esta técnica se emplea para silenciar la cadena α de ENaC, de esta forma, no podrá realizar su función. Para ello, se sintetiza un siRNA específico que se administrará en una nanopartícula (Tagalakis et al., 2011). Se ha demostrado que un silenciamiento del 30% de este gen es suficiente para restaurar las propiedades mucociliares del epitelio (Bangel-Ruland et al., 2015).

Un tercer enfoque consiste en el empleo de oligonucleótidos antisentido (ASO, del inglés *AntiSense Oligonucleotide*). Los ASO se unen específicamente a moléculas de RNA de las que son complementarias a través del emparejamiento de bases Watson-Crick. Así se formarán heterodúplex DNA-RNA que reclutarán a la RNasaH1 que conduce a la degradación de la molécula RNA diana (Kole et al., 2012). La inhalación de ASO en aerosoles es una opción terapéutica emergente para las enfermedades respiratorias, incluida la FQ. Para el tratamiento de la FQ, generalmente se sintetizan ASO dirigidos al mRNA de ENaC para reducir su actividad (Crossby et al., 2017).

Por último, actualmente se está estudiando el potencial del sistema CRISPR/Cas en la edición genética para la cura de enfermedades (incluida la FQ) (Cooney et al., 2018). Dada la importancia que podría suponer el uso de este sistema, teniendo en cuenta el trasfondo ético que conlleva, en la búsqueda de una cura definitiva para diferentes enfermedades, trataremos esta alternativa en los siguientes apartados.

4.4. Sistema CRISPR/Cas: funcionamiento y aplicaciones en edición genética

Las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR, del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), junto con la endonucleasa Cas (*CRISPR-associated proteins*), forma parte de un sistema inmune adaptativo presente en muchas especies de bacterias y arqueas (Mojica & Rodríguez-Valera, 2016). Este sistema les permite a los microorganismos identificar y degradar secuencias de ácidos nucleicos exógenos, como pueden ser virus y plásmidos, siendo un mecanismo análogo al silenciamiento con RNA interferente en eucariotas (Lammoglia- Cobo et al., 2016). El locus donde se encuentran codificados los componentes del sistema CRISPR/Cas contiene una región promotora, encargada de modular la transcripción de todos los elementos posteriores. Seguidamente se encuentra la región CRISPR, que está compuesta de fragmentos repetidos separados entre sí por elementos espaciadores. Estos últimos codifican moléculas de RNA cortas que se denominan RNA CRISPR (crRNA). Finalmente, se localizan los genes que codifican para las proteínas Cas (Chávez-Jacobo, 2018). Se pueden distinguir 2 etapas en el mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas (Figura 6).

En primer lugar, tiene lugar la etapa de inmunización, donde ocurre la adquisición de nuevas regiones espaciadoras en el locus CRISPR. Tras la incorporación del DNA exógeno en la célula, la proteína Cas reconoce la molécula foránea e integra un fragmento de la misma en el locus (convirtiéndose en un nuevo espaciador). Para el reconocimiento del DNA extraño, las proteínas Cas identifican una secuencia conocida como motivo adyacente al

protoespaciador (PAM, del inglés *Promoter Adjacent Motif*) y cortan el DNA en las secuencias adyacentes al mismo para, posteriormente, incorporar el fragmento en el locus CRISPR (Horvarth & Barrangou, 2010).

En segundo lugar, ocurre la denominada fase de inmunidad. El elemento espaciador incorporado se transcribe como un crRNA, que se asociará a una proteína Cas para guiarla hasta su objetivo (el DNA exógeno) (Deveau et al., 2010). Cabe destacar que el proceso de obtención de un crRNA maduro es complejo, de hecho, se han identificado diferentes tipos de sistemas según el procesamiento del crRNA y las endonucleasas involucradas. No obstante, en este trabajo nos centraremos en el sistema CRISPR II, dado que es el más utilizado en la edición genómica y en el que participa la proteína Cas9. En este caso, como se muestra en la Figura 6b, en el proceso de biosíntesis del crRNA se requiere una molécula de RNA no codificante llamado tracrRNA (*trans-activating RNA*), el cual presenta una secuencia complementaria a la secuencia palindrómica del pre-crRNA. Así, se forma un dímero entre el RNA del locus CRISPR y el tracrRNA. Posteriormente, la RNasa III reconoce el híbrido RNACr/tracrRNA y lo escinde del resto de RNA. Por último, Cas9 se asocia con el dímero para formar el complejo CRISPR/Cas9 (Jiang & Marraffini, 2015). Las proteínas Cas presentan dos dominios conservados que son cruciales para su actividad: el dominio de helicasa (HNH) se encarga de abrir la doble hebra del DNA y el dominio de nucleasa (RuvC) le permite cortar el DNA en la región definida por los crRNA (Chávez-Jacobo, 2018).

