

Edición génica del gen *SERPINA1* mediante el uso de CRISPR/Cas9 en células sanguíneas de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina

LUCÍA BAÑULS SOTO

Directores:

Dr. Francisco Dasí Fernández

Dra. Amparo Escribano Montaner

Dr. Salvador Martí Pérez

TESIS DOCTORAL

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Fisiología

Programa de Doctorado en Fisiología (3127)



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

ENERO 2022

D. Francisco Dasí Fernández, doctor en Ciencias Biológicas y Profesor Asociado del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universitat de València. Investigador “Miguel Servet”. Fundación Investigación Hospital Clínico de Valencia/Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA.

Dña. Amparo Escribano Montaner, doctora en Medicina y Profesora Titular jubilada del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

D. Salvador Martí Pérez, doctor en Farmacia y personal investigador contratado doctor en el Centro de Investigación Biomédica en Red CIBER, en el área temática de Enfermedades Raras.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada “Edición génica del gen *SERPINA1* mediante el uso de CRISPR/Cas9 en células sanguíneas de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. Lucía Bañuls Soto, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firma/n el presente certificado en Valencia, a 3 de enero de 2022.



Fdo. Francisco Dasí
Fernández
Tutor/Director



Fdo. Amparo
Escribano Montaner
Directora



Fdo. Salvador Martí
Pérez
Director

AGRADECIMIENTOS

Lo más valioso de este camino ha sido las personas que lo han recorrido conmigo. Por eso, me gustaría agradecerles todo lo que han hecho por mí y por este trabajo.

Al Dr. Francisco Dasí, por todo, por acogerme en su grupo, por ser siempre mucho más positivo que yo y por todo lo aprendido con él. A la Dra. Amparo Escribano, por su sabiduría y su ejemplo vital y profesional. Al Dr. Salvador Martí, por la paciencia, la implicación y el esfuerzo dedicado a que esto saliera adelante. A todos, gracias por el tiempo invertido, que no ha sido poco.

Quien ha tenido un compañero de laboratorio sabe que es difícil de explicar. Son más que mis compañeros de trabajo porque hemos compartido mucho dentro y fuera del laboratorio. Son más que amigos porque me entienden mejor que nadie. Son casi familia por todas las horas que hemos pasado juntos. Han sido mis manos y mente cuando no podía más. Han creído siempre en mí. A María, porque simplemente sin ella no hubiera podido. A Daniel, por su sempiterna sonrisa. A Juanjo, por alegrarnos los días más tristes. A todos los que han pasado por el laboratorio estos años, en especial: Sergi, Ana, Ana Esther, Luis y Victoria.

A los Alfas. A aquellos que han participado directamente en el proyecto y a todos los que han mostrado su interés y su cariño

hacia nuestro trabajo. A Silvia y Cruz, por ser nuestro nexo con ellos y animarlos a participar. A las enfermeras de Pediatría y de Neumología y a mi tía Maribel y al equipo del Hospital de Día por hacernos un hueco para “pincharnos” siempre con una sonrisa. A mis padres, mis hermanos y mis sobrinos. Porque si pudiera, los elegiría. A Alex, por entenderme, aunque no me entienda. A todos aquellos que se han preocupado por mí durante todo este tiempo.

Gracias.

RESUMEN

Introducción. El déficit de alfa-1 antitripsina (DAAT) es una enfermedad rara caracterizada por niveles bajos en sangre de una proteína denominada alfa-1 antitripsina (AAT). Está provocado por mutaciones en el gen *SERPINA1*. Una de las mutaciones más grave se denomina Pi*Z. CRISPR/Cas9 es una herramienta de edición génica que consiste en una endonucleasa, Cas9, guiada por una molécula de RNA simple (sgRNA), complementaria al gen diana.

Objetivos. Generar una línea celular estable mediante inmortalización de células procedentes de pacientes de DAAT para la edición de la mutación Pi*Z del gen *SERPINA1* mediante CRISPR/Cas9

Metodología. La inmortalización de linfocitos B de pacientes se llevó a cabo mediante infección con el virus de Epstein-Barr. Las líneas celulares obtenidas se caracterizaron respecto a su expresión de AAT. Para la edición de la mutación Pi*Z se transfectaron HEK293, monocitos y macrófagos primarios y linfocitos B inmortalizados con ribonucleoproteínas formadas por Cas9 y tres sgRNA específicas. Para validarlas se utilizó el ensayo de la endonucleasa T7.

Resultados. La inmortalización de linfocitos B dio lugar a cuatro líneas de genotipo: Pi*MM, Pi*MS, Pi*SS y Pi*MZ. La expresión de AAT en estas líneas se pudo detectar tanto a nivel de transcripción como de síntesis proteica. Las sgRNA diseñadas fueron capaces de editar de forma no homóloga la mutación Pi*Z.

Conclusiones. Se han generado cuatro líneas de linfocitos B con fenotipos del DAAT capaces de expresar AAT. La mutación Pi*Z del gen *SERPINA1* se ha editado mediante CRISPR/Cas9 en HEK293, monocitos y macrófagos primarios, y en linfocitos B inmortalizados.

ABREVIATURAS

4-BPA	4-fenilbutirato
AAT	Alfa-1 antitripsina
AAV	Virus adenoasociado
ANCA	<i>Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies</i>
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
CAR-T	<i>Chimeric antigen receptor T cell</i>
Cas	CRISPR <i>associated</i>
CDK4	Quinasa 4 dependiente de ciclina
cDNA	DNA complementario
CRISPR/Cas9	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9</i>
crRNA	RNA CRISPR
Ct	Ciclo umbral de la amplificación
DAAT	Déficit de alfa-1 antitripsina
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DSB	Corte de doble cadena
EBV	Virus de Epstein-Barr
EMA	Agencia Europea del Medicamento
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERS	<i>European Respiratory Society</i>

FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FEV1	Volumen máximo de aire espirado en el primer segundo
GFP	Proteína verde fluorescente
HDR	Recombinación por homología directa
hiPSCs	Células madre pluripotentes inducidas humanas
HSV	Virus herpes simple
hTERT	Telomerasa transcriptasa inversa humana
IEF	Isoelectroenfoque
IL	Interleucina
miRNA	microRNA
MOI	Multiplicidad de infección
mRNA	RNA mensajero
NHEJ	Recombinación no homóloga
OMS	Organización Mundial de la Salud
OTC	Ornitina trasncarbamilasa
PAM	Motivo adyacente de protoespaciador
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	Proteína de muerte celular programada 1
PEI	Polietilenimina
Pi	<i>Protease inhibitor</i>

PR-3	Proteinasa 3
qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
RAPID	<i>Randomised trial of augmentation therapy in alpha-1 proteinase inhibitor deficiency</i>
RE	Retículo endoplasmático
REDAAT	Registro español de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina
RNP	Ribonucleoproteínas
RPL13A	Proteína ribosomal L13A
SCD	Anemia falciforme
sgRNA	RNA guía de simple cadena
SV40	<i>Simian virus 40</i>
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TALENs	<i>Transcription activator-like effector nucleases</i>
TBST	<i>Tris buffered saline</i> con detergente Tween20
TCR	Receptor de linfocitos T
TDT	β -talasemia dependiente de transfusiones
TG	Terapia génica
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
tracrRNA	RNA trans-activador del crRNA
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
ZFNs	<i>Zinc finger nucleases</i>

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Déficit de alfa-1 antitripsina	3
1.1.1. Aspectos generales	3
1.1.2. Historia	4
1.1.3. Características moleculares	8
a) Gen	8
b) Transcripción	8
c) Traducción y estructura proteica	10
d) Secreción	11
e) Funciones	12
i. Inhibición de la elastasa del neutrófilo y otras serín proteasas	12
ii. Actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora	13
iii. Actividad antiviral y antimicrobiana	14
iv. Otras funciones	14
1.1.4. Etiología	15
a) Alelo Pi*S	17
b) Alelo Pi*Z	17
1.1.5. Fisiopatología	19
a) Fisiopatología hepática	19
b) Fisiopatología pulmonar	21
c) Otras patologías asociadas	25

1.1.6.	Diagnóstico	26
a)	Recomendaciones para el diagnóstico	27
b)	Pruebas de laboratorio	27
1.1.7.	Tratamiento	30
a)	Tratamiento respiratorio	31
b)	Tratamiento hepático	35
1.2.	Terapia génica	37
1.2.1.	Terapia génica: consideraciones generales	37
a)	Breve historia de la terapia génica	38
b)	Edición génica	40
c)	Vectores	44
i.	Vectores virales	45
ii.	Vectores no virales	46
1.2.2.	CRISPR/Cas9	52
a)	Descubrimiento y evolución	52
b)	Componentes	56
c)	Introducción en las células	57
d)	Aplicaciones en edición génica	58
e)	Ensayos clínicos	62
f)	Desafíos y oportunidades	66
i.	Vectores	66
ii.	Actividad inespecífica	67
iii.	Diseño del protocolo	69
1.3.	Déficit de alfa-1 antitripsina y terapia génica	70
2.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	79

2.1.	<i>Justificación del estudio</i>	81
2.2.	<i>Objetivos</i>	83
3.	<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	85
3.1.	<i>Líneas celulares y medios de cultivo</i>	87
3.1.1.	HEK293	87
3.1.2.	Monocitos primarios	87
3.1.3.	Linfocitos B inmortalizados	88
3.2.	<i>Establecimiento de una línea celular de monocitos inmortalizados</i>	89
3.2.1.	Aislamiento y cultivo de monocitos primarios	89
3.2.2.	Métodos de inmortalización no virales	90
a)	Plásmidos	90
b)	Transfección	91
i.	Electroporación	91
ii.	Polímeros catiónicos: PEI	92
3.2.3.	Métodos de inmortalización virales	93
a)	Vectores virales	93
b)	Infecciones virales	96
i.	SV40	96
ii.	hTERT y CDK4	97
3.3.	<i>Establecimiento de una línea celular de linfocitos B inmortalizados</i>	98

3.3.1.	Inmortalización de linfocitos B	98
3.3.2.	Caracterización celular	99
a)	Expresión génica	99
b)	Número de copias del gen	101
c)	Genotipado	102
d)	Síntesis de AAT	103
3.3.3.	Optimización de la transfección	105
3.4.	<i>Edición génica mediante CRISPR/Cas9</i>	108
3.4.1.	Diseño de las sgRNA	108
3.4.2.	Síntesis <i>in vitro</i> de las sgRNA	109
3.4.3.	Puesta a punto del sistema CRISPR/Cas9	111
a)	Caracterización de la línea HEK293	111
b)	Optimización de la transfección en HEK293	111
c)	Validación de las sgRNA	112
3.4.4.	Edición del gen <i>SERPINA1</i>	117
a)	Edición en cultivos primarios	117
b)	Edición de linfocitos B inmortalizados	118
3.5.	<i>Análisis estadístico y cálculos matemáticos</i>	120
4.	<i>RESULTADOS</i>	121
4.1.	<i>Establecimiento de una línea de monocitos inmortalizados</i>	123

4.2. Establecimiento de una línea de linfocitos B	
<i>inmortalizados</i>	127
4.2.1. Inmortalización de linfocitos B	127
4.2.2. Caracterización celular	127
a) Expresión génica	127
b) Cálculo del número de copias del gen	128
c) Genotipado	129
d) Síntesis de AAT	132
4.2.3. Eficacia de la transfección con GFP	133
4.3. Puesta a punto del sistema CRISPR/Cas9	135
4.3.1. Caracterización celular HEK293	135
a) Expresión génica	135
b) Cálculo del número de copias del gen	135
c) Genotipado	136
4.3.2. Optimización de las condiciones de transfección en HEK293	136
4.3.3. Validación de las sgRNA-IVT	138
d) Análisis de especificidad de las sgRNA-IVT	138
e) Análisis de la edición génica en HEK293	140
4.4. Edición génica del gen <i>SERPINA1</i>	142
4.4.1. Edición génica en cultivos primarios	142
4.4.2. Edición génica en linfocitos B inmortalizados	144

5. DISCUSIÓN	147
6. CONCLUSIONES	159
7. BIBLIOGRAFÍA	163
8. TRABAJOS DERIVADOS Y FINANCIACIÓN	197
8.1. <i>Artículos publicados</i>	199
8.2. <i>Posters presentados en congresos</i>	202
8.3. <i>Proyectos de investigación financiados</i>	203
8.4. <i>Financiación predoctoral</i>	204
9. ANEXOS	205
ANEXO 1	207

ÍNDICE FIGURAS

<i>Figura 1. Electroforesis de tres plasmas, en dos de ellos falta la banda alfa-1 del proteinograma</i>	<i>5</i>
<i>Figura 2. Esquema del gen SERPINA1, los diferentes sitios de inicio de transcripción y los transcritos más prevalentes</i>	<i>9</i>
<i>Figura 3. Estructura 3D de la AAT</i>	<i>11</i>
<i>Figura 4. Proceso de formación de polímeros del alelo Pj*Z</i>	<i>19</i>
<i>Figura 5. Esquema general de la fisiopatología del DAAT_23</i>	
<i>Figura 6. Niveles séricos de AAT en los diferentes fenotipos respecto al valor umbral protector</i>	<i>29</i>
<i>Figura 7. Diferentes métodos de aplicación de la TG</i>	<i>38</i>
<i>Figura 8. Herramientas de edición génica y su funcionamiento</i>	<i>41</i>
<i>Figura 9. Número de publicaciones en PubMed relacionadas con CRISPR/Cas9 por años</i>	<i>44</i>
<i>Figura 10. Proceso de formación de lipoplejos y penetración en el interior celular</i>	<i>50</i>

<i>Figura 11. Inmunidad adquirida en bacterias y arqueas mediante CRISPR/Cas</i>	54
<i>Figura 12. Complejo sgRNA-Cas9 unido a la secuencia diana</i>	57
<i>Figura 13. Esquema simplificado de los plásmidos pBSSVD2005 y pBABE-puro-hTERT</i>	91
<i>Figura 14. Esquema simplificado de los plásmidos pLentiSV40, pLV-hTERT-IRES-hygro y pHAGE-CDK4-R24L</i>	95
<i>Figura 15. Fundamento del ensayo para la determinación del número de copias de un gen</i>	101
<i>Figura 16. Diseño de las sgRNA-IVT</i>	109
<i>Figura 17. Síntesis del molde de DNA previo a la obtención de las sgRNA-IVT</i>	110
<i>Figura 18. Fundamento del ensayo de la endonucleasa T7</i>	116
<i>Figura 19. Monocitos transfectados mediante electroporación</i>	124
<i>Figura 20. Monocitos transfectados mediante PEI</i>	125
<i>Figura 21. Monocitos infectados con vectores lentivirales</i>	126

<i>Figura 22. Electroferogramas obtenidos por secuenciación Sanger de las líneas de linfocitos B</i>	<i>131</i>
<i>Figura 23. Resultado de la detección de la AAT mediante el anticuerpo 3C11</i>	<i>132</i>
<i>Figura 24. Selección por citometría de las células GFP positivas</i>	<i>133</i>
<i>Figura 25. Electroferogramas obtenidos por secuenciación Sanger de la mutación Pi*Z de la línea células HEK293</i>	<i>136</i>
<i>Figura 26. Células fluorescentes observadas mediante microscopía</i>	<i>138</i>
<i>Figura 27. Resultado del ensayo de la endonucleasa T7 en la línea celular HEK293</i>	<i>141</i>
<i>Figura 28. Resultado del ensayo de la endonucleasa T7 monocitos primarios</i>	<i>143</i>
<i>Figura 29. Resultado del ensayo de la endonucleasa T7 en macrófagos derivados de monocitos</i>	<i>144</i>
<i>Figura 30. Resultado del ensayo de la endonucleasa T7 en la línea L-MM de linfocitos B</i>	<i>145</i>

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Características de los vectores virales</i>	46
<i>Tabla 2. Aplicaciones y nuevas variantes de CRISPR/Cas9</i>	59
<i>Tabla 3. Ensayos preclínicos aplicando la terapia génica al DAAT</i>	71
<i>Tabla 4. Ensayos clínicos aplicando terapia génica en el DAAT</i>	73
<i>Tabla 5. Plásmidos utilizados y sus plásmidos accesorios</i>	96
<i>Tabla 6. Cálculo del $2^{-\Delta Ct}$ que indica el nivel de expresión del gen SERPINA1 respecto a RPL13A</i>	128
<i>Tabla 7. Cálculo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para la estimación del número de copias del gen SERPINA1, utilizando las PBMC como muestra de referencia</i>	129
<i>Tabla 8. Porcentaje de células transfectadas y sus condiciones de transfección</i>	134
<i>Tabla 9. Fluorescencia medida por espectrofluorimetría 48 horas después de la transfección</i>	137

*Tabla 10. Características de las posibles secuencias de unión
inespecíficas de las sgRNA-IVT diseñadas _____ 139*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Déficit de alfa-1 antitripsina

1.1.1. Aspectos generales

El déficit de alfa-1 antitripsina (DAAT) (código Orphanet: ORPHA60; código OMIM: 613490) es una condición genética rara que predispone a la aparición de complicaciones respiratorias, como el enfisema pulmonar; hepáticas, como la cirrosis y, ocasionalmente, a paniculitis y vasculitis. Se caracteriza por unos niveles séricos bajos de una glucoproteína inhibidora de las serín proteasas, denominada alfa-1 antitripsina (AAT), y está provocado por mutaciones en el gen que la codifica, el gen *SERPINA1*. Las mutaciones más comunes asociadas al DAAT se conocen como Pi*Z y Pi*S, mientras que Pi*M es la variante funcional de la proteína. Sigue un patrón de herencia mendeliana simple codominante (1).