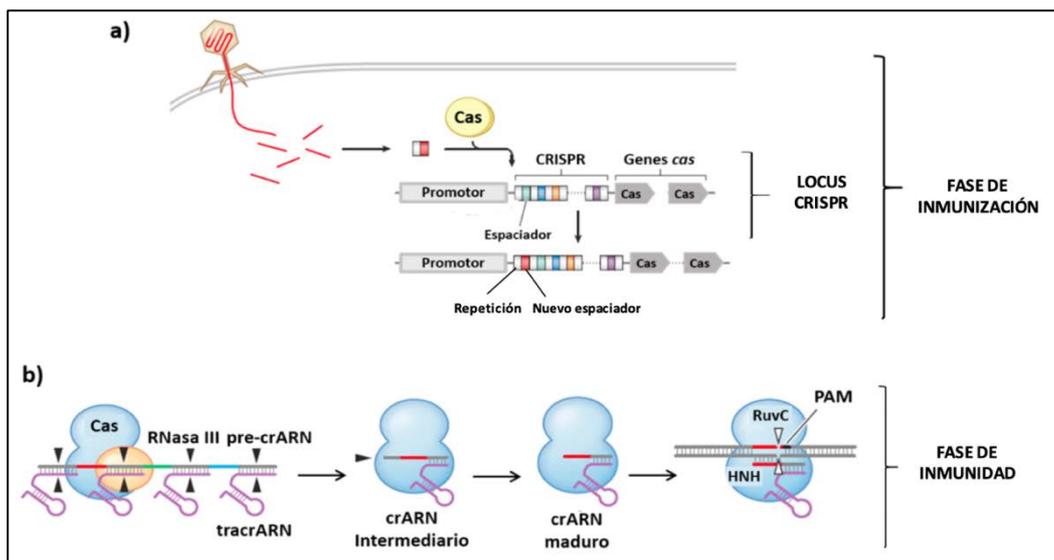


Figura 6. Fases de actuación del sistema CRISPR/Cas. a) Fase de inmunización. El fragmento de DNA exógeno se introduce en el locus CRISPR formando un nuevo espaciador. b) Fase de inmunidad. Se genera una molécula de crRNA maduro al que posteriormente se unirá la proteína Cas y la guiará hasta su objetivo (DNA exógeno). Las puntas de flechas, negras y blancas, indican los sitios de unión del RNA y del DNA respectivamente. Además, se muestra el sitio PAM, necesario para el reconocimiento de la molécula exógena. Modificado de Chávez-Jacobo, 2018.

El locus CRISPR se expresa de manera constitutiva, por lo que los elementos del sistema CRISPR/Cas siempre estarán listos para el momento en que se produzca una infección. Así, cuando penetre una molécula de DNA exógeno en

la célula, el complejo tracrRNA/crRNA/Cas escanea el material foráneo en busca de la secuencia PAM de reconocimiento (Chávez-Jacobo, 2018).

Debido a su actividad como endonucleasa y capacidad de reconocimiento en secuencias específicas, el sistema CRISPR/Cas presenta un gran potencial en terapia genética como herramienta de edición de genes. Se ha usado este mecanismo para activar genes, reprimirlos, inducir mutaciones puntuales y cambiar secuencias mediante recombinación homóloga (Lammoglia- Cobo et al., 2016). Por lo tanto, actualmente se están investigando las posibles aplicaciones médicas y biotecnológicas de este sistema, como es el caso del diseño de terapias contra una gran variedad de enfermedades (Chávez-Jacobo, 2018).

Para convertir el sistema CRISPR/Cas en una herramienta capaz de editar genes, se fusionaron los tracrRNA y los crRNA en un único RNA denominado sgRNA (del inglés *single guided RNA*), de esta forma, evitamos el proceso de maduración del crRNA y la actuación de la RNasa III. La molécula de sgRNA conserva el sitio de unión de la proteína Cas y la región que le permite reconocer la región PAM. Esta última se puede modificar para programar el sitio de corte, de forma que, en teoría, es posible modificar cualquier molécula de DNA (Jinek et al., 2012).

Una vez que el complejo sgRNA-Cas9 produjo el corte en la doble hélice de DNA, se activan 2 posibles mecanismos de reparación existentes en las células eucariotas: recombinación homóloga (HDR, del inglés *homology directed repair*) o la unión de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés *non homologous end joining*) (Figura 7) (Liu et al., 2017). Mediante la vía NHEJ se insertan o se escinden regiones de sitios cercanos al sitio de corte, de forma que se alterará el marco de lectura. Por otro lado, la reparación mediante HDR necesita una molécula de DNA que actúe como molde para la reparación. Este DNA puede estar presente en el cromosoma y también se pueden adicionar de forma exógena (a través de plásmidos por ejemplo). En este último caso, se pueden introducir secuencias específicas para modificar a nuestro antojo las regiones cortadas (Dicarlo et al., 2013).

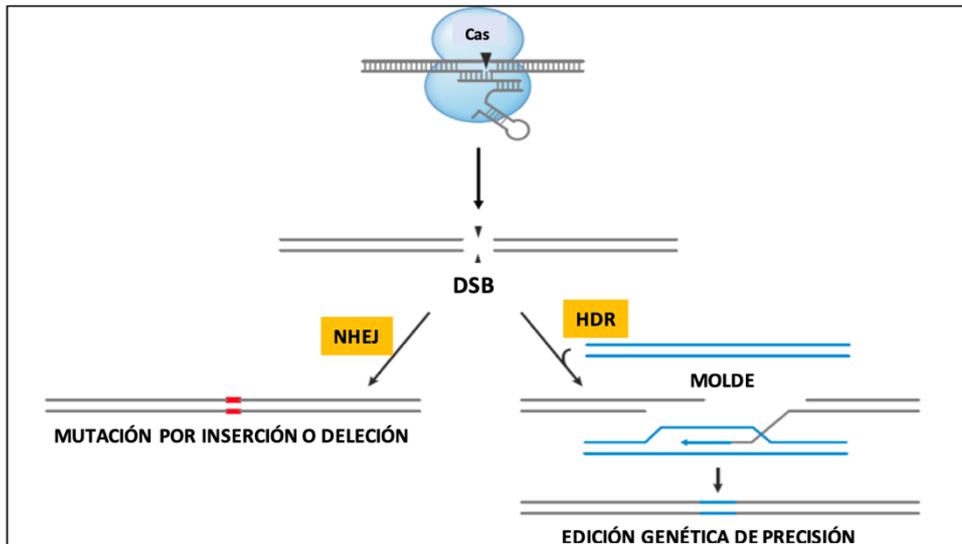


Figura 7. Edición genética mediada por el sistema CRISPR/Cas. El daño causado por los cortes de la proteína Cas sobre el genoma puede repararse por dos vías: reparación no homóloga o reparación homóloga. En el primer caso, se une los extremos cortados en un proceso donde pueden insertarse o removerse secuencias de DNA. Por otro lado, en la reparación homóloga se utiliza un molde adicional como donador para la recombinación, reemplazando la secuencia existente por la secuencia modificada. Las puntas de flecha indican los sitios de corte del DNA. Modificado de Chávez-Jacobo. 2018.

4.5. Aplicación del sistema CRISPR/Cas9 a la fibrosis quística

El hecho de que la FQ presenta una etiología sencilla, puesto que se debe a mutaciones en un único gen, hace que la edición genética sea una herramienta atractiva para la búsqueda de una cura definitiva. Los esfuerzos se han centrado en estudiar la mutación más frecuente (F508del), ya que este caso engloba a la mayoría de pacientes con FQ. La edición genética se ha aplicado en modelos celulares y animales con FQ y, aunque los avances son modestos en comparación con otras enfermedades, los resultados han sido exitosos (Quintana-Gallego et al., 2014).

Después de la mutación F508del, que consiste en la eliminación de 3 pares de bases, las mutaciones de *cftr* más frecuentes son transversiones (sustitución de una base púrica por una base pirimidínica) y transiciones (sustitución de una pirimidina por una purina) (*Clinical and Functional Translation of CFTR*, s. f.). Estas últimas son corregibles mediante edición de bases, aunque esta posibilidad se encuentra todavía en estudio. Esta técnica consiste en modificar el complejo CRISPR/Cas9 para introducir mutaciones puntuales y modificar de esta forma una sola base (Sander & Joung, 2014). Por otro lado, la eliminación de tres pares de bases (F508del) y las transversiones actualmente se pueden reparar con Cas9 generando una ruptura de doble cadena y utilizando HDR (Quintana-Gallego et al., 2014).

El sistema CRISPR/Cas9 se utilizó en un estudio para corregir la mutación F508del mediante recombinación homóloga en células madre intestinales humanas. Se cultivaron las células madre intestinales durante largos períodos

de tiempo, de tal forma que se establecieron organoides epiteliales genética y fenotípicamente estables. Posteriormente se transfectaron los organoides con complejos sgRNA-Cas9 dirigidos al exón 11, donde se encuentra la mutación F508del. Para evaluar si se había corregido la mutación, se realizó un test con forskolina. Esta molécula se usa para elevar los niveles de cAMP, lo que conduce a la secreción de líquido y a la inflamación de los organoides con CFTR funcional. Tras realizar este test, se observó que los organoides transgénicos expandieron su superficie, lo cual confirma la actividad del canal (Schwank et al., 2013).

A pesar de que la corrección de genes es la aplicación más prometedora de la edición genética, en la búsqueda de la cura de la fibrosis quística también se están estudiando las inserciones y deleciones de fragmentos de DNA.