El único tratamiento específico del DAAT disponible hoy en día es la terapia aumentativa, que consiste en la administración por vía intravenosa de la AAT purificada a partir de plasma de donantes sanos. Esta terapia solamente actúa frente al desarrollo del enfisema pulmonar, retrasando su progresión y agravamiento, pero no tiene ningún efecto sobre la enfermedad hepática.

Introducción: Déficit de alfa-1 antitripsina

El DAAT, según su entrada en *Orphanet*, tiene una incidencia de 1-5 casos por cada 10.000 individuos (2). Se enmarca dentro de las enfermedades raras que, por definición, son aquellas que afectan a menos de 5 de cada 10.000 individuos. Como ocurre con otras muchas enfermedades poco frecuentes, el DAAT sufre un grave problema de infradiagnóstico. Solo en España, los estudios poblacionales estiman casi 160.000 casos de individuos Pi*SZ y Pi*ZZ. No obstante, la realidad es que en el Registro Español de pacientes con DAAT (REDAAT) únicamente existen 669 inscritos, de los cuales 95 % son Pi*SZ y Pi*ZZ y el 5 % restante, otras variantes raras (3). Estos datos ponen de manifiesto que se diagnostican menos del 1 % de los afectados.

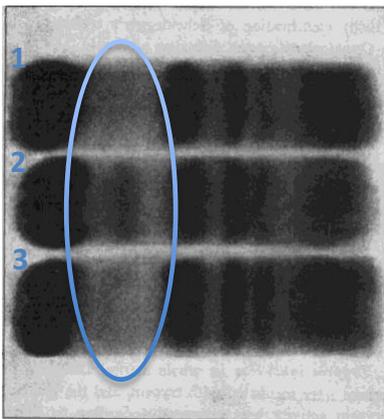
Aunque todavía queda mucho por conocer sobre el DAAT, desde su descubrimiento a principios de los años 60 se ha promovido tanto la investigación básica como la clínica, así como la inversión farmacéutica en el desarrollo de un tratamiento específico, a diferencia de lo que se observa, como tónica general, en otras enfermedades raras (1).

1.1.2. Historia

En el Hospital Universitario de Malmoe (Suecia), Carl-Bertil Laurell (1952-2001) realizaba de forma rutinaria electroforesis

Introducción: Déficit de alfa-1 antitripsina

de las muestras plasmáticas de los pacientes del hospital. En 1962, tras una década dedicada a esta labor, observó que en el proteinograma de cinco pacientes faltaba la banda alfa-1 (Figura 1). El médico residente, Sten Eriksson, investigó entonces sus historiales médicos, comprobando que, en tres de ellos, la ausencia de esta banda se asociaba con el desarrollo de enfisema y con más casos familiares de problemas respiratorios en otro (4). Ampliaron su investigación recogiendo datos de pacientes respiratorios de toda Suecia y analizando sus proteinogramas, logrando así reunir más casos de DAAT. En 1965, Eriksson publicó su tesis doctoral, titulada: “*Studies in Alpa-1 Antitrypsin Deficiency*”, en la que concluía que el DAAT era un trastorno hereditario que favorecía la aparición de enfisema pulmonar en la edad adulta temprana (5).



Casos 1 y 3: pacientes con DAAT
Caso 2: individuo sano

Figura 1. Electroforesis de tres plasmas, en dos de ellos falta la banda alfa-1 del proteinograma (señalada) por la que se descubrió el DAAT. Modificado de Laurell & Eriksson, 1963 (4).

Introducción: Déficit de alfa-1 antitripsina

Dos años más tarde comenzaron a describirse diferentes variedades de AAT según su velocidad de migración electroforética denominándolas Pi (*Protease Inhibitor*) junto a una letra. Así se describieron las variantes PiM, de velocidad media (*medium*); PiS, de velocidad lenta (*slow*) y PiZ, utilizando, en este caso, la última letra del abecedario para definir la velocidad migratoria de mayor lentitud detectada (6). Más adelante, la nomenclatura evolucionaría al formato: Pi**MZ*, para unificar tanto el genotipo como el fenotipo.

La primera enfermedad asociada al DAAT fue la cirrosis hepática, descrita primero en niños (7) y tres años después, en 1972, en adultos (8). Ese mismo año se identificó la actividad inhibidora de la AAT sobre la elastasa del neutrófilo y se comprobó que esta capacidad protegía frente al desarrollo de enfisema pulmonar (9).

Aunque se habían publicado cambios puntuales en la secuencia del gen de la AAT, como los de las mutaciones Pi*Z (10) y Pi*S (11), no fue hasta la década de los ochenta cuando se conoció la secuencia completa del mismo, su localización en el cromosoma 14 y su estructura proteica (12,13).

En 1987, la *Food and Drugs Administration* (FDA) aprobó la comercialización de Prolastin® (Bayer) y en 2015 la Comisión Europea hizo lo propio con Respreesa® (CLS Boehring). Ambos

Introducción: Déficit de alfa-1 antitripsina

productos contienen AAT purificada de plasma humano de donantes sanos para el tratamiento aumentativo en los casos graves de DAAT.

Respecto a su diagnóstico, desde mediados de los setenta, el isoelectroenfoque (IEF) fue elegido como método estándar para la clasificación de los fenotipos, al permitir identificar hasta 30 variantes (14). Años más tarde, el desarrollo y difusión de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) incrementó esta identificación hasta las más de 100 variantes descritas hoy en día (15).

En los últimos 20 años, el avance de las técnicas de biología molecular ha permitido conocer mejor la fisiopatología del DAAT, se han descrito nuevas funciones de la AAT y se investigan nuevas aplicaciones terapéuticas (16). Uno de los principales retos sigue siendo el desarrollo de un tratamiento definitivo y eficaz. En ese sentido, se están dedicando muchos esfuerzos y existe una gran esperanza de que la terapia génica sea la vía que permita encontrar la cura de muchas enfermedades genéticas, entre ellas, el DAAT.

1.1.3. Características moleculares

a) Gen

El gen que codifica para la AAT se denomina *SERPINA1*. Se ubica en el extremo distal del cromosoma 14, concretamente en la posición q31-32,3 y ocupa 12,2 Kb. Está formado por 7 exones y 6 intrones que los separan. En el extremo 5' tres exones (IA, IB, IC) forman la región promotora que regula la transcripción. Cuatro exones más (II, III, IV, V) constituyen la región codificante, delimitada por el sitio de inicio de traducción que se ubica en el exón II. El sitio activo, responsable de la actividad antiproteasa, se codifica en el exón V (17) (Figura 2a).

b) Transcripción

Las células que transcriben activamente el gen *SERPINA1* a RNA mensajero (mRNA) son aquellas que, finalmente, sintetizan y secretan la proteína. Los hepatocitos son responsables del 80 % de la producción de la AAT, que, en menor cantidad, también se sintetiza en los monocitos, macrófagos, neutrófilos, células alfa y beta pancreáticas, células epiteliales alveolares de tipo II, enterocitos o en las células de la córnea.

El gen *SERPINA1* presenta diferentes sitios de inicio de transcripción, por lo que se encuentran transcritos de diferente tamaño en función de la línea celular que lo esté expresando (Figura 2b). En los hepatocitos, el transcrito producido es de

Introducción: Déficit de alfa-1 antitripsina

1,6 Kb, igual que en los enterocitos. En cambio, monocitos y macrófagos presentan tres inicios de transcripción diferentes, capaces de generar transcritos de 2, 1,95 y 1,8 Kb (18). Por su parte, tanto las células de la córnea (19) como las células epiteliales alveolares (20) la sintetizan contando con sus propios promotores específicos que dan lugar a transcritos diferentes a los encontrados en las otras líneas celulares.

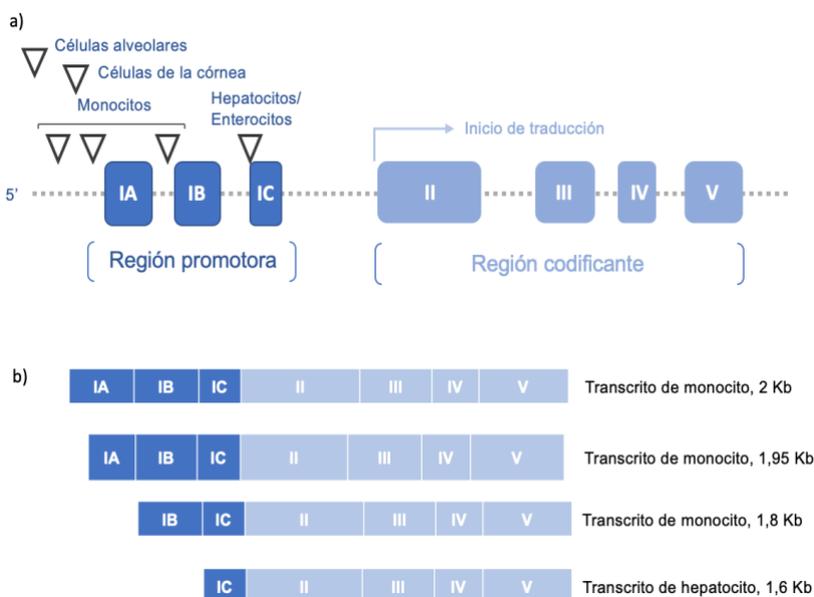


Figura 2. Esquema del gen *SERPINA1* y los diferentes sitios de inicio de transcripción (a). Representación de los transcritos más prevalentes del gen, la línea celular en la que se producen predominantemente y su tamaño (b).

En situaciones proinflamatorias los liposacáridos, la interleucina-1 β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α)

y la IL-6 son capaces de inducir la transcripción del gen *SERPINA1*. Asimismo, existen otros mecanismos autoreguladores de la expresión génica como la inducción por el complejo AAT:elastasa o la propia elastasa libre (21,22).

c) Traducción y estructura proteica

La traducción del mRNA a proteína de la AAT se inicia en el exón II (23). Se sintetiza inicialmente una AAT inmadura de 418 aminoácidos, que perderá un fragmento del extremo N-terminal para formar la proteína madura de 394 aminoácidos (24). Después, se plegará hasta obtener una conformación terciaria globular de 52 kDa formada por 9 hélices α y 15 láminas β . La proteína presenta un bucle móvil en cuyo centro se encuentra el sitio activo, expuesto para reconocer y unirse al sustrato. El sitio activo está formado por una metionina y una serina, en posición 358 y 359. Esta metionina es susceptible de oxidarse por acción del humo del tabaco, afectando dramáticamente la actividad antiproteasa de la AAT. Por último, las moléculas proteicas correctamente plegadas son glicosiladas en 3 residuos de asparagina en el aparato de Golgi y empaquetadas para su secreción (25) (Figura 3).

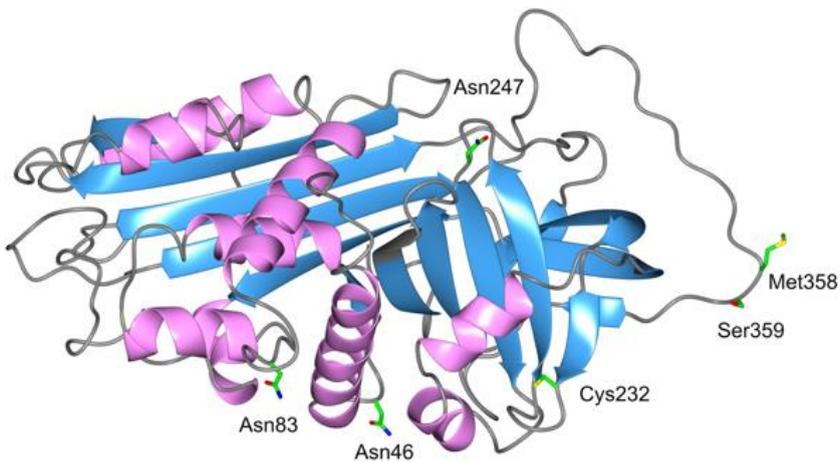


Figura 3. Estructura 3D de la AAT. Se muestran en color rosa las hélices α y en color azul las láminas β . Se señalan los tres residuos de asparagina (Asn) que son glicosilados (posiciones 46, 83 y 247), un residuo de cisteína libre (Cys232) y el centro activo constituido por una metionina y una serina (Met358 y Ser359). Imagen de Janciauskiene S *et al.*, 2018 (26).

d) *Secreción*

En situación basal se secretan 34 mg/Kg/día de AAT. Esto se traduce en una concentración en el plasma de alrededor de 1-2 g/L, desde donde difunde a los tejidos. Solo un pequeño porcentaje alcanzará los fluidos biológicos (27).

Por otra parte, en situaciones de inflamación o infección y como primera reacción defensiva, se activa la respuesta reactante de fase aguda en el organismo. Esto va a provocar un rápido aumento a nivel sistémico en la síntesis y secreción de algunas proteínas, entre ellas la AAT. Además, la inflamación de

un tejido también induce su expresión local en las células residentes capaces de sintetizarla y en los monocitos reclutados (27).

e) Funciones

i. Inhibición de la elastasa del neutrófilo y otras serín proteasas

La elastasa es liberada por los gránulos primarios de los neutrófilos cuando estos son activados. Es una glucoproteína que pertenece a la familia de las serín proteasas cuya principal función es la defensa del organismo mediante la degradación de microorganismos extraños y de otras moléculas de la matriz extracelular. Su principal inhibidor natural es la AAT (28).

El sitio activo expuesto de la AAT funciona como cebo de alta afinidad para la elastasa, que se une a los residuos de metionina y serina para hidrolizar el enlace. En ese momento, la AAT cambia bruscamente de conformación inactivando la elastasa y el complejo AAT:elastasa creado es fagocitado por los macrófagos. Por tanto, una molécula de AAT es capaz de inhibir a una única molécula de elastasa del neutrófilo en un proceso en el que ambas, proteasa y antiproteasa, se degradan finalmente (29).

Aunque la principal función de la AAT es la inhibición de la elastasa, se ha demostrado que también es capaz de inhibir de

forma eficiente otras serín proteasas como la proteinasa 3 (PR-3) y la catepsina G (30). La triptasa y la quimasa de los mastocitos, la granzima B de los linfocitos, la matriptasa de las células epiteliales, algunas calicreínas del plasma, así como la uroquinasa, plasmina y trombina de la sangre también pueden ser inhibidas por ella. Asimismo, otros estudios han demostrado que puede inhibir otras clases de proteasas como algunas cisteína proteasas o la metaloproteasa de matriz ADAM-17 (31).

ii. Actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora

La AAT ha demostrado tener un importante papel antiinflamatorio e inmunomodulador independiente de su actividad como antiproteasa (32). Reduce la secreción de TNF- α y de IL-1 β que, a su vez, inducen su producción como forma de regular la inflamación. Disminuye también los niveles de quimiocinas como la IL-8 y la proteína quimiotáctica del monocito-1. Al mismo tiempo, incrementa mediadores antiinflamatorios como la IL-10 y el antagonista del receptor de la IL-1.