Una estrategia de inserción única puede aplicarse a muchos alelos mutantes del gen *cftr*. El objetivo es insertar secuencias codificadoras en un intrón para que el DNA insertado contenga un sitio aceptor de *splicing* (proceso de corte y empalme) y un marco de lectura abierto para el resto de exones en dirección 3'. Cuanto antes se encuentre el intrón, un mayor número de exones serán corregidos por esta estrategia (Harrison et al., 2018). Para introducir secuencias de DNA se pueden emplear las vías de recombinación HDR o NHEJ. El método HDR de reparación de DSB (*double strand break*) únicamente ocurre en las fases G1 o S del ciclo celular, lo cual hace que emplear esta vía sea poco eficiente en las células del epitelio respiratorio, que presentan una lenta división. Por otro lado, NHEJ (*non-homologous end-joining*) se lleva a cabo tanto en células proliferativas como en células postmitóticas (Sander & Joung, 2014). Aunque NHEJ es considerado como un mecanismo de reparación de DSB, también se puede emplear para insertar DNA. Para ello se ha desarrollado una técnica denominada inserción selectiva independiente de homología (HITI, *homology-independent targeted insertion*) que, a diferencia de la vía HDR, presenta mayor tasa de orientación correcta del segmento insertado (Suzuki et al., 2016).

Por otro lado, la utilidad de las supresiones de genes para la corrección de la actividad de CFTR puede ser indirecta o específica de alelo (Bak et al., 2018). Se ha propuesto que una reducción de la expresión del gen del canal de sodio epitelial podría restaurar el equilibrio iónico en el epitelio de las vías respiratorias y mejorar así la patología. Sin embargo, los inhibidores de molécula pequeña de los ENaC no han tenido gran éxito en los ensayos, por lo que no hay garantías de que la edición genética lo mejore (Strug et al., 2018). Por otra parte, la eliminación específica de mutaciones generalmente se centra en aquellas que generan sitios de empalme crípticos en intrones, lo cual conduce a formación de pseudoexones que contienen codones de terminación prematuros. Se ha conseguido restablecer el proceso de *splicing* normal para 3 mutaciones poco frecuentes (juntas representan el 3% de los pacientes con FQ). Para ello, se han diseñado complejos sgRNA-Cas9 dirigidos a ambos lados de la mutación, lo que resultó en una escisión y una reparación de la misma a través de la vía NHEJ. Como consecuencia, se observó una mejora de la función de CFTR (Sanz et al., 2017).

Como hay más de 2000 mutaciones en el gen *cftr* descritas hasta el momento, un objetivo atractivo es conseguir corregir todas las mutaciones por medio de la

edición genética. En la actualidad se está investigando la posibilidad de usar el sistema CRISPR/Cas9 para introducir cDNA CFTR completo en el locus CFTR endógeno, dentro de un intrón cercano al extremo 5' del locus (Strug et al., 2018).

4.6. Implicaciones éticas de la edición genética

Los rápidos avances técnicos en la modificación genética, sobre todo en el método CRISPR / Cas9, implicaron una mayor urgencia en el desarrollo de pautas normativas y éticas para regular la edición del genoma humano. La dificultad de establecer estas políticas reguladoras son los diferentes puntos de vista sociales, culturales y religiosos de los distintos países, que impiden llegar a un acuerdo internacional sobre las normas pertinentes. Además, todo este dilema ético es diferente en función de si hablamos de edición de células somáticas (como la médula ósea o las células sanguíneas) o edición de células germinales (espermatozoides y óvulos), esto último permitiría que la modificación se transmitiera a la siguiente generación (Coller, 2018).

Por un lado, cada vez son más los expertos que apoyan la modificación del DNA no heredable de una persona para lograr un beneficio médico, como por ejemplo el trasplante de órganos o el reemplazo de la médula ósea (los cuales involucran la introducción de células con un DNA diferente de la del receptor). Además, se incluye la adición de genes como terapia génica en caso de trastornos médicos graves. Para ello, se han desarrollado sólidas políticas regulatorias a nivel internacional para garantizar que estos procedimientos se lleven a cabo de acuerdo con los valores sociales, incluidas las variaciones específicas de cada nación, para incluir diferentes puntos de vista culturales y religiosos (Kessler et al., 1993).