Las células diana de la AAT son los macrófagos, neutrófilos, monocitos, mastocitos, linfocitos B y células dendríticas, pero no los linfocitos T. De este modo, en presencia de AAT, las células T reguladoras pueden diferenciarse fácilmente, lo que le otorga

cierta ventaja frente a otros inmunomoduladores e inmunosupresores (33).

iii. Actividad antiviral y antimicrobiana

En 2001 se publicó por primera vez la relación entre el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la AAT (34). Ensayos *in vitro* han demostrado que la AAT reduce la producción del virus en las células infectadas y que los niveles reducidos de esta proteína se asociaron con su infección (35,36). Esto se debe a que 26 residuos aminoacídicos del extremo C-terminal de la AAT forman un péptido que constituye un inhibidor directo de la infección (37).

Se ha observado también que la AAT protege frente otras infecciones, como las provocadas por las bacterias *Escherichia Coli* (38) y *Pseudomonas aeruginosa* (39), o el protozoo *Cryptosporidium parvum* (40).

iv. Otras funciones

Entre las múltiples funciones de la AAT se encuentra la protección frente a la apoptosis. Este fenómeno se ha observado tanto en los hepatocitos, como en las células vasculares endoteliales, las células β -pancreáticas y las células alveolares, en las que esta actividad se asocia con la prevención del desarrollo de enfisema (41).

Por otra parte, cabe destacar el papel antioxidante de la AAT atribuido a la elevada presencia de residuos de metionina (42), a su capacidad de inducir la catalasa y de inhibir la producción del anión superóxido en los neutrófilos (43).

Por último, se ha documentado que la AAT también es capaz de estimular la producción de insulina en el páncreas a través de la ruta de señalización del adenosín monofosfato cíclico, de proteger a las células β de la apoptosis (44) y de prolongar la supervivencia de los islotes pancreáticos (45).

1.1.4. Etiología

El gen *SERPINA1* es muy polimórfico ya que posee más de 100 variantes. Se transmite por herencia mendeliana simple y codominante, es decir, que los dos alelos, materno y paterno, se expresan de igual manera (17).

Las diferentes variantes se suelen clasificar en: alelos normales, si expresan niveles fisiológicos de la proteína funcional, y alelos deficitarios, si la función de la proteína se ve alterada o los niveles séricos disminuidos. Dentro de este último grupo se encuentran los alelos nulos que son aquellos que dan lugar a la ausencia total de AAT en sangre.

Introducción: Déficit de alfa-1 antitripsina

Las variantes deficitarias más comunes son las denominadas Pi*S y Pi*Z. Aunque entre los países europeos existen diferencias, el alelo Pi*Z se encuentra en alrededor del 1,5 % de la población europea, mientras que el alelo Pi*S está presente en alrededor del 3 % de la población (46). Por lo que se refiere al conjunto de pacientes diagnosticados de DAAT, la inmensa mayoría presenta un fenotipo Pi*ZZ o Pi*SZ, que expresan, respectivamente, el 15 % y el 25 % de los niveles normales de la proteína en sangre. Los heterocigotos Pi*MZ presentan unos niveles plasmáticos de AAT entre el 50 % y 70 % y su prevalencia en la población caucásica es de un 2-3 %, mientras que el genotipo Pi*MS expresa un 80 % del total de AAT y su prevalencia es del 4-11 %. El alelo Pi*S en homocigosis cursa con un 60 % de los niveles normales de la proteína en sangre de media y su prevalencia en la población caucásica es muy baja, alrededor del 0,1 % (24,47).

El riesgo de desarrollar enfermedad pulmonar es tanto mayor cuanto más bajos son los niveles de AAT circulantes. Por ello, los individuos de mayor riesgo son los Pi*ZZ, seguidos por los Pi*SZ. Sin embargo, los fenotipos Pi*MZ, Pi*MS y Pi*SS presentan unos niveles protectores de AAT circulante por lo que, en ellos, el riesgo de desarrollar enfisema es muy bajo, aunque se ve incrementado por el humo del tabaco (24).

Introducción: Déficit de alfa-1 antitripsina

Existen, al menos, otras 30 variantes del gen *SERPINA1* que provocan DAAT; no obstante, su frecuencia es muy baja y se presentan en la literatura como casos únicos, por lo que se conoce poco sobre su epidemiología y expresión clínica (47). Por ello, nos centraremos únicamente en las dos variantes más prevalentes.

a) Alelo Pi*S

El alelo Pi*S se diferencia del alelo normal por una mutación puntual en la que se produce el cambio de un solo nucleótido en el exón III. Se trata del cambio de una adenina por una timina, de manera que el triplete normal GAA es sustituido por el triplete GTA. Esto hace que, en la secuencia de aminoácidos, en lugar de una molécula de ácido glutámico en la posición 264, se encuentre una molécula de valina ($\text{GAA Glu}^{264} \rightarrow \text{GTA Val}^{264}$).

Esta mutación ocurre lejos del sitio activo de la AAT y la alteración estructural es muy leve, dando lugar a una proteína inestable que será degradada fuera del hepatocito y que reduce, por tanto, la vida media de la forma Pi*S de la AAT (AAT-S) (12).

b) Alelo Pi*Z

Del mismo modo, la Pi*Z solo se diferencia de la secuencia normal en un nucleótido. En este caso se localiza en el exón V y consiste en la sustitución de un residuo de guanina por uno de adenina. Es decir, el triplete GAG se cambia por un triplete AAG

Introducción: Déficit de alfa-1 antitripsina

dando lugar a una modificación de la cadena peptídica. En la posición 342, donde debería haber un ácido glutámico, en el alelo Pi*Z se encuentra una lisina (GAG Glu³⁴² → AAG Lys³⁴²) (48).

La mutación Pi*Z se ubica en la base del sitio activo de la enzima. La proteína obtenida, AAT-Z, presenta una alteración conformacional que abre una de las láminas y que es propensa a la formación de dímeros. A su vez, los dímeros pueden agregarse formando polímeros. Estos quedan retenidos en el retículo endoplasmático (RE) de los hepatocitos formando cuerpos de inclusión que generan estrés celular y activan las rutas de señalización de apoptosis en la célula, dando lugar a procesos de inflamación en los tejidos (29) (Figura 4).

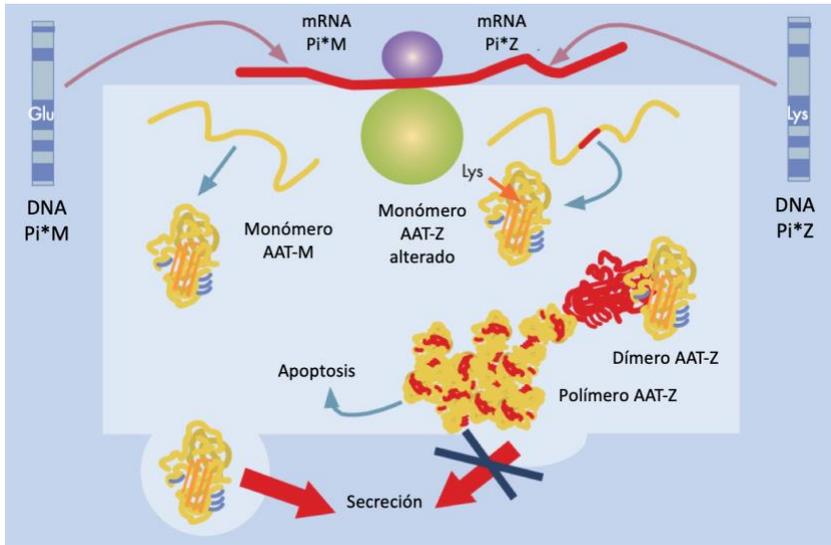


Figura 4. Proceso de formación de polímeros del alelo Pi*Z. Modificada de Solís-Herruzo & Solís-Muñoz, 2009 (49).

1.1.5. Fisiopatología

a) Fisiopatología hepática

Aunque no se conocen en profundidad los mecanismos que llevan al desarrollo de cirrosis, existe una asociación entre la presencia de polímeros de AAT en el hígado y la aparición de esta patología. En consecuencia, únicamente las variantes de AAT que polimerizan son las que, teóricamente, dan lugar a la aparición de hepatopatía (Figura 5). Estas son: el alelo Pi*Z y otras variantes menos frecuentes como la forma Siiyama (Ser53Phe) y la forma Mmalton (52Phe del). Por su parte, la variante Pi*S, en heterocigosis con el alelo Pi*Z, puede dar lugar

Introducción: Déficit de alfa-1 antitripsina

a heteropolímeros y, en algunos casos, aparecer la sintomatología hepática propia de individuos Pi*ZZ (29).

El mecanismo molecular propuesto para el desarrollo de hepatopatía comienza en el RE, donde los agregados de la AAT mutada son reconocidos por los sistemas proteolíticos de la célula y degradados por el proteasoma. Sin embargo, estos mecanismos de eliminación no siempre son suficientes. Por ello, una parte de la proteína mal plegada puede llegar al torrente sanguíneo con una capacidad proteolítica disminuida y, la otra parte, permanece en el interior celular formando cuerpos de inclusión (27). Estos acúmulos disparan una serie de procesos intracelulares que activan las rutas de autofagia y señalización de apoptosis. Para contrarrestar esta última, el factor citosólico de transcripción *kappa B* provoca un aumento en la velocidad del ciclo celular. Ciclos continuados de formación de cuerpos de inclusión, estrés celular, apoptosis y proliferación en los hepatocitos pueden conducir a necrosis, fibrosis o cirrosis del hígado, así como al desarrollo de tumores (50).

Desde el punto de vista clínico, las consecuencias hepáticas son muy variadas, lo que sugiere que hay otros factores implicados. Entre ellos se incluyen el consumo de alcohol, de medicamentos hepatotóxicos y de antibióticos, la hepatitis vírica y otras causas genéticas como una menor expresión de la

manosidasa I del RE (51). En los pacientes pediátricos Pi*ZZ se dan casos en los que no se produce ningún tipo de daño hepático, frente a otros que requieren un trasplante. Asimismo, los niños que no desarrollan hepatopatía tienen más probabilidades de tener una cirrosis o un hepatocarcinoma en la vida adulta. La expresividad clínica en los pacientes adultos Pi*ZZ comprende desde una ausencia de sintomatología con niveles alterados de las enzimas del hígado, hasta una cirrosis avanzada o un hepatocarcinoma (52). Actualmente, muchos aspectos relacionados con la enfermedad hepática del DAAT siguen sin comprenderse en profundidad y no existen marcadores fiables para conocer el pronóstico de cada paciente (27).

b) Fisiopatología pulmonar

La enfermedad pulmonar relacionada con el DAAT se manifiesta como un enfisema. El factor que más influye en su aparición y gravedad es, sin duda, el humo del tabaco. Tanto es así que, mientras la esperanza de vida media de los pacientes Pi*ZZ fumadores es de 48-52 años, la de los no fumadores alcanza los 60-68 años (27). No obstante, este no es el único factor ambiental que interviene. También influye la exposición a la contaminación y a vapores químicos y agrícolas, así como los antecedentes de asma y de neumonía (53).

Introducción: Déficit de alfa-1 antitripsina

Se han propuesto diferentes vías para el desarrollo de enfisema pulmonar en los pacientes con DAAT. Un primer mecanismo se basaría en el desequilibrio proteasa/antiproteasa. Por una parte, en estos pacientes, los niveles de AAT en los pulmones se encuentran reducidos. Por otra, la AAT mutada que consigue llegar a los pulmones tiene una menor capacidad de inhibición. Esto se ve agravado por el humo del tabaco que, como sabemos, oxida el sitio activo de la AAT, desequilibrando el balance proteasa/antiproteasa que debería proteger la matriz pulmonar, dejando así a los alveolos expuestos a la elastasa del neutrófilo y a otras proteasas que destruyen el tejido y causan el enfisema. Se considera que, para proteger el pulmón, sería suficiente un 35 % de la expresión total de la AAT, lo que implica que los individuos Pi*ZZ y Pi*SZ son los que tienen mayor riesgo de sufrir enfermedad pulmonar a lo largo de su vida (17) (Figura 5).

Introducción: Déficit de alfa-1 antitripsina

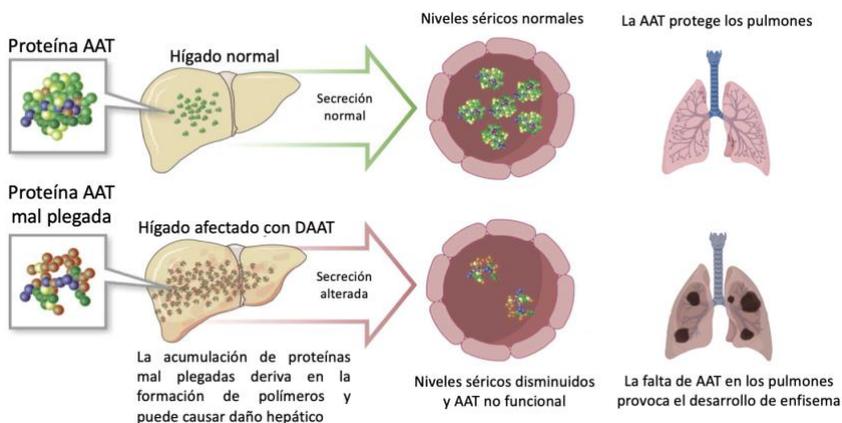


Figura 5. Esquema general de la fisiopatología del DAAT. Modificado de Turner *et al.*, 2018 (54).

Un segundo mecanismo estaría relacionado con la presencia de polímeros en los pulmones. Se ha demostrado que en las paredes de los alveolos de los pacientes Pi*ZZ se localizan polímeros de AAT, que actúan como estímulo reclutador de neutrófilos. Por ello, disminuyen la capacidad anti-elastasa de la AAT a la vez que propician un escenario proinflamatorio en el pulmón atrayendo más neutrófilos que liberan más elastasa, la cual destruye el tejido dada la falta de AAT funcional. De nuevo, el tabaco agrava este proceso ya que facilita la polimerización de la proteína (27).

Estos dos mecanismos solo explicarían el desarrollo de enfisema en los individuos con fenotipos más graves, Pi*ZZ y Pi*SZ. Sin embargo, existen casos de enfisema asociados al DAAT

Introducción: Déficit de alfa-1 antitripsina

con otros fenotipos más leves, lo que hace pensar que, además de los factores ambientales, están implicados otros mecanismos, rutas y moléculas.

Algunos estudios sugieren que la elastasa únicamente iniciaría una cascada más compleja en la que participan otras enzimas proteolíticas, en concreto, la catepsina B, las metaloproteinasas y las calicreínas, amplificando así el perfil proteolítico en los pulmones. Este escenario se revierte mediante el tratamiento con AAT aerosolizada, lo que refuerza la idea de que estos procesos contribuyen al desarrollo de enfisema pulmonar en los pacientes con DAAT (55).

La PR-3, liberada desde los gránulos del neutrófilo, parece estar implicada también, ya que es capaz de inducir apoptosis en las células endoteliales. A su vez, la poca AAT funcional presente se une a la elastasa, y la PR-3 queda sin inhibir (56).

Asimismo, en la fisiopatología del déficit está implicada la función reguladora del estrés oxidativo y de la apoptosis de las células endoteliales pulmonares de la AAT. A nivel sistémico, se ha demostrado que el estrés oxidativo aumenta en los pacientes con DAAT (57), induciendo la apoptosis de las células alveolares que, además, no cuentan con la actividad antiapoptótica protectora de la AAT (41).

c) *Otras patologías asociadas*

Además de la enfermedad hepática y pulmonar, una minoría de los individuos con mutaciones en el gen *SERPINA1* desarrollan paniculitis y vasculitis.

La paniculitis es una inflamación del tejido adiposo subcutáneo que, asociada al DAAT, solo ha sido descrita en menos de 50 casos. Normalmente se presenta en forma de nódulos eritematosos subcutáneos recurrentes en el tronco y extremidades, con elevada infiltración neutrofílica. La mayoría de los casos ocurren en individuos Pi*ZZ, aunque se han documentado algunos asociados a los fenotipos Pi*MS, Pi*SZ y Pi*MZ. Esta enfermedad no suele manifestarse junto a las demás complicaciones del DAAT, sin embargo, cuando aparece, es conveniente medir la concentración plasmática de AAT (58).

La vasculitis sistémica se asocia, en muchas ocasiones, con la presencia de anticuerpos ANCA (*anti-neutrophile cytoplasmatic antibodies*). Estos anticuerpos reconocen a la PR-3, a la elastasa y a la mieloperoxidasa. En poblaciones con anticuerpos anti-PR-3 se ha documentado una mayor proporción de fenotipos deficitarios que en la población general (59). Se ha sugerido que los niveles bajos de AAT en sangre disminuyen la inhibición de la PR-3, por lo que la hace más accesible al sistema inmunitario

puediendo desencadenarse una respuesta autoinmune que derive en una vasculitis sistémica (60).

El DAAT muestra, por tanto, una grandísima variabilidad en su expresión clínica. Muchos pacientes Pi*ZZ desarrollarán enfisema o cirrosis hepática; en muy pocas ocasiones se darán las dos patologías y en otra minoría de casos, presentará vasculitis o paniculitis. Pacientes con fenotipos deficitarios pero con niveles de AAT protectores, también pueden padecer estas enfermedades, y más de la tercera parte de los individuos con DAAT no presentará complicaciones clínicas a lo largo de su vida (1).

1.1.6. Diagnóstico

El DAAT es una patología altamente infradiagnosticada y con un evidente retraso en la obtención del diagnóstico. Como ocurre con la mayoría de las enfermedades raras, los pacientes se ven obligados a visitar a diferentes médicos y esperar una media de ocho años hasta conocer qué enfermedad padecen dado que los síntomas iniciales son muy similares a los de otras patologías más prevalentes.

a) Recomendaciones para el diagnóstico

Tanto la *American Thoracic Society* (ATS) y la *European Respiratory Society* (ERS), como la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomiendan sospechar un DAAT en los siguientes casos (61):

- Aparición temprana de enfisema pulmonar, independientemente de si es fumador o no
- Individuos con familiares diagnosticados de DAAT
- Disnea, tos y/o enfermedad hepática de origen desconocido en diferentes miembros de la misma familia, que afecten a una o más generaciones
- Todos los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)
- Adultos con bronquiectasias de etiología desconocida
- Pacientes asmáticos en los que la terapia no restituye los valores normales de la espirometría
- Paniculitis y vasculitis antiproteinasa-3 idiopáticas

b) Pruebas de laboratorio

Ante una de las sospechas de DAAT anteriores, debe confirmarse el diagnóstico con pruebas cualitativas y cuantitativas.

Introducción: Déficit de alfa-1 antitripsina

El diagnóstico cuantitativo del DAAT consiste en determinar la concentración en plasma, o suero, de la AAT. Se puede hacer mediante diferentes técnicas, entre otras: inmunolectroforesis en cohete (62), inmunodifusión radial (63) o nefelometría (64), esta última es la más utilizada actualmente (65). Se consideran niveles protectores de AAT los superiores a 11 $\mu\text{mol/L}$ o 50 mg/dL, si se mide mediante nefelometría, que corresponden a 80 mg/dL, si se mide mediante inmunodifusión radial. Los fenotipos con valores por encima de este umbral tienen menor probabilidad de desarrollar enfisema, en cambio, los que se encuentran por debajo se consideran de mayor riesgo (67) (Figura 6). A la hora de cuantificar la proteína, cabe destacar que es un reactante de fase aguda y que, por tanto, en condiciones de inflamación, infección, embarazo o consumo de anticonceptivos orales, sus niveles en sangre están aumentados, pudiendo dar lugar a error en el diagnóstico (61). Es por esto por lo que en los últimos años se aconseja medir también los niveles de proteína C reactiva, como marcador de la fase aguda. Si estos están elevados, no se podrá determinar los niveles de AAT hasta que no se normalicen los de la proteína C reactiva (67).

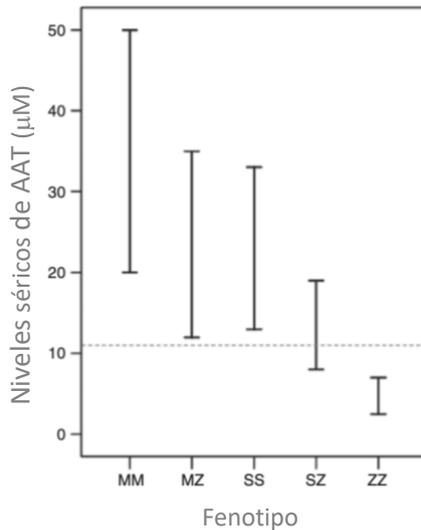


Figura 6. Niveles séricos de AAT en los diferentes fenotipos respecto al valor umbral protector (línea discontinua). Modificada de Tonelli y Brantly (2010) (67).

Cuando se detecta una concentración de AAT en sangre por debajo de la normalidad, para completar el diagnóstico se debe realizar una prueba cualitativa que indique qué variante, o variantes, de AAT posee el individuo. Para ello, la prueba más extendida es el IEF que, partiendo de suero o plasma, permite discernir entre la mayoría de las formas de AAT al separarlas electroforéticamente según su punto isoeléctrico (68). Esta técnica requiere experiencia y debe realizarse en laboratorios de referencia.

No obstante, muchas variantes no pueden ser detectadas por IEF porque tienen puntos isoeléctricos muy similares a otras

formas más prevalentes. Para poder identificar inequívocamente los dos alelos del gen *SERPINA1* se debe recurrir al diagnóstico a nivel molecular, conocido como genotipado, que se realiza sobre muestras de DNA. El análisis puede llevarse a cabo mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) (69), digestión con enzimas de restricción (70) o aplicando la tecnología Luminex, como en el ensayo desarrollado por Progenika (Grifols), que detecta los 14 alelos más frecuentes en un único ensayo (71).

En caso de no detectar ninguna mutación podría tratarse de una nueva variante, por lo que habría que realizar una secuenciación completa del gen *SERPINA1* (61).

1.1.7. Tratamiento

Actualmente el único tratamiento específico del DAAT es la terapia aumentativa que no tiene efecto sobre la enfermedad hepática y se aplica, únicamente, en los casos más graves de enfisema pulmonar. Además, según la patología que manifieste cada paciente, se utilizan también tratamientos sintomáticos generales.

a) Tratamiento respiratorio

Aunque el mecanismo es mucho más complejo, si entendemos el enfisema pulmonar como el resultado del desequilibrio entre la actividad proteasa/antiproteasa del tejido, la terapia aplicada para tratarlo podría seguir dos estrategias: disminuir la capacidad proteasa o incrementar la capacidad antiproteasa.

Para disminuir la capacidad proteasa se han dedicado muchos esfuerzos a desarrollar un inhibidor de la elastasa. No obstante, a día de hoy, todavía no se ha conseguido un fármaco con la suficiente potencia, selectividad y estabilidad metabólica. Hace falta más estudios y ensayos clínicos para aportar la prueba de concepto a favor de la eficacia clínica de estos inhibidores (72).

La otra posibilidad es aumentar la actividad antiproteasa del organismo. Se puede abordar desde el incremento de la producción endógena de AAT o desde la administración exógena de la misma.

Con el fin de incrementar los niveles endógenos de secreción de AAT en el hígado, se han aplicado tratamientos hormonales como el danazol, el tamoxifeno, o combinaciones de estrógenos y progesterona. De estas estrategias, el único compuesto que parece tener cierto efecto, en individuos con fenotipo Pi*SZ, es

el tamoxifeno (66). La producción de AAT endógena también se puede aumentar actuando sobre la polimerización y plegamiento de la proteína en el hígado (73).

Pese a los distintos abordajes terapéuticos que se han investigado, la administración exógena de AAT, o terapia aumentativa, es el único tratamiento para el DAAT aprobado por la FDA y la Agencia Europea del Medicamento (EMA). Consiste en la administración intravenosa de la proteína AAT procedente del plasma de donantes sanos con la finalidad de aumentar la concentración plasmática y alcanzar valores por encima del umbral protector. Únicamente está indicada en pacientes con niveles séricos menores a 11 μM y enfisema pulmonar grave, con el objetivo de ralentizar la progresión de esta enfermedad (66).

En general, es una terapia bien tolerada, con muy pocos efectos adversos asociados, y también es segura en tanto en cuanto no se han detectado casos de contagios de VIH o de hepatitis relacionados con su aplicación. Solo presenta dos contraindicaciones: hipersensibilidad a alguno de sus componentes o déficit selectivo de inmunoglobulina A (66).

Existe cierta controversia alrededor de esta terapia debido a que, pese a las evidencias del aumento en la concentración de AAT en el plasma, su acción sobre la mejora del enfisema

pulmonar, la disminución de morbilidades y el aumento de la supervivencia no son tan evidentes. El estudio más relevante al respecto es el ensayo RAPID (*Randomised trial of augmentation therapy in alpha-1 proteinase inhibitor deficiency*), en el que participaron 180 pacientes de 13 países con enfisema pulmonar ligado al DAAT y valores previos del volumen de aire exhalado en un segundo (FEV₁) entre 35 y 70 %. Los resultados obtenidos, tras cuatro años de seguimiento, indicaron que, en comparación con el placebo, la terapia aumentativa mejoraba la supervivencia y ralentizaba el desarrollo de enfisema pulmonar (Identificador de *ClinicalTrials.gov*: NCT00261833) (16).

Este tratamiento está indicado por la ATS/ERS en pacientes con un FEV₁ menor del 65 % y niveles plasmáticos de AAT por debajo del umbral de 11 µM, con una dosis semanal de 60 mg/kg de peso (61). En España, la administración de la terapia aumentativa implica el desplazamiento del paciente a los centros hospitalarios. Además, el coste del tratamiento es muy elevado, hasta tres veces superior al de un paciente con EPOC sin DAAT (74). Pese a esto, al no existir otro tratamiento, la terapia aumentativa continúa estando indicada como la única alternativa para frenar el desarrollo del enfisema pulmonar derivado del DAAT.

Introducción: Déficit de alfa-1 antitripsina

También se ha probado la administración de la AAT por vía inhalatoria. La principal desventaja es que, en situaciones de obstrucción bronquial grave, la deposición de partículas es menor. En cambio, presenta importantes ventajas como la mayor comodidad para el paciente y la posibilidad de aplicar dosis más bajas (75). Un ensayo clínico de fase I/II (Identificador de *ClinicalTrials.gov*: NCT01217671) ha evaluado la seguridad y eficacia del tratamiento con AAT inhalada durante 50 semanas. El principal resultado fue que, aunque el tratamiento con AAT inhalada no retrasaba la aparición de exacerbaciones, parecía disminuir la gravedad y naturaleza de las mismas con un perfil seguro (76).

Actualmente, la única fuente de AAT para su administración intravenosa es la purificación de la proteína a partir del plasma humano de donantes sanos. Para poder obtenerla a gran escala y de forma económica se están investigando otras fuentes. Se trató de purificar la AAT humana a partir de leche de ovejas transgénicas, pero causó reacciones alérgicas al aplicarse en humanos provocadas por restos de la AAT ovina (77). También se ha purificado la AAT humana recombinante a partir de bacterias, levaduras, hongos, células de insectos y células de mamífero. No obstante, no se ha conseguido reproducir el patrón de glicosilación de la AAT derivada de plasma de donante

y se desconoce la eficacia y seguridad para su aplicación en humanos (78).

b) Tratamiento hepático

No existe un tratamiento específico para la hepatopatía asociada al DAAT, por lo que en ella se aplican las mismas medidas de prevención y apoyo que en otras enfermedades hepáticas.

Inicialmente se recomienda vacunar contra la hepatitis A y B a todos los pacientes con DAAT. Debe evitarse la obesidad para prevenir la aparición de hígado graso no alcohólico, el consumo de antiinflamatorios no esteroideos (79) y la ingesta de alcohol (1).

La aparición de cirrosis o de hepatocarcinoma puede dar lugar a la necesidad de un trasplante hepático. En la edad pediátrica, el DAAT es la enfermedad hepática metabólica más común en la que se indica trasplante de hígado con una supervivencia muy alta a los tres años, alrededor del 85 %. Esta alternativa se precisa muy pocas veces en la población adulta y en ellos, la supervivencia es mucho menor, similar a la del trasplante por otras indicaciones. Esta opción terapéutica podría plantearse como una solución definitiva, ya que el receptor adquiere el fenotipo del donante y normaliza la concentración de AAT. Sin embargo, se desconoce si esto retrasaría o impediría

realmente la aparición de enfermedad pulmonar dado que el daño ocasionado previamente no se podría revertir, además del riesgo intrínseco evidente ligado a la realización del propio trasplante (80).

Dado que la aparición de patología hepática en pacientes con DAAT está muy relacionada con la polimerización de la proteína mutante en los hepatocitos, existe la posibilidad de un tratamiento que impida la formación de estos polímeros. Para ello, se han estudiado diferentes bloqueadores de la polimerización y chaperonas. En 2015, se identificó una prometedora molécula, el S-(4-nitrobencilo)-6-tioguanosina, con capacidad de impedir la polimerización de la AAT-Z ya que ocupa la cavidad generada por la mutación y evita la unión de las moléculas de AAT. Aunque se obtuvieron buenos resultados *in vitro*, existen todavía limitaciones para hacer llegar a esta molécula al RE del hepatocito *in vivo* (73). Respecto a las chaperonas sintéticas desarrolladas, destaca el 4-fenilbutirato (4-BPA) que, aplicado sobre tejidos y modelos animales, da lugar a un incremento de los niveles de AAT secretados. Sin embargo, en un ensayo preliminar en 10 pacientes con DAAT a los que se administró 4-BPA, no se observó un incremento en la concentración plasmática de AAT y, en cambio, se reportaron graves efectos adversos gastrointestinales (81).

1.2. Terapia génica

1.2.1. Terapia génica: consideraciones generales

La terapia génica (TG) es una técnica que corrige los defectos genéticos causantes de enfermedad mediante la utilización de ácidos nucleicos que son capaces de introducir nuevas funciones o copias sanas de un gen, de modular la expresión génica o de editar la información genómica del individuo para reparar una mutación (82).

En términos generales, se pueden seguir dos estrategias. Una de ellas se llevaría a cabo *in vivo* (Figura 7b), es decir, mediante la introducción directa en el paciente del material genético de interés como, por ejemplo, la terapia de aumento genético, en la que se introduce el gen que codifica la proteína que no se expresa correctamente. La otra, *ex vivo* (Figura 7a), sería la obtención de células del paciente para modificarlas genéticamente en el laboratorio e injertarlas posteriormente en el mismo individuo (83).