Pese a lo expuesto anteriormente, la posición ética referente al empleo de la modificación genética heredable carece de consenso social y ha sido muy polémica, ya que algunos países la prohíben bajo cualquier circunstancia y otros colocan barreras de diferentes alturas. Por ejemplo, 29 países han firmado y ratificado el Convenio Europeo de Oviedo (*Council of Europe*, s. f.), que prohíbe específicamente la edición del genoma heredable (Andorno, 2005). La idea de la edición de la línea germinal es controvertida ya que, aunque podría evitar que las generaciones futuras de una familia tengan un trastorno genético particular, por otra parte podría afectar al desarrollo del feto de maneras inesperadas o tener efectos secundarios a largo plazo que hoy en día se desconocen. Además, teniendo en cuenta que las personas afectadas por la terapia génica de la línea germinal aún no han nacido, no podrían tener la opción de elegir si recibir el tratamiento o no (*Reference*, 2020)

En Europa existe un organismo denominado Grupo Europeo de Ética en la Ciencia y las Nuevas Tecnologías (EGE, del inglés *European Group on Ethics in Science and New Technologies*) encargado de la elaboración de un marco regulatorio para no sobrepasar los límites éticos en el avance científico. El EGE considera que la sociedad civil tiene que tener voz en el debate sobre la aceptabilidad de la edición de genes, puesto que la discusión no sólo se reduce a los posibles riesgos para la salud, sino que muchos principios éticos como la dignidad humana o la justicia están claramente en juego.

En cuanto a la edición genética de células de la línea germinal, el EGE opina que debería haber una moratoria en la edición de genes de embriones o gametos humanos. Argumentan que este campo aún es muy reciente y que hay muchos obstáculos técnicos importantes que superar antes de que las aplicaciones clínicas se conviertan en una realidad viable. La cuestión más difícil para los responsables políticos del EGE es determinar si la investigación de la edición genética heredable debería suspenderse o si podría continuar en ciertas condiciones. Para ello hay diversas opiniones. Se ha sugerido que la investigación con una aplicación clínica debería demorarse, hasta que se resuelva el dilema ético y se superen dificultades técnicas. Sin embargo, la investigación básica podría seguir desarrollándose con normalidad. De todos modos, no es fácil establecer el límite entre los dos ámbitos de investigación, así como tampoco lo es distinguir entre las aplicaciones clínicas con objetivos terapéuticos o de mejora (que tendrían implicaciones éticas muy diferentes) (*Research and Innovation - European Commission*, s. f.).

La edición genética, tanto somática como en la línea germinal, es una técnica habitual en animales (ratones, cerdos y monos, entre otros). Es evidente el potencial de esta tecnología y, por tanto, es inevitable que en un futuro se extienda a los seres humanos. Para esto último, tanto científicos como el resto de la sociedad deben tener voz y voto en la creación de las normas bajo las cuales se llevará a cabo la edición genómica. De primera mano, Jennifer Doudna (co-inventora del sistema CRISPR/Cas 9) en múltiples artículos y entrevistas pide prudencia a la comunidad científica ante cualquier aplicación clínica de esta tecnología, para que se puedan tener en cuenta todas las implicaciones éticas involucradas (Doudna, 2020).

Teniendo en cuenta los avances recientes en el campo de la edición genética, es evidente el potencial de esta tecnología para dar una solución definitiva a muchos trastornos hereditarios. Desde mi punto de vista, considero aceptable el uso de estos sistemas exclusivamente con fines terapéuticos. Pero para ello, es imprescindible que exista un marco regulatorio claro y específico y organismos que supervisen todo el proceso. Por el momento, estas condiciones todavía no se dan y la comunidad científica tiene un largo camino por delante para solucionar este debate, ya que hay muchos puntos de vista diferentes sobre este tema.

5. Conclusiones

- La fibrosis quística es la enfermedad genética letal causada por mutaciones en el gen *cftr*, el cual codifica para una proteína conocida como CFTR, un canal de cloruro dependiente de cAMP. Las mutaciones conocidas para este gen se clasifican en función de si afectan al proceso de biosíntesis, maduración o estabilidad en la membrana de CFTR. La mutación más frecuente es la F508del, que causa un plegamiento incorrecto y la posterior degradación del canal.
- Una deficiencia en la proteína CFTR (o incluso su ausencia) provocará un desequilibrio en el movimiento de agua e iones a través del epitelio, lo que resulta en un moco engrosado, infección bacteriana e inflamación en el

órgano en cuestión. Si bien es una enfermedad multisistémica, los órganos más afectados son los pulmones y el páncreas.

- Los tratamientos actuales para combatir la FQ están dirigidos a la mejora de la sintomatología, la alteración de la proteína o a mutaciones en el gen *cftr* mediante diferentes tecnologías (siRNAs, ASOs etc.)
- Recientemente, se está probando la tecnología CRISPR/Cas9 como herramienta en la edición genética para la cura de la FQ. De hecho, se han llevado a cabo estudios aplicando esta tecnología en células madre humanas.
- Actualmente, la tecnología de edición genómica no se ha puesto en práctica en humanos, dadas todas las implicaciones éticas involucradas. Es necesario establecer las normas que regulen el uso de esta tecnología para no sobrepasar los límites éticos a costa del avance científico.