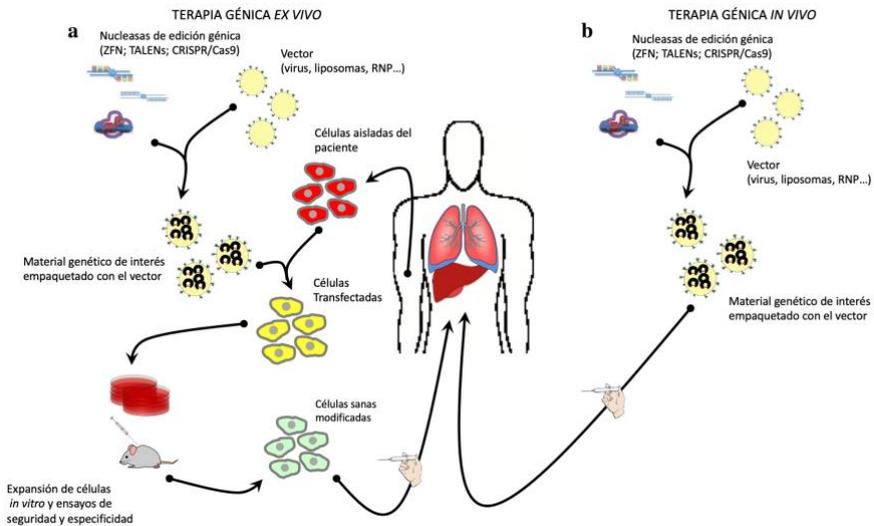


Figura 7. Diferentes métodos de aplicación de la TG. Modificado de Torres-Durán *et al.*, 2018 (84).

a) Breve historia de la terapia génica

Todo comenzó en 1972, cuando Theodore Friedmann y Richard Roblin, basándose en resultados previos obtenidos en células de mamífero, se preguntaron si era posible tratar enfermedades humanas mediante modificaciones genéticas. Frente a los tratamientos tradicionales, la TG ofrecía una importante ventaja: la posibilidad de que con una única actuación los efectos terapéuticos fueran permanentes, evitando así los tratamientos crónicos. En ese momento, los autores reconocían ciertas limitaciones para su aplicación en humanos, pero apostaban por continuar investigando para que

la TG pudiera ser segura y eficaz (85). Desde aquella publicación han pasado 50 años de avances y retrocesos en un recorrido lleno de obstáculos, que todavía no ha llegado a su fin.

Los primeros ensayos clínicos se llevaron a cabo a principios de los años 90. Estos transcurrieron con normalidad hasta 1999, cuando se estaba llevando a cabo un ensayo clínico para el tratamiento del déficit de ornitina transcarbamilasa (OTC), en el que se administraban tres dosis diferentes de un vector adenoviral que expresaba la OTC. El ensayo se llevó a cabo sin efectos adversos graves durante dos años hasta que uno de los pacientes murió 4 días después de recibir el tratamiento, debido a una reacción inflamatoria sistémica y a un fallo orgánico múltiple (86). A raíz de este y otros resultados negativos, se detuvieron los ensayos clínicos y se volvió a poner el foco en la investigación básica.

Sin embargo, en la última década el número de ensayos clínicos relacionados con la TG no ha dejado de crecer, cada vez con mejores resultados. Luxturna, un fármaco desarrollado por Novartis para la ceguera hereditaria provocada por mutaciones en el gen *RPE65*, fue la primera TG aprobada por la FDA en 2017. Consiste en un vector adenoviral que expresa una copia sana del gen afectado y que es inyectado directamente en la retina, dando lugar a una mejoría de la visión de los pacientes (87). Hoy

en día, cerca de 20 tratamientos con TG han sido aprobados por la FDA y se están llevando a cabo múltiples ensayos clínicos para desarrollar otros nuevos.

b) Edición génica

A principios de los años 2000 comienzan a desarrollarse las herramientas de edición génica con las que contamos hoy en día: ZFNs (*zinc finger nucleases*); TALENs (*transcription activator–like effectors nucleases*); y el sistema CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/endonuclease Cas9*). A partir de este momento, se amplía el rango de posibilidades de la TG. No solo se puede introducir genes o moléculas de RNA, sino que es posible producir cambios específicos en puntos concretos del genoma que serán permanentes en la célula y en todos sus clones.

En general, las herramientas de edición génica constan de dos elementos: uno que media la unión específica a una secuencia diana del genoma y otro, una enzima nucleasa, que producirá un corte de doble cadena (DSB) en ese punto. La célula reparará este daño mediante dos rutas alternativas: la recombinación no homóloga (NHEJ) o la recombinación directa por homología (HDR). La NHEJ provoca la introducción o delección aleatoria de algunos pares de bases, de manera que da lugar a pequeñas inserciones o deleciones que interrumpen la

pauta de lectura del gen, generando un *knock-out*. Por otra parte, la ruta HDR corrige el daño por recombinación con una secuencia homóloga, que es copiada en el genoma. Por tanto, en presencia de una molécula de DNA molde homóloga al sitio diana, se podrá introducir un cambio específico o corregir una mutación puntual (88) (Figura 8).

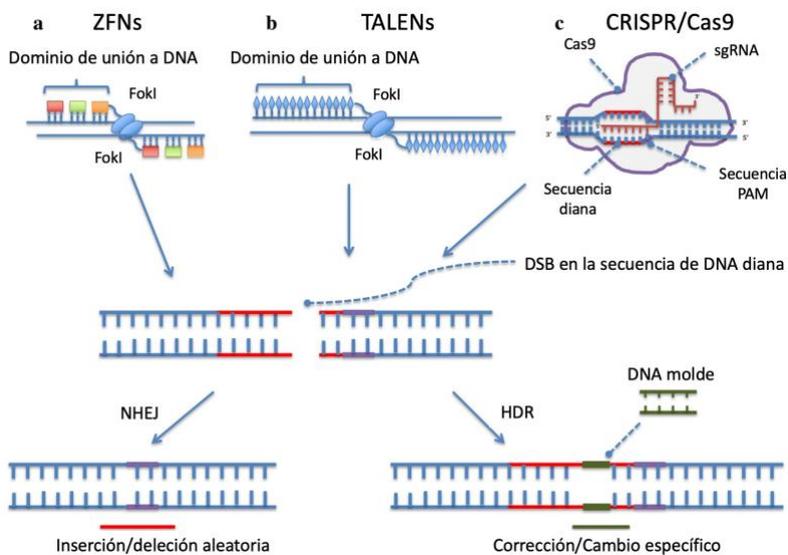


Figura 8. Herramientas de edición génica y su funcionamiento. Modificado de Torres-Durán *et al.*, 2018 (84).

La primera herramienta que se desarrolló para la edición génica fueron los ZFNs. Para ello, se aprovechó la capacidad de reconocimiento de secuencias de DNA que presentan los dedos de zinc. Estas proteínas reconocen de forma específica tres

pares de bases del genoma. Su naturaleza modular permite combinar diferentes dedos de zinc para reconocer una secuencia específica de DNA (89). A la estructura proteica con los dedos de zinc diseñados para reconocer un gen diana se une el dominio catalítico de FokI, una endonucleasa. FokI necesita dimerizar para producir un DSB, de manera que deben diseñarse dos ZFNs que se unan a la secuencia diana en la orientación adecuada, dejando el espacio necesario para que la nucleasa dimerice y corte la doble cadena (90) (Figura 8a).

La capacidad de los ZFNs de interrumpir la expresión de un gen se ha aplicado en diversos ensayos clínicos, entre los que destacan los dirigidos al tratamiento del VIH (91), de algunos tipos de cáncer como el glioblastoma (92) y de algunas hemoglobinopatías, como la β -talasemia dependiente de transfusiones (TDT) o la anemia falciforme (SCD) (93). Pese a los resultados prometedores de las fases I/II, dada la complejidad de generar ZFNs, en la mayoría de los casos no se ha progresado a las siguientes fases de los ensayos clínicos.

Más tarde, en 2009, se describieron los TALENs (Figura 8b). Esta herramienta se basa en unos factores de virulencia de la proteobacteria *Xanthomonas*, un patógeno de plantas, que se unen a los genes del hospedador y modifican su expresión para facilitar la infección. Consisten en una batería de repeticiones de

30-35 aminoácidos, cada una de las cuales reconoce una única base del DNA (94). De la misma manera que los ZFNs, estas proteínas se han fusionado con el dominio catalítico de la endonucleasa FokI para formar los TALENs, que pueden dirigirse contra prácticamente cualquier secuencia del genoma (95).

Una de las principales aplicaciones clínicas de los TALENs ha sido la edición de las denominadas células CAR-T (*chimeric antigen receptor T cell*). Son linfocitos T alterados para expresar un receptor quimérico, CAR, diseñado para reconocer un antígeno de interés. El desarrollo de las CAR-T modificadas con TALENs ha dado lugar a diversos ensayos clínicos para su aplicación como terapia celular contra algunos tipos de cáncer hematológico, como, por ejemplo, la leucemia linfoblástica aguda de células B (96, 97,98).

El desarrollo de terapias celulares con TALENs está en sus primeras fases, pero dado los resultados obtenidos hasta ahora, es de esperar que finalmente acabe dando lugar a tratamientos efectivos y seguros.

Por último, en 2012 se describió por primera vez el sistema CRISPR/Cas9 como herramienta de edición génica (99,100), descrita en mayor profundidad más adelante (Figura 8c). Su simplicidad, tanto de diseño como de técnica, ha provocado que se extienda rápidamente por los laboratorios de todo el mundo.

En pocos años ha sufrido una gran evolución y se han desarrollado múltiples aplicaciones. La relevancia de esta herramienta en la investigación biomédica actual se refleja en el incremento, año tras año, del número de publicaciones relacionadas (Figura 9).



Figura 9. Número de publicaciones en PubMed relacionadas con CRISPR/Cas9 por años. Datos recogidos en noviembre de 2021.

c) Vectores

Para poder llevar a cabo una TG, el primer paso es introducir el material genético en la célula o en el organismo. Esto requiere un vehículo diseñado para este fin, que denominamos vector. Los vectores deben ser eficientes en la transfección, poco citotóxicos y alterar lo menos posible la fisiología normal de la célula. Se dividen en dos categorías: virales y no virales.

i. Vectores virales

Los vectores virales aprovechan la capacidad biológica de los virus para infectar las células diana e introducir el material genético de interés. Esto se consigue reemplazando los genes virales responsables de la patogenicidad por el transgén deseado. Se utilizan diferentes tipos de virus como vectores: retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adeno-asociados (AAV) y virus herpes simple (HSV). Cada uno de ellos presenta diferentes características con relación al tipo de ácido nucleico, tamaño del inserto, integración en el genoma hospedador, duración de la expresión del transgén o inmunogenicidad (Tabla 1). Esta variabilidad permite la adaptación a diferentes diseños experimentales.

Los vectores virales son los más utilizados en la investigación en TG y los más ampliamente estudiados en los ensayos clínicos realizados hasta la fecha.

Tabla 1. Características de los vectores virales (101).

	<i>GENOMA</i>	<i>TAMAÑO INSERTO</i>	<i>INTEGRACIÓN</i>	<i>RESPUESTA INMUNE</i>	<i>EXPRESIÓN</i>
RETROVIRUS	RNA	10 Kb	Sí	Baja	Larga
LENTIVIRUS	RNA	10 Kb	Sí	Baja	Larga
ADENOVIRUS	dsDNA	35 Kb	No	Alta	Transitoria
AAV	ssDNA	4 Kb	Poco eficiente	Baja	Larga
HERPES SIMPLE	dsDNA	30 Kb	No	Fácil de controlar	Larga

ii. Vectores no virales

Los vectores no virales son más fáciles de producir, más seguros y menos inmunogénicos. Tradicionalmente, la principal desventaja era que alcanzaban niveles de transfección más bajos que los vectores virales. No obstante, esta diferencia es cada vez menor (83). A su vez, estos vectores pueden dividirse en dos grupos: físicos y químicos.

- Vectores físicos

Los vectores físicos emplean métodos mecánicos para alterar la integridad de las membranas celulares y conseguir así que los ácidos nucleicos exógenos penetren en el interior celular. Estas técnicas incluyen: diversas formas de inyección, la

transferencia génica hidrodinámica, la biobalística, la electroporación y la sonicación.

La inyección de DNA o RNA desnudo, directamente en el tejido u órgano diana, es la forma más simple de introducir material genético en la célula. Esta técnica es segura, pero los niveles de transfección son bajos y la penetración de los ácidos nucleicos se da sobre todo en las células cercanas al punto de inyección (102).

Otra alternativa es realizar la inyección directamente en el interior del núcleo celular. A esta técnica se le llama microinyección y, aunque es muy eficaz, requiere gran experiencia y es compleja y laboriosa. Actualmente se utiliza sobre todo para la creación de animales transgénicos o fecundación *in vitro* (82).

La transferencia génica hidrodinámica es la técnica no viral con mayor eficiencia de transfección en roedores. Consiste en la inyección de un gran volumen de DNA (alrededor de una décima parte del peso del cuerpo) disuelto en solución salina, en un corto período de tiempo a través de la vena de la cola del animal, generando una permeabilidad temporal en las membranas celulares (82). Pese a ser prometedora en roedores, esta técnica presenta graves efectos adversos en humanos. Para buscar una aplicación segura en personas, se ha llevado a cabo en animales

más grandes como el cerdo, en el que se selló quirúrgicamente el hígado (103) y también se han transfectado secciones de hígado humano *ex vivo* (104).

En la biobalística, se recubren moléculas de algún metal pesado como oro, plata o tungsteno con las moléculas de DNA que se quieren introducir en la célula diana. Estas partículas se aceleran con gas presurizado, se “disparan” sobre el tejido y el impacto permite que las moléculas de DNA penetren en las células. La aplicación más extendida es la transfección de plantas. No obstante, se utiliza también en bacterias, hongos, células de mamíferos o incluso para la inmunización genética directa intradermal, intramuscular e intratumoral en modelos animales y humanos (82).

Para el desarrollo de esta tesis doctoral, una de las técnicas de transfección utilizadas ha sido la electroporación, utilizando la subunidad X del equipo Amaxa™ 4D-Nucleofector™ (AAF-1002B, Lonza). Con este método se aumenta la conductividad y permeabilidad de las membranas celulares mediante la aplicación de pulsos eléctricos que crean poros en ellas y a través de estos, moléculas como los ácidos nucleicos pueden penetrar en el interior celular (105).

Por último, la sonicación, que es segura, no invasiva y permite alcanzar órganos internos. Se basa en ciclos de

ultrasonidos dirigidos contra el tejido de interés que como resultado se calentará, afectando así a la integridad de las membranas plasmáticas (102).

- Vectores químicos

Los vectores químicos son los más usados en investigación. En general, se basan en la formación de complejos con carga neta positiva entre los ácidos nucleicos y otras macromoléculas que son atraídos por las cargas negativas de las membranas celulares. Son métodos seguros, poco tóxicos y no limitan el tamaño del material genético que se introduce. Sin embargo, son poco utilizados *in vivo* ya que la eficiencia de transfección alcanzada es muy pequeña (106).

La lipofección es el método de transfección no viral más extendido en la investigación. El DNA se introduce en las células gracias a su interacción con lípidos catiónicos. La estructura básica de estos lípidos es una cabeza hidrofílica cargada positivamente y una cola hidrofóbica. Al interaccionar los grupos fosfatos del DNA con las cabezas de los lípidos, se forman unas estructuras denominadas lipoplejos en las que el DNA se encuentra protegido por las colas de los lípidos. Los lipoplejos penetran por endocitosis en el interior celular donde el DNA debe escapar a la degradación en los lisosomas para penetrar en el núcleo celular (Figura 10). Esta técnica es fácil de aplicar y

permite la introducción de grandes fragmentos de DNA, sin embargo, la eficiencia de transfección es limitada (102).

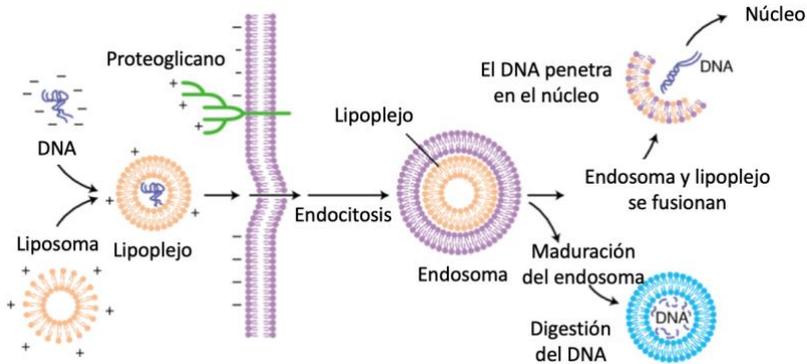


Figura 10. Proceso de formación de lipoplejos y penetración en el interior celular. Modificado de Parker et al., 2004 (107).

En aplicaciones *in vivo* la lipofección es un método poco utilizado ya que la vida media de los lipoplejos en sangre es corta y además, pueden producir una respuesta inmune en el receptor (102).

En la presente tesis doctoral se han utilizado los reactivos de transfección Lipofectamina™ 3000 (L3000015, Thermo Fisher Scientific) y Lipofectamina™ CRISPRMAX™ (CMAX00003, Thermo Fisher Scientific), basados en la tecnología de nanopartículas de lípidos para la formación de lipoplejos.

Por otra parte, el material genético de interés puede asociarse con polímeros catiónicos para formar poliplejos, más

estables que los lipoplejos y menos inmunogénicos, capaces de interaccionar con las proteínas de las membranas celulares para penetrar en ellas. Pueden ser naturales, a partir de péptidos y proteínas, o sintéticos como los dendrímeros, los polifosfoésteres o la polietilenimina (PEI), uno de los polímeros más utilizados y efectivos, aplicado también en algunos de los ensayos llevados a cabo en este trabajo (108). Al administrarse sistémicamente, los poliplejos forman grandes complejos que se almacenan sobre todo en el pulmón o en el hígado y la producción de citocinas es menor que la inducida por lipoplejos (102).

Las moléculas de DNA o RNA también pueden asociarse a partículas inorgánicas para aprovechar la capacidad natural de las células de captar estos elementos. Las nanopartículas inorgánicas son fáciles de preparar y almacenar y, además, son poco tóxicas. Sin embargo, la eficiencia de transfección no es muy alta y es importante proteger el DNA del ataque de las nucleasas intracelulares. Los materiales inorgánicos que se han utilizado como vectores son: fosfato de calcio, nanotubos de carbón, sílice, oro, magnetita, fosfato de estroncio, fosfato de manganeso e hidróxidos dobles (109).

1.2.2. CRISPR/Cas9

a) Descubrimiento y evolución

En 1987, Yoshizumi Ishino detectó, en la secuencia del genoma de *Escherichia coli*, un *locus* que presentaba unas repeticiones con un patrón muy particular (110). Años más tarde, en 1993, el Dr. Mojica, que estaba realizando su tesis doctoral en la Universidad de Alicante, observó esta misma estructura repetitiva en el material genético de las arqueas de la especie *Haloferax mediterranei*. Dicha estructura consistía en repeticiones recurrentes, de entre 24 y 40 nucleótidos, regularmente espaciadas por secuencias variables de aproximadamente el mismo tamaño (111). Posteriormente, estas mismas repeticiones, ya bautizadas como CRISPR, aunque de función todavía desconocida, fueron observadas en otras especies de bacterias y arqueas. No fue hasta principios de los años 2000 cuando el Dr. Mojica y su grupo se dieron cuenta de que las secuencias espaciadoras del *locus* CRISPR eran homólogas a otras encontradas en bacteriófagos, profagos y plásmidos. Además, observaron que otorgaban resistencia a la infección por estos elementos. Así, por primera vez, se describió su función como parte de la respuesta inmunitaria adquirida de las bacterias y arqueas (112).

De forma paralela, se detectaron una serie de genes siempre adyacentes a las repeticiones CRISPR, a los cuales se denominó Cas (*CRISPR-associated*). Por homología, se infirió que las proteínas codificadas por estos genes podrían estar relacionadas con el metabolismo del DNA (113).

En la primera década del 2000, diferentes publicaciones lo confirmaron experimentalmente y profundizaron en el funcionamiento del sistema CRISPR/Cas como sistema de defensa procariota hasta crear el modelo molecular que conocemos actualmente. Cuando un DNA extraño, como el de un virus, penetra en la célula procariota, las proteínas Cas lo fragmentan e incorporan a la región CRISPR, delimitado por las secuencias repetitivas. La transcripción de este *locus* da lugar a una molécula de RNA que presenta una estructura con una parte invariable, correspondiente a las repeticiones CRISPR, y otra parte variable, proveniente del DNA espaciador, es decir, del material genético del virus. De esta forma, ante una nueva infección del mismo virus, el DNA viral es capturado por la molécula de RNA complementaria. Esta unión guiará a las proteínas Cas, que formarán un complejo que, debido a su actividad nucleasa, degradará el material vírico y se detendrá la infección (114) (Figura 11).

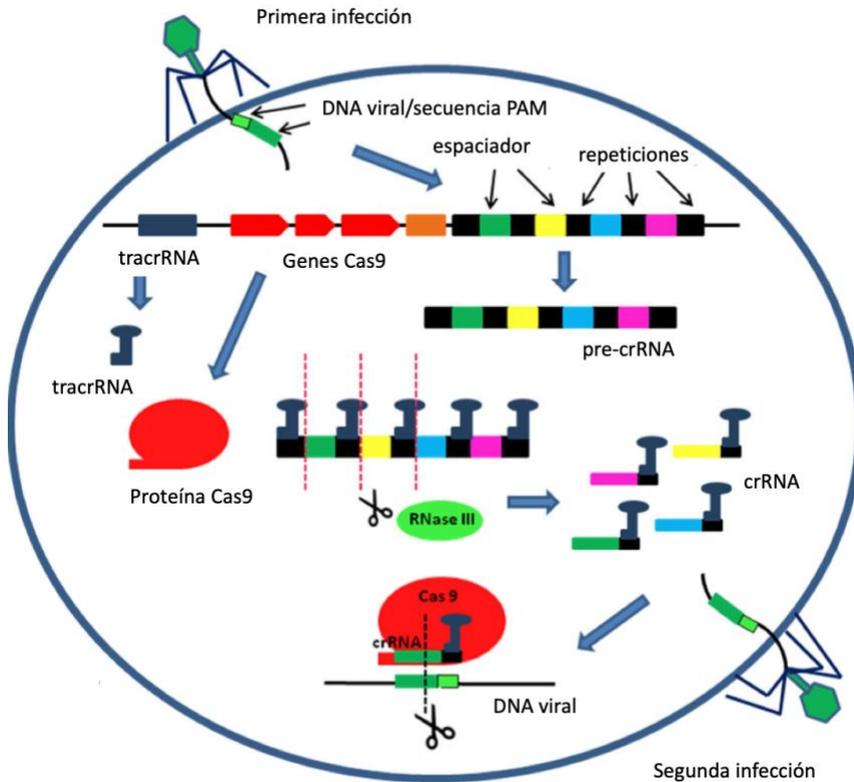


Figura 11. Inmunidad adquirida en bacterias y arqueas mediante CRISPR/Cas. Modificado de Hryhorowicz et al., 2016 (115).

Hasta la fecha, se han descrito multitud de sistemas CRISPR/Cas existentes en diferentes especies de arqueas y bacterias. En general, todos ellos son capaces de producir cortes en los ácidos nucleicos diana dirigidos por moléculas guía de RNA. Existen dos clases de sistemas CRISPR/Cas, divididos en seis tipos y al menos 29 subtipos (116). Los sistemas de clase 1

incluyen los tipos I, III y IV y requieren complejos formados por múltiples proteínas para cortar el DNA. En los sistemas de clase 2 el corte en el DNA es realizado por una única proteína e incluye los tipos II, V y VI (117).

En 2012, dos publicaciones independientes señalaron el potencial del sistema, en concreto uno de clase II que utilizaba la nucleasa Cas9, para su aplicación en la edición génica. Estos estudios revelaron que para producir un DSB en una secuencia de DNA específica bastaba con sintetizar una molécula de RNA complementaria que dirigiera la proteína Cas9 a esa región del genoma (99,100). Desde ese momento, comenzaron a describirse nuevas variantes y funciones, al mismo tiempo que se desarrollaban herramientas que facilitaban su diseño y aplicación. Actualmente, muchas enfermedades han sido abordadas mediante la edición con CRISPR/Cas9 y hay en marcha múltiples ensayos clínicos. Entre los autores más relevantes en el descubrimiento y evolución de este sistema como herramienta de edición génica se encuentran: la Dra. Emmanuelle Charpentier, la Dra. Jennifer Doudna y el Dr. Feng Zhang, las dos primeras galardonadas con el Premio Nobel de Química en 2020.

b) Componentes

En edición génica, la adaptación del sistema CRISPR de clase II de *Streptococcus pyogenes* es la más extensamente utilizada. Para su aplicación se requieren dos elementos: una molécula de RNA guía de simple cadena (sgRNA) y la nucleasa Cas9.

La sgRNA consta de dos moléculas de RNA denominadas RNA-CRISPR (crRNA) y RNA trans-activador del crRNA (tracrRNA). La primera, contiene 20 nucleótidos complementarios a la secuencia diana del genoma y se une por su extremo 3' al tracrRNA, un pequeño RNA no codificante que cumple dos funciones. Primero, desencadena la maduración del pre-crRNA y segundo, es necesario en la unión y corte del DNA por la Cas9 (99,118). Actualmente, la sgRNA se sintetiza como una única molécula con la misma composición y estructura que el complejo crRNA:tracrRNA.

La nucleasa Cas9 es una proteína de 163 kDa que contiene dos dominios con actividad endonucleasa: el dominio RuvC, próximo al extremo N-terminal, y el dominio HNH ubicado en el centro de la proteína. Cada uno de ellos corta una de las dos cadenas del DNA para dar lugar al DSB. La cadena del DNA a la que se une la sgRNA, se denomina cadena +, mientras que la cadena – es aquella a la que no se une la sgRNA. La cadena + es cortada por HNH y la cadena –, por RuvC (100).

Para que el complejo sgRNA-Cas9 reconozca la secuencia diana y produzca el DSB es necesario que en el extremo 3' de la cadena – se encuentre un triplete NGG, conocido como motivo adyacente del protoespaciador (PAM). La guía no debe incluir la secuencia PAM, sino que esta se localiza en el DNA diana inmediatamente después de la secuencia de unión a la sgRNA. El complejo sgRNA-Cas9 producirá el DSB a 3 nucleótidos de distancia de la secuencia PAM (119) (Figura 12).

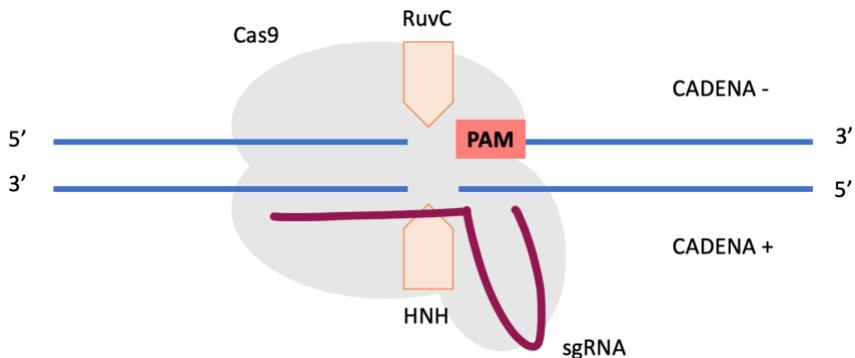


Figura 12. Complejo sgRNA-Cas9 unido a la secuencia diana en la que ha generado un DSB debido a la acción de los dominios catalíticos RuvC y HNH.

c) Introducción en las células

Con el fin de conseguir una edición del genoma eficiente es imprescindible que todos los componentes del sistema CRISPR/Cas9 logren penetrar en el interior celular. Generalmente, esto se ha realizado en células en cultivo a través de plásmidos que expresan la Cas9 y la guía, o bien uno solo que

codifica toda la información o bien, dos plásmidos independientes (120). No obstante, su uso puede dar lugar a la inserción del plásmido en el genoma de la célula huésped, provocando una respuesta del sistema inmunitario o alterando el ciclo celular. Además, la expresión continuada del plásmido aumenta la probabilidad de actividad inespecífica, también denominada *off-target*, del sistema CRISPR/Cas9 (121).

Una alternativa es la transfección celular con ribonucleoproteínas (RNP), como se ha realizado en el presente trabajo. Las RNP están formadas por una proteína asociada a una molécula de RNA, en este caso: la Cas9 purificada y la sgRNA sintetizada *in vitro*. Este complejo se puede introducir eficientemente en las células, por electroporación o mediante el uso de lipofectaminas. La transfección con RNP da lugar a altas tasas de corte en el sitio diana y reduce la probabilidad de actividad *off-target*, ya que son degradadas por la célula al poco tiempo (122).

d) Aplicaciones en edición génica

Las aplicaciones más extendidas de CRISPR/Cas9 son la interrupción de genes a través de la reparación por la vía NHEJ y la corrección de mutaciones específicas, siguiendo la vía HDR. Sin embargo, no son las únicas. Se han descrito múltiples

alternativas que han permitido optimizar y ampliar el rango de aplicaciones del sistema CRISPR/Cas (Tabla 2).

Tabla 2. Aplicaciones y nuevas variantes de CRISPR/Cas9.

<i>APLICACIÓN</i>	<i>SISTEMA</i>	<i>CARACTERÍSTICAS</i>
INSERCIÓNES Y DELECCIONES DIRIGIDAS	CRISPR/Cas9	Se introducen dos sgRNA, el DNA comprendido entre ambos sitios de unión será delecionado tras la generación de los dos DSB (123)
	HITI	Se introduce un plásmido que contiene la inserción deseada delimitada por la secuencia de unión de la sgRNA (124)
TRANSLOCACIONES CROMOSÓMICAS	CRISPR/Cas9	Se introducen diferentes sgRNA que producen cortes en varios <i>loci</i> de cromosomas distintos (125)
REGULACIÓN GÉNICA	CRISPRi	Se inhibe la transcripción de un gen mediante la fusión de dCas9 ^{#1} con dominios represores (126)
	CRISPRa	Se activa la expresión de genes mediante la fusión de dCas9 ^{#1} con dominios de activación (127)
AUMENTO DE LA ESPECIFICIDAD	CRISPR/D10A	D10A es una Cas9 <i>nickasa</i> que solo corta una cadena y por tanto, necesita dimerizar para producir un DSB (128)
	CRISPR/eSpCas9	eSpCas9 es una variante de la Cas9 de <i>S. pyogenes</i>

Introducción: Terapia génica

		diseñada para aumentar su especificidad (129)
	CRISPR/SpCas9-HF1	SpCas9-HF1 es una variante de la Cas9 de <i>S. pyogenes</i> diseñada para aumentar su especificidad (130)
	CRISPR/HypaCas9	HypaCas9 es una variante de la Cas9 de <i>S. pyogenes</i> diseñada para aumentar su especificidad (131)
	CRISPR/HiFiCas9	HiFiCas9 es una variante de la Cas9 de <i>S. pyogenes</i> con una mutación puntual que aumenta su especificidad (132)
AMPLIACIÓN DE LA SECUENCIA PAM	CRISPR/SaCas9	La proteína Cas9 de <i>Staphylococcus aureus</i> es más pequeña y su secuencia PAM es NNG(A/G)(A/G)T (133)
	CRISPR/KKH SaCas9	Una variante de SaCas9, KKH Sa Cas9, reconoce como PAM la secuencia NNN(A/G)(A/G)T (134)
	CRISPR/CjCas9	La proteína Cas9 de <i>Campylobacter jejuni</i> es más pequeña y su secuencia PAM es NNAGAA(A/T) (135)
	CRISPR/NmCas9	La proteína Cas9 de <i>Neisseria meningitidis</i> reconoce como secuencia PAM NNNNGATT (136)
OTRAS NUCLEASAS	CRISPR/Cpf1	Cpf1 es una familia de nucleasas guiada por una sgRNA de 42 nucleótidos sin tracrRNA cuya secuencia PAM es TTTN (137)

Introducción: Terapia génica

EDICIÓN SIN DSB	Editores de bases	Se introducen cambios específicos de una base por otra asociando dCas9 ^{#1} a diferentes enzimas como desaminasas y glicosilasas (138–140)
	<i>Prime editing</i>	Se fusiona una Cas9 <i>nickasa</i> con un dominio con actividad transcriptasa reversa. La guía incluye también la modificación que se quiere introducir y servirá como molde en la transcripción reversa. Luego este cambio será transcrito de nuevo a DNA introduciendo la modificación de manera permanente (141)
EDICIÓN DE RNA	RCas9	Se dirige Cas9 a una molécula de RNA mediante una sgRNA y un DNA donante de la secuencia PAM (142).
	CRISPR/Cas13	Se basa en el sistema CRISPR tipo VI asociado a la ribonucleasa guiada por RNA Cas13 y permite cortar específicamente moléculas de mRNA impidiendo su expresión (143)
	SHERLOCK/HUDSON	Adaptaciones del sistema CRISPR/Cas13 que aprovechan su actividad inespecífica para el desarrollo de herramientas de detección de virus de

Introducción: Terapia génica

		RNA al añadir un RNA reportero (144,145)
	REPAIR/RESCUE	Sistemas de edición de bases en transcritos mediante la fusión de Cas13 inactivada a diferentes enzimas. Todavía debe optimizarse y eliminar actividad inespecífica (143,146)

#1: dCas9: Cas9 sin actividad catalítica

e) *Ensayos clínicos*

Al realizar una búsqueda de los ensayos clínicos registrados en www.clinicaltrials.gov relacionados con el término “CRISPR”, en fase de reclutamiento y activos no reclutando, se recoge un total de 25 estudios (octubre 2021). La mayoría están dirigidos al desarrollo de inmunoterapias contra diferentes tipos de cáncer, especialmente mediante el uso de células CAR-T. El resto abordan patologías como el VIH, algunas hemoglobinopatías, la amaurosis congénita de Leber o la amiloidosis.