6. Bibliografía

Anderson, M. P., Gregory, R. J., Thompson, S., Souza, D. W., Paul, S., Mulligan, R. C., Smith, A. E., & Welsh, M. J. (1991). Demonstration that CFTR is a Chloride Channel by Alteration of its Anion Selectivity. In *New Series* (Vol. 253, pp. 202-205).

Andorno, R. (2005). The Oviedo Convention: A European Legal Framework at the Intersection of Human Rights and Health Law. In *Journal of International Biotechnology Law* (Vol. 2, pp. 133-143).

Bak, R. O., Gomez-Ospina, N., & Porteus, M. H. (2018). Gene Editing on Center Stage. In *Trends in Genetics* (Vol. 34, pp. 600–611).

Bangel-Ruland, N., Tomczak, K., & Weber, W.-M. (2015). Targeting ENaC as a Molecular Suspect in Cystic Fibrosis. In *Current Drug Targets* (Vol 16, pp. 951–957).

Bobadilla, J. L., Macek, M., Fine, J. P., & Farrell, P. M. (2002). Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations - Correlation with incidence data and application to screening. In *Human Mutation* (Vol. 19, pp. 575–606).

Boucher, R. C. (2007). Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. In *Trends in Molecular Medicine* (Vol. 13, pp. 231–240).

Boyle, M. P., & de Boeck, K. (2013). A new era in the treatment of cystic fibrosis: Correction of the underlying CFTR defect. In *The Lancet Respiratory Medicine* (Vol. 1, pp. 158–163).

Bronsveld, I., Mekus, F., Bijman, J., Ballmann, M., de Jonge, H. R., Laabs, U., Halley, D. J., Ellemunter, H., Mastella, G., Thomas, S., Veeze, H. J., & Tümmler, B. (2001). Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of $\Delta F508$ homozygous twins and siblings. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 108, pp. 1705–1715).

Chávez-Jacobo, V. M. (2018). *El sistema de Edición genética CRISPR/Cas y su uso como antimicrobiano específico bajo la licencia CC BY-NC-ND* (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). In *Revista Especializada en Ciencias* (Vol 21, pp. 116–123).

Christopher Boyd, A., Guo, S., Huang, L., Kerem, B., Oren, Y. S., Walker, A. J., & Hart, S. L. (2020). New approaches to genetic therapies for cystic fibrosis. In *Journal of Cystic Fibrosis* (Vol. 19, pp. 54-59).

Collaco, J. M., & Cutting, G. R. (2019). Cystic fibrosis. In *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics: Cardiovascular, Respiratory, and Gastrointestinal Disorders* (285–339).

Coller, B. S. (2019). Ethics of human genome editing. In *Annual Review of Medicine* (Vol. 70, pp. 289-305).

Cooney, A. L., McCray, P. B., & Sinn, P. L. (2018). Cystic fibrosis gene therapy: looking back, looking forward. In *Genes* (Vol. 9, pp. 538).

Crosby, J. R., Zhao, C., Jiang, C., Bai, D., Katz, M., Greenlee, S., Kawabe, H., McCaleb, M., Rotin, D., Guo, S., & Monia, B. P. (2017). Inhaled ENaC antisense oligonucleotide ameliorates cystic fibrosis-like lung disease in mice. In *Journal of Cystic Fibrosis* (Vol. 16, pp. 671–680).

Csanády, L., Vergani, P., & Gadsby, D. C. (2019). Structure, gating, and regulation of the CFTR anion channel. In *Physiol Rev* (Vol. 99, pp. 707–738).

Cutting, G. R. (2015). Cystic fibrosis genetics: From molecular understanding to clinical application. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 16, pp. 45–56)

de la Hoz, D., Villamil Osorio, M., & Restrepo-Gualteros, S. M. (2019). Moduladores CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator): presente y futuro en la terapia de fibrosis quística. Revisión. In *Archivos Argentinos de Pediatría* (Vol. 117, pp. 131–136).

Derichs, N. (2013). Targeting a genetic defect: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis. In *European Respiratory Review* (Vol. 22, pp. 58–65).

Deveau, H., Garneau, J. E., & Moineau, S. (2010). CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions. In *Annual Review of Microbiology* (Vol.64, pp. 475–493).

Dicarlo, J. E., Norville, J. E., Mali, P., Rios, X., Aach, J., & Church, G. M. (2013). Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 41, pp. 4336–4343).

Doudna, J. A. (2020). The promise and challenge of therapeutic genome editing. In *Nature* (Vol. 578, pp. 229–236).

Du, K., Sharma, M., & Lukacs, G. L. (2005). The $\Delta F508$ cystic fibrosis mutation impairs domain-domain interactions and arrests post-translational folding of CFTR. In *Nature Structural and Molecular Biology* (Vol. 12, pp. 17–25).