El primer ensayo clínico en humanos utilizando CRISPR/Cas9 se inició en China en el año 2016 (Identificador de *ClinicalTrials.gov*: NCT02793856). En él participaron 12 pacientes con estados avanzados de cáncer de pulmón de células no pequeñas. El tratamiento ensayado consistía en la inhibición de la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) mediante CRISPR/Cas9 en células T *ex vivo*. Los resultados

obtenidos confirmaron la seguridad y viabilidad del tratamiento y su potencial terapéutico, ya que se detectan células T editadas, al menos, 4 semanas después (147).

El primer ensayo realizado en Estados Unidos, usando un protocolo similar al anterior, comenzó en 2018. Se trata de un ensayo de fase I (Identificador de *ClinicalTrials.gov*: NCT03399448) realizado en tres pacientes con cáncer refractario avanzado, de los que se aislaron células T. Mediante un abordaje multigénico *ex vivo* con CRISPR/Cas9, se truncó la expresión del receptor de linfocitos T (TCR) y de PD-1 y, además, se introdujo un vector lentiviral que codifica un TCR específico para reconocer las células cancerosas. Los resultados preliminares indicaron que la terapia era segura, sin efectos adversos, con tasas de actividad inespecífica muy baja y persistente en el tiempo, al menos, 9 meses. También se observó una reducción en los antígenos tumorales (148).

En julio de 2017, en Pekín (China), un hombre diagnosticado de VIH y leucemia linfoblástica aguda fue trasplantado con células hematopoyéticas modificadas de un donante compatible (Identificador de *ClinicalTrials.gov*: NCT03164135). Se obtuvieron las células CD34+ del donante, que fueron editadas mediante RNP formadas por la proteína Cas9 y dos sgRNA para inhibir el gen *CCR5*. Las células del donante editadas fueron

trasplantadas al paciente tras recibir terapia mieloablativa. A las 4 semanas y hasta 19 meses después del tratamiento, la leucemia había remitido. Además, se seguía detectando la inhibición del gen *CCR5* en células de la médula ósea. Estos resultados demostraron la seguridad del trasplante de células editadas con CRISPR/Cas9 y su persistencia a largo plazo pese a que no se consiguieron efectos terapéuticos sobre la infección por VIH en el paciente (149).

Respecto a las hemoglobinopatías, tanto la TDT como la SCD han sido abordadas con la tecnología CRISPR/Cas9 y aplicadas en pacientes con estas patologías. La estrategia utilizada ha sido la electroporación con CRISPR/Cas9 de células madre hematopoyéticas CD34+ obtenidas de los propios pacientes para inhibir el gen *BCL11A* y permitir así, la expresión de la hemoglobina fetal. Tras aplicar una terapia mieloablativa, las células editadas *ex vivo* fueron infundidas de nuevo en un paciente con TDT (Identificador de *ClinicalTrials.gov*: NCT036556678) y otro con SCD (Identificador de *ClinicalTrials.gov*: NCT03745287). Un año después, ambos mostraban niveles aumentados de hemoglobina fetal en sangre y una mejoría de su enfermedad (150). En base a estos resultados positivos, tanto las farmacéuticas Intellia Therapeutics/Novartis como CRISPR Therapeutics/Vertex están

apoyando la investigación para continuar desarrollando esta terapia génica y poder aplicarla en la clínica (151).

En diciembre de 2018, se inició el primer ensayo clínico que aplicaba CRISPR/Cas9 *in vivo* en pacientes (Identificador de *ClinicalTrials.gov*: NCT03872479). Se trata de una terapia denominada EDIT-101, desarrollada por Editas Medicine para tratar la amaurosis congénita de Leber tipo 10, un tipo de ceguera congénita. EDIT-101 consiste en un vector AAV5 que codifica para la proteína Cas9 y dos sgRNA que se unen a ambos lados de una mutación conocida en el gen *CEP290* para eliminarla (152). Este tratamiento se aplica por inyección debajo de la retina del paciente, por lo que solo presenta acción local. El ensayo ha reclutado 18 participantes, adultos y pediátricos. Los resultados preliminares muestran un perfil seguro de la terapia y mejoras en la visión de los pacientes, según comunicó la farmacéutica en septiembre de 2021 (153).

Las nanopartículas lipídicas, no se aplican frecuentemente en estudios *in vivo*. Por ello, cabe destacar el ensayo planteado por Intellia Therapeutics en noviembre de 2020, en el que se trataba de aplicar a un paciente, por vía sistémica, una TG basada en estas partículas. Esta terapia se diseñó contra la amiloidosis hereditaria mediada por transtiretina y consiste en la inhibición de la expresión de la proteína transtiretina

mediante CRISPR/Cas9 (154) (Identificador de *ClinicalTrials.gov*: NCT04601051).

f) Desafíos y oportunidades

Sin lugar a duda, la aparición de CRISPR/Cas9 ha abierto las puertas a multitud de oportunidades para el desarrollo de herramientas terapéuticas, sin embargo, todavía quedan muchos retos que superar para poder trasladar de manera segura esta terapia a la práctica clínica habitual.

i. Vectores

El vector ideal para la aplicación de CRISPR/Cas9 como TG debería reunir las siguientes características: expresar la Cas9 de forma transitoria y no integrativa; ser eficiente en la introducción de grandes insertos; permitir la administración de varias dosis y la adaptabilidad a la producción a gran escala (155). El primer reto para poder aplicar CRISPR/Cas9 es la utilización de un vector adecuado que cumpla estas características.

Tradicionalmente, los AAV han sido los más aplicados en TG. Sin embargo, la tendencia actual es usar vectores no virales. El método más empleado en la edición *in vitro* por CRISPR/Cas9 es la electroporación. No obstante, su aplicación *in vivo* es compleja e induce una elevada muerte celular (156).

Por otra parte, el uso de moléculas químicas como vector presenta muchas ventajas: es un proceso poco invasivo para el paciente, la integración genómica es poco probable y son vectores sencillos de producir y manipular. Sin embargo, algunos de ellos, como las lipofectaminas comerciales, presentan un alto nivel de toxicidad celular, provocan alteraciones morfológicas y su eficiencia de transfección *in vivo* no es muy elevada (157,158). Esta situación ofrece la oportunidad de desarrollar nuevas moléculas, que capaces de conservar las características ventajosas de los vectores actuales, sean adecuadas y eficientes para las aplicaciones *in vivo*, pero con menor citotoxicidad (156).

ii. Actividad inespecífica

Entre las principales preocupaciones a la hora de aplicar la edición génica como terapia está la posible actividad inespecífica sobre otros genes. Actualmente, contamos con poca información sobre los efectos biológicos a largo plazo.

Uno de los retos más importante es aumentar la especificidad del sistema CRISPR/Cas9 sin perder eficiencia de edición. Para ello se han diseñado diferentes versiones de la Cas9 y se han descrito múltiples ortólogos de la enzima de *S. pyogenes* que, teóricamente, aumentan la especificidad (Tabla 2). El uso de estas alternativas es prometedor, pero aún no se ha generalizado su uso y se posee poca información. La

estrategia más extendida es la utilización de RNP en lugar de plásmidos ya que producen una expresión transitoria de la Cas9, disminuyendo la posibilidad de uniones inespecíficas (121).

A nivel de la sgRNA, se puede disminuir la actividad inespecífica del sistema mediante el diseño racional de la misma teniendo en cuenta los factores que van a producir uniones inespecíficas. Estas se deben a tres motivos: emparejamientos de bases no complementarias; inserciones en la secuencia diana del genoma, formando una protuberancia del DNA; o deleciones en la secuencia de la guía, formando una protuberancia en la sgRNA (159). En general, a partir de 2 uniones no complementarias, la actividad de la sgRNA es mínima. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la no complementariedad en las bases del extremo distal a la secuencia PAM pueden ser toleradas (160). Las protuberancias del DNA en los extremos de la secuencia diana y en las tres bases centrales son también toleradas y podrían dar lugar a cortes inespecíficos en el genoma. Asimismo, las protuberancias en la sgRNA distales a la secuencia PAM pueden dar lugar a uniones inespecíficas. No obstante, si se encuentran combinadas con al menos un emparejamiento de bases no complementarias, la sgRNA no presentará actividad sobre esa secuencia. Además,

guías con altos contenidos en GC, del 60-80 %, dan lugar a una mayor actividad inespecífica (159).

iii. **Diseño del protocolo**

Cada patología tiene características diferentes. Además, la tecnología CRISPR/Cas9 ofrece infinidad de abordajes diferentes para la edición génica. Por tanto, cada experimento exigirá tomar diferentes decisiones con el fin de diseñar la estrategia más favorable para cada caso en particular.

La disponibilidad de tantas opciones diferentes ofrece la oportunidad de encontrar la herramienta que más se adecúe a los objetivos de cada ensayo, buscando el mejor balance posible entre eficiencia y seguridad (156).

En definitiva, la tecnología CRISPR/Cas9 todavía presenta ciertas limitaciones y retos que afrontar. No obstante, ofrece también infinidad de oportunidades de mejorar las herramientas que ya existían y de llevar a cabo lo que antes era impensable.

1.3. Déficit de alfa-1 antitripsina y terapia génica

Al tratarse de una enfermedad monogénica con mutaciones puntuales y bien caracterizadas, el DAAT es una buena diana para el desarrollo de una TG. Es por eso que en la literatura se encuentran múltiples ensayos en búsqueda de un tratamiento definitivo: desde la terapia de aumento génico con vectores virales y no virales, pasando por el uso de microRNA (miRNA), hasta las herramientas de edición génica (161).

Los primeros estudios consistieron en el uso de vectores virales para introducir copias con la secuencia M del gen *SERPINA1* y así aumentar la expresión de la proteína AAT-M. Sin embargo, la aplicación de esta estrategia en modelos animales, mediante el uso de vectores retrovirales y adenovirales, dio lugar a importantes efectos no deseados, lo que llevó al abandono de esta vía (162). En cambio, el uso de vectores AAV demostró ser más seguro y eficaz, dando lugar a una serie de ensayos preclínicos (Tabla 3) y clínicos (Tabla 4) desde finales de los años 90 hasta la actualidad. Los resultados obtenidos en ratón utilizando el AAV2 para la expresión del gen *SERPINA1* fueron prometedores (163), dando lugar a un ensayo clínico de

fase I. En él, este vector se administró en 12 pacientes con genotipo Pi*Z, mediante inyección intramuscular, pero finalmente la concentración de AAT-M alcanzada fue muy baja (164).

Tabla 3. Ensayos preclínicos aplicando la terapia génica en el DAAT.

<i>MODELO</i>	<i>VECTOR</i>	<i>VÍA DE ADMINISTRACIÓN</i>	<i>RESULTADOS PRINCIPALES</i>
RATÓN	AAV2	Intramuscular	Produce niveles terapéuticos a largo plazo de AAT (163)
RATÓN	AAVrh.10	Intrapleural	La terapia es segura y bien tolerada Aparición de anticuerpos neutralizadores dosis dependiente Se detecta mRNA de AAT en diafragma, pleura y pulmones (165)
PRIMATES NO HUMANOS	AAVrh.10	Intrapleural	La terapia es segura, no se observan alteraciones patológicas. Aparición de anticuerpos neutralizadores Se detecta mRNA de AAT en los tejidos de la cavidad torácica (165)
RATÓN	AAV9	Vena de la cola	La terapia es segura, no altera el perfil de miRNA Reducción de los polímeros hepáticos y de la AAT-Z circulante Aumento de la AAT-M circulante (166)

Para tratar de alcanzar niveles de expresión más altos, se realizó un nuevo ensayo de fase I con un vector AAV1, cuyos resultados fueron similares a los anteriores (167). Se llevó a cabo otro ensayo clínico de fase II con el mismo vector, pero producido con un método de complementación con el virus herpes simple (HSV). Los niveles de AAT-M se mantuvieron estables durante al menos tres meses, pero, de nuevo, a una baja concentración. También se observó una respuesta inmunitaria contra el virus en las primeras semanas, aunque sin efectos adversos graves (168). Pese a los bajos niveles de AAT, el seguimiento cinco años después demostró beneficios respecto a la regulación de la actividad neutrofílica (169).

Se han investigado también rutas alternativas de administración y diferentes serotipos de AAV. Tras estudios preclínicos en ratones y primates no humanos exitosos, se inició un ensayo clínico de fase I/II (Identificador de *ClinicalTrials.gov*: NCT02168686) denominado ADVANCE. En él se administró a 6 individuos deficitarios, mediante inyección intrapleural, dos dosis del vector AAV10 del macaco *rhesus* que codifica para la AAT humana (AAVrh.10-AAT). Los objetivos primarios planteados eran analizar la seguridad y expresión de la AAT alcanzada en el plasma y el hígado (170). Posteriormente, se

llevó a cabo otro ensayo de seguimiento durante tres años (Identificador de *ClinicalTrials.gov*: NCT03804021) (171), del que todavía no hay resultados publicados.

Tabla 4. Ensayos clínicos aplicando terapia génica en el DAAT.

FASE	VECTOR	VÍA	Nº PACIENTES	RESULTADOS PRINCIPALES
I	AAV2	Intramuscular	12	Terapia segura, sin efectos adversos graves, pese a la detección de anticuerpos Expresión de AAT mantenida pero baja (164)
I	AAV1	Intramuscular	9	Respuesta inmunitaria durante los primeros 14 días, pero sin efectos adversos En 2 sujetos, aumento de la concentración de AAT, pero a niveles muy bajos (167)
II	AAV1 + HSV	Intramuscular	9	Respuesta inmunitaria durante los primeros 14 días, pero sin efectos adversos Niveles de AAT dosis dependientes (168) Concentración de AAT del 3-5 % del objetivo protector 5 años después: mejoras en la regulación de la actividad neutrofílica (169)
I/II	AAVrh.10-hAAT	Intrapleural	6	Sin resultados publicados

I	Complejo plásmido-liposoma catiónico	Intranasal	5	Aumento transitorio de la concentración de AAT hasta 1/3 del valor normal Efecto antiinflamatorio, reducción de la IL-8 (172)
---	--------------------------------------	------------	---	--

Se llevó a cabo un abordaje dual aplicando miRNA al DAAT. Se diseñó un vector AAV9 que codifica tres miRNA dirigidos a bloquear la forma mutante AAT-Z e introducir un alelo M resistente a este bloqueo. Se trataron ratones transgénicos que expresan la AAT-Z humana con este vector, observando una reducción de los polímeros hepáticos junto a un aumento de los niveles circulantes de AAT-M y una disminución del 80 % de los de AAT-Z. Además, no se alteró el perfil de expresión de miRNA del ratón, sugiriendo que esta terapia podría ser segura y eficaz (166).