Elborn, J. S. (2016). Cystic fibrosis. In *The Lancet* (Vol. 388, pp. 2519–2531).

Fielbaum, C. Ó. (2011). Avances en fibrosis quística. In *Revista Médica Clínica Las Condes* (Vol. 22, pp. 150-159).

Lammoglia-Cobo, M. F., Lozano-Reyes, R., García-Sandoval, C. D., Avilez-Bahena, C. M., Trejo-Reveles, V., Muñoz-Soto, R. B., & López-Camacho, C. (2016). La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas. In *Investigación en Discapacidad* (Vol. 5, pp. 116-128).

Gadsby, D. C., & Nairn, A. C. (1994). Regulation of CFTR channel gating. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 19, pp. 513–518).

Harrison, P. T., Hoppe, N., & Martin, U. (2018). Gene editing & stem cells. In *Journal of Cystic Fibrosis* (Vol. 17, pp. 10–16).

Harvey, B. G., Leopold, P. L., Hackett, N. R., Grasso, T. M., Williams, P. M., Tucker, A. L., Kaner, R. J., Ferris, B., Gonda, I., Sweeney, T. D., Ramalingam, R., Kovesdi, I., Shak, S., & Crystal, R. G. (1999). Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 104, pp. 1245–1255).

Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. In *Science* (Vol. 327, pp. 167–170).

Howard, M., Frizzell, R. A., & Bedwell, D. M. (1996). Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. In *Nature Medicine* (Vol. 2, pp. 467–469).

Hwang, T. C., Yeh, J. T., Zhang, J., Yu, Y. C., Yeh, H. I., & Destefano, S. (2018). Structural mechanisms of CFTR function and dysfunction. In *Journal of General Physiology* (Vol. 150, pp. 539–570).

Hyde, S. C., Southern, K. W., Gileadi, U., Fitzjohn, E. M., Mofford, K. A., Waddell, B. E., ... & Egan, J. J. (2000). Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. In *Gene therapy* (Vol 7, pp. 1156-1165).

Jiang, W., & Marraffini, L. A. (2015). CRISPR-Cas: New Tools for Genetic Manipulations from Bacterial Immunity Systems. In *Annual Review of Microbiology* (Vol. 69, pp. 209–228).

Jilling, T., & Kirk, K. L. (1997). The biogenesis, traffic, and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. In *International review of cytology* (Vol. 172, pp. 193-241).

- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. In *science* (Vol. 337, pp. 816-821).
- Kessler, DA, Siegel, JP, Noguchi, PD, Zoon, KC, Feiden, KL y Woodcock, J. (1993). Regulación de la terapia con células somáticas y la terapia génica por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos. In *New England Journal of Medicine* (Vol. 329, pp. 1169-1173).
- Kole, R., Krainer, A. R., & Altman, S. (2012). RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 11, pp. 125–140).
- Lao, O., Andrés, A. M., Mateu, E., Bertranpetit, J., & Calafell, F. (2003). Spatial patterns of cystic fibrosis mutation spectra in European populations. In *European Journal of Human Genetics* (Vol. 11, pp. 385–394).
- Liu, C., Zhang, L., Liu, H., & Cheng, K. (2017). Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 266, pp. 17–26).
- López, T., Silva, D., & López Carlos Arias, S. (2004.). In *RNA de interferencia: el silencio de los genes*. (Vol. 12, pp. 271-278).
- Lukacs, G. L., Segal, G., Kartner, N., Grinstein, S., & Zhang, F. (1997). Constitutive internalization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator occurs via clathrin-dependent endocytosis and is regulated by protein phosphorylation. In *Biochem. J* (Vol. 328, pp. 353-361).
- Meacham, G. C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J. M., & Cyr, D. M. (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. In *Nature cell biology* (Vol. 3, pp.100-105).
- Mojica, F. J. M., & Rodriguez-Valera, F. (2016). The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. In *The FEBS Journal* (Vol. 283, pp. 3162–3169).
- Ortigosa, L. (2007). Fibrosis quística. Aspectos diagnósticos. In *Colombia Médica* (Vol. 38, pp. 41-49).
- O'Sullivan, B. y Freedman, S. (2009). Detección del portador de fibrosis quística: respuesta de los autores. In *The Lancet* (Vol. 374, pp. 978).
- Palma AG, Kotsias BA, Marino GI (2014). Funciones de los canales iónicos CFTR y ENAC en la fibrosis quística. In *Medicina (Buenos Aires)* (Vol. 74 pp. 133-139).
- Pind, S., Riordan, JR y Williams, DB (1994). Participación del retículo endoplásmico chaperona calnexina (p88, IP90) en la biogénesis del regulador

de conductancia transmembrana de fibrosis quística. In *Revista de Química Biológica* (Vol. 269, pp. 12784-12788).

Prince, L. S., Workman, R. B., & Marchase, R. B. (1994). Rapid endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. In *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Vol. 91, pp. 5192-5196).

Quintana-Gallego, E., Delgado-Pecellín, I., & Calero Acuña, C. (2014). Tratamientos reparadores de la proteína CFTR en la fibrosis quística. In *Archivos de Bronconeumología* (Vol. 50, pp. 146–150).

Quon, B. S., & Rowe, S. M. (2016). New and emerging targeted therapies for cystic fibrosis. In *BMJ (Online)* (Vol. 352, pp. 859).

Riordan, Rommens, J., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J., & et, al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. In *Science* (Vol. 245, pp. 1066–1073).

Sander, J. D., & Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. In *Nature Biotechnology* (Vol. 32, pp. 347–350).

Sanz, D. J., Hollywood, J. A., Scallan, M. F., & Harrison, P. T. (2017). Cas9/gRNA targeted excision of cystic fibrosis-causing deep-intronic splicing mutations restores normal splicing of CFTR mRNA. *PloS one*, 12(9), e0184009.

Schwank, G., Koo, B. K., Sasselli, V., Dekkers, J. F., Heo, I., Demircan, T., Sasaki, N., Boymans, S., Cuppen, E., van der Ent, C. K., Nieuwenhuis, E. E. S., Beekman, J. M., & Clevers, H. (2013). Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. In *Cell Stem Cell* (Vol. 13, pp. 653–658).

Sheppard, D. N., & Welsh, M. J. (1999). Structure and Function of the CFTR Chloride Channel. In *Physiological Reviews* (Vol. 79, pp.23-45).

Sloane, P. A., & Rowe, S. M. (2010). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein repair as a therapeutic strategy in cystic fibrosis. In *Current Opinion in Pulmonary Medicine* (Vol. 16, pp. 591–597).

Solomon, G. M., Marshall, S. G., Ramsey, B. W., & Rowe, S. M. (2015). Breakthrough therapies: Cystic fibrosis (CF) potentiators and correctors. In *Pediatric Pulmonology* (Vol. 50, pp. 3–13).

Strug, L. J., Stephenson, A. L., Panjwani, N., & Harris, A. (2018). Recent advances in developing therapeutics for cystic fibrosis. In *Human molecular genetics* (Vol. 27, pp. 173–186).

Suk, J. S., Kim, A. J., Trehan, K., Schneider, C. S., Cebotaru, L., Woodward, O. M., Boylan, N. J., Boyle, M. P., Lai, S. K., Guggino, W. B., & Hanes, J. (2014).

Lung gene therapy with highly compacted DNA nanoparticles that overcome the mucus barrier. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 178, pp. 8–17).

Suzuki, K., Tsunekawa, Y., Hernandez-Benitez, R., Wu, J., Zhu, J et al., (2016). In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. In *Nature* (Vol. 540, pp. 144–149).

Tagalakis, A. D., He, L., Saraiva, L., Gustafsson, K. T., & Hart, S. L. (2011). Receptor-targeted liposome-peptide nanocomplexes for siRNA delivery. In *Biomaterials* (Vol. 32, pp. 6302–6315).

Tang, L., Fatehi, M., & Linsdell, P. (2009). Mechanism of direct bicarbonate transport by the CFTR anion channel. In *Journal of Cystic Fibrosis* (Vol. 8, pp. 115-121).

Turcios, N. L. (2020). Cystic Fibrosis Lung Disease: An Overview. In *Respiratory care* (Vol. 65, pp. 233–251).

Vankeerberghen, A., Cuppens, H., & Cassiman, J.-J. (2002). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. In *Journal of Cystic Fibrosis* (Vol. 1, pp. 13-31).

Welch, E. M., Barton, E. R., Zhuo, J., Tomizawa, Y., Friesen, W. J., Trifillis, P., Paushkin, S. et al., (2007). PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. In *Nature* (Vol. 447, pp. 87–91).

Enlaces web

Cystic Fibrosis Mutation Database. (2011, 25 abril). Cystic Fibrosis Mutation Database. <http://www.genet.sickkids.on.ca>

Clinical and Functional Translation of CFTR. (s. f.). Clinical and Functional Translation of CFTR. Recuperado 22 de junio de 2020, de <https://cftr2.org>

Council of Europe. (s. f.). *Oviedo Convention and its Protocols*. Bioethics. Recuperado 22 de junio de 2020, de <https://www.coe.int/en/web/bioethics/oviedo-convention>

Reference, G. H. (2020, 9 junio). *What are the ethical issues surrounding gene therapy?* Genetics Home Reference. <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/therapy/ethics>

Research and Innovation - European Commission. (s. f.). Statement on Gene Editing. Recuperado 22 de junio de 2020, de https://ec.europa.eu/research/ege/pdf/gene_editing_ege_statement