La terapia génica basada en vectores no virales también se ha aplicado en el DAAT. En un ensayo clínico con cinco pacientes deficitarios se administró en una de las fosas nasales un complejo plásmido-liposoma catiónico que codificaba para el gen normal de la AAT. La otra fosa nasal no se trató, actuando así como control. La concentración de AAT-M en el líquido del lavado nasal de la fosa tratada aumentó temporalmente y se detectó cierto efecto antiinflamatorio (172).

Las herramientas de edición génica también han sido aplicadas *in vitro* para la corrección de la mutación Pi*Z del DAAT.

Se utilizaron células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSCs), obtenidas a partir de fibroblastos de pacientes deficitarios, que fueron co-transfectadas con ZFNs, dirigidos a la mutación Pi*Z de la AAT, y un casete de resistencia a puromicina, flanqueado por las repeticiones *piggyBac*. Las colonias transfectadas fueron seleccionadas incubándolas con puromicina (1 µg/ml) eliminando, a continuación, la resistencia al antibiótico mediante la expresión transitoria del transposón *piggyBac*. En el 4 % de las colonias se corrigieron los dos alelos mutados. Posteriormente, las hiPSCs con la mutación Pi*Z corregida fueron diferenciadas a hepatocitos, manteniendo inalteradas sus funciones biológicas. Se observó secreción de la AAT funcional y ya no se detectaron polímeros de AAT-Z. Estos hepatocitos se implantaron en el hígado de un ratón, donde se integraron sin desarrollar tumores, dando lugar a la detección de AAT-M humana en circulación (173). Años más tarde, se realizó un estudio aplicando TALENs para corregir la mutación Pi*Z, con el mismo diseño experimental que el estudio anterior. El resultado fue también positivo ya que se obtuvieron

hepatocitos derivados de hiPSCs sin alteraciones funcionales que expresaban niveles normales de AAT-M (174).

El sistema CRISPR/Cas9 se ha aplicado siguiendo diferentes estrategias en relación con la edición de la mutación Pi*Z del DAAT. En un estudio cuyo objetivo era comparar la eficiencia de TALENs y de CRISPR/Cas9 se utilizó, entre otras, la mutación Pi*Z como diana, efectuándose en ambos casos la transfección de hiPSCs mediante electroporación. Lo interesante de estos resultados es que los dos sistemas fueron capaces de corregir la mutación Pi*Z con una eficiencia similar y que la especificidad de las sgRNA usadas permitieron discernir entre el alelo Pi*M y Pi*Z (175).

En un modelo de ratón capaz de expresar la AAT-Z humana, se inactivó la expresión del gen mediante el sistema CRISPR/Cas9 codificado por un vector adenoviral. Esto dio lugar a una disminución de la concentración circulante de la AAT mutante humana y de los agregados en el hígado, reduciendo así la inflamación y la fibrosis (176). En cambio, en otro estudio se inyectó en la cola del ratón un vector adenoviral, expresando el sistema CRISPR/Cas9 para dirigir la integración del gen *SERPINA1* humano en el genoma del ratón, dando lugar a una expresión duradera de la AAT humana en el plasma e hígado (177).

Existen por tanto muchos estudios en los que se ha tratado de aplicar de diferentes maneras la TG al DAAT. No obstante, en ninguno se ha alcanzado efecto terapéutico sobre la patología hepática y respiratoria de manera definitiva y segura.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. Justificación del estudio

Muchas patologías, tanto algunas mayoritarias como otras poco frecuentes, han sido abordadas mediante CRISPR/Cas9 para la reparación de las mutaciones que las originan. Incluso la mutación Pi*Z del DAAT ha sido reparada *in vitro* mediante técnicas de edición génica como ZFNs, TALENs y CRISPR/Cas9. Además, los ensayos clínicos en los que se aplica CRISPR/Cas9 son cada vez más frecuentes y muestran que la terapia podría ser segura. Por tanto, los grandes avances en el campo de la TG, junto con el hecho de que el DAAT es una enfermedad monogénica bien caracterizada sin un tratamiento definitivo, son el origen de este estudio. El punto de partida es que es posible la edición y reparación de la mutación Pi*Z del gen *SERPINA1*, responsable de casos graves de DAAT, mediante CRISPR/Cas9. Sin embargo, no contamos con una línea celular capaz de proliferar *in vitro* que exprese la AAT para poder llevarlo a cabo. Por ello, el primer paso fue la generación de líneas celulares obtenidas de muestras biológicas de pacientes que, al ser transformadas, sean capaces de dividirse en cultivo. Inicialmente se puso a punto la técnica CRISPR/Cas9 dirigida a la mutación Pi*Z del gen *SERPINA1* en una línea celular establecida para, posteriormente, aplicarse en las líneas celulares

generadas, que contenían las mutaciones responsables del DAAT a reparar.

2.2. Objetivos

- Generación de una línea celular a partir de células obtenidas de pacientes para la creación de un modelo del DAAT.
 - o Inmortalización de monocitos primarios obtenidos de pacientes con DAAT.
 - o Inmortalización de linfocitos B primarios obtenidos de pacientes con DAAT mediante transformación con el virus de Epstein-Barr (EBV).
 - o Caracterización de las líneas celulares obtenidas.

- Edición génica de la mutación Pi*Z del gen *SERPINA1* mediante CRISPR/Cas9.
 - o Puesta a punto del sistema de edición CRISPR/Cas9 para la edición de la mutación Pi*Z del gen *SERPINA1* en la línea celular HEK293.
 - o Edición de la mutación Pi*Z del gen *SERPINA1* en células primarias productoras de AAT.
 - o Edición de la mutación Pi*Z del gen *SERPINA1* en las líneas celulares generadas de linfocitos B.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Líneas celulares y medios de cultivo

Todas las líneas celulares empleadas se han mantenido en cultivo con un 5 % de CO₂ y a 37 °C.

3.1.1. HEK293

El medio de cultivo de la línea celular de riñón humano HEK293, denominado medio CM10, está compuesto por:

- Medio de cultivo DMEM *high glucose* con 4500 mg/L de glucosa y 2 mM L-glutamina (L0103, Biowest)
- 10 % de suero bovino fetal (S1400, Biowest) inactivado mediante una incubación de 30 minutos a 56 °C
- 1 % de penicilina/estreptomicina (P433, Sigma-Aldrich)

3.1.2. Monocitos primarios

El medio de cultivo de los monocitos primarios, denominado medio MM6, está compuesto por:

- Medio RPMI1640 con 2 mM L-glutamina (R8758, Sigma-Aldrich)
- 10 % de suero bovino fetal inactivado
- 1 % de penicilina/estreptomicina
- 1 mM de piruvato de sodio (S8636, Sigma-Aldrich)
- 10 µg/ml de insulina humana (I9278, Sigma-Aldrich)

- 1x aminoácidos no esenciales (M7145, Sigma-Aldrich)

3.1.3. Linfocitos B inmortalizados

El medio de cultivo de los linfocitos B inmortalizados, denominado medio CM20, está compuesto por:

- Medio RPMI1640 con 2 mM L-glutamina
- 20 % de suero bovino fetal inactivado
- 1 % de penicilina/estreptomicina

3.2. Establecimiento de una línea celular de monocitos inmortalizados

3.2.1. Aislamiento y cultivo de monocitos primarios

Los monocitos primarios se aislaron a partir de muestras de sangre total, utilizando EDTA como anticoagulante, que fue obtenida de donantes voluntarios en las instalaciones del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Todos ellos fueron informados y aceptaron participar en el proyecto mediante la firma del consentimiento informado (Anexo 1).

El aislamiento se realizó utilizando el imán *Easy 50 EasySep™* (18002, StemCell) junto con los reactivos del kit *EasySep™ Direct Human Monocyte Isolation* (19669, StemCell). Con esta técnica se separaron los monocitos del resto de células de la sangre mediante inmunoselección negativa. Siguiendo las indicaciones del fabricante, las plaquetas y el resto de las líneas celulares fueron marcadas con un cóctel de anticuerpos monoclonales y se añadieron unas esferas magnéticas que se unieron a estos anticuerpos. Al colocar el tubo con la sangre en el interior del imán, las células marcadas quedaron retenidas en las paredes del tubo y así, tras varios lavados, se separó la población de monocitos del resto.

3.2.2. Métodos de inmortalización no virales

a) Plásmidos

El establecimiento de una línea celular a partir de monocitos primarios se basó inicialmente en el uso de plásmidos para la expresión de dos proteínas: el antígeno T grande de *simian virus* 40 (SV40) y la telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT). El antígeno T grande de SV40 es una oncoproteína que induce la división celular mediante la alteración de p53 y la proteína del retinoblastoma, ambas supresoras de tumores (178). Por otra parte, hTERT impide el acortamiento de los telómeros y por tanto, la entrada en senescencia (179). Los plásmidos adquiridos fueron el plásmido pBSSVD2005 depositado por David Ron (Addgene plasmid #21826; <http://n2t.net/addgene:21826>; RRID:Addgene_21826) y el plásmido pBABE-puro-hTERT, depositado por Bob Weinberg (Addgene plasmid #1771; <http://n2t.net/addgene:1771>; RRID:Addgene_1771)(Figura 13).

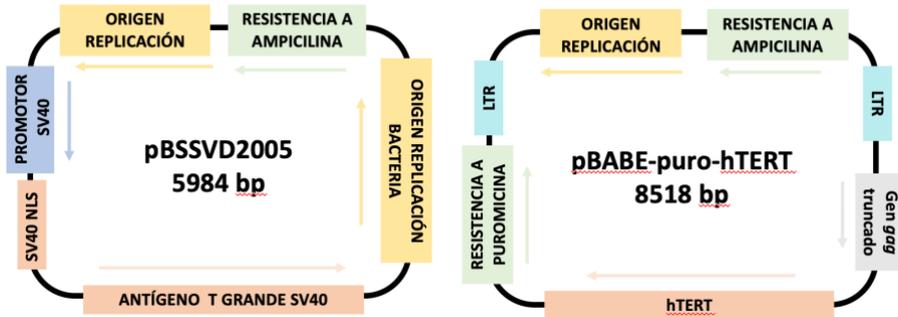


Figura 13. Esquema simplificado de los plásmidos pBSSVD2005 y pBABE-puro-hTERT.

b) Transfección

La introducción de los plásmidos para la inmortalización de monocitos primarios se ha tratado de llevar a cabo con diferentes métodos de transfección no virales. En concreto, se han utilizado la electroporación y la formación de polímeros catiónicos con PEI.

i. Electroporación

Para la transfección mediante electroporación de monocitos primarios se utilizó el equipo Amaxa™ 4D-Nucleofector™ junto con el kit *P3 Primary Cell 4D-Nucleofector™* (V4XP-3024, Lonza) que incluye los reactivos necesarios y las cubetas específicas *Nucleocuvette™* de 100 µL para realizar los pulsos eléctricos. La transfección se realizó inmediatamente después del aislamiento de los monocitos. Se llevaron a cabo diferentes intentos variando el diseño del experimento. En general, siguiendo las

instrucciones del fabricante, se preparó la solución de transfección y para cada reacción se resuspendieron entre 250.000 y $1 \cdot 10^6$ células en 100 μL de esta, incorporando posteriormente el sustrato correspondiente. Según el diseño de cada experimento, se añadieron los plásmidos pBSSVD2005 y pBABE-puro-hTERT, bien individualmente o bien combinados, en diferentes cantidades entre 1 μg y 5 μg . Los 100 μL de cada reacción de transfección se traspasaron a cada una de las cubetas, que se colocaron en la subunidad X del equipo para realizar el pulso de electroporación denominado EA-100. Inmediatamente después, se resuspendieron las células en medio MM6 atemperado a 37 °C y se sembraron en una placa de 24 pocillos (P24). Por microscopía se realizó un seguimiento del cultivo para detectar si había proliferación celular.

ii. Polímeros catiónicos: PEI

PEI es un polímero catiónico que forma poliplejos con el DNA capaces de penetrar en las células por endocitosis. Para esta transfección se utilizó el reactivo *Transporter*TM 5 (26008, Polysciences). Se sembraron 300.000 células por pocillo en una placa P24 y se incubaron durante 48 horas. Dos horas antes de la transfección se cambió el medio de cultivo por medio MM6 con 2 % de suero fetal bovino. Para la formación de los poliplejos, el reactivo *Transporter*TM 5 se incubó durante 20

minutos a temperatura ambiente junto con los plásmidos, manteniendo siempre una proporción DNA(μ g):PEI(μ L) de 1:4. Se probaron las siguientes cantidades de los plásmidos pBSSVD2005/pBABE-puro-hTERT respectivamente, expresadas en μ g: 0,25/0,25; 0,5/0,5; 1/1; 0/1; 1/0. La solución DNA/PEI se añadió a las células tras la incubación. El cultivo se mantuvo mientras se monitorizaba por microscopía las posibles alteraciones en la división celular.

3.2.3. Métodos de inmortalización virales

a) *Vectores virales*

En paralelo, se trataron de inmortalizar monocitos primarios mediante infección con vectores virales. Para poder cumplir con todas las medidas de bioseguridad pertinentes, los experimentos en los que se manipularon partículas virales se llevaron a cabo en las instalaciones del Biobanco del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, CIBERER Biobank, siguiendo sus protocolos de infección e inmortalización.

Para ello, se utilizaron vectores lentivirales para inducir la expresión del antígeno T grande de SV40, de hTERT y de la quinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4). CDK4 es una proteína

crucial en la progresión del ciclo celular, desde la primera fase del ciclo celular, denominada G_1 , a la fase de replicación del DNA, la fase S (180).

Para la expresión del antígeno T grande de SV40, se adquirió el lentivirus pLentiSV40 virus (G203, Applied Biological Materials) (Figura 14), ya preparado para su uso. En cambio, para la expresión de hTERT y CDK4 se adquirieron los plásmidos pLV-hTERT-IRES-hygro, de tercera generación, depositado por Tobias Meyer (Addgene plasmid #85140; <http://n2t.net/addgene:85140>; RRID:Addgene_85140) (181); y pHAGE-CDK4-R24L, de segunda generación, depositado por Gordon Mills y Kenneth Scott (Addgene plasmid #116217; <http://n2t.net/addgene:116217>; RRID:Addgene_116217) (182) (Figura 14).

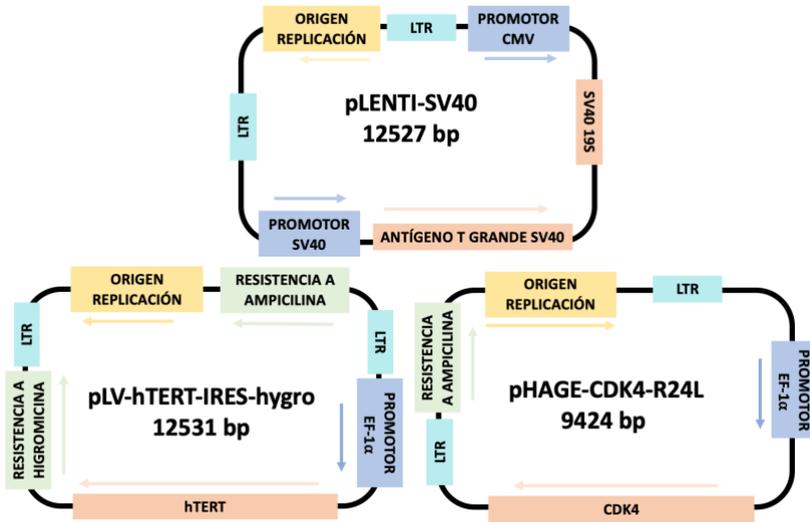


Figura 14. Esquema simplificado de los plásmidos pLentiSV40, pLV-hTERT-IRES-hygro y pHAGE-CDK4-R24L.

Brevemente, para obtener las partículas lentivirales que expresen hTERT y CDK4 se transfectaron células HEK293T mediante el reactivo de transfección FuGene 6 (E2691, Promega) diluido en Opti-MEM™ (11058021, Gibco™, Thermo Fisher Scientific) con 20 µg del plásmido correspondiente y sus plásmidos accesorios en una placa P100, como se indica en la tabla 5. A las 24 horas, se cambió el medio y 24 horas después, se recogió el sobrenadante -que contenía las partículas virales-, se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y se almacenó a – 80 °C.

Tabla 5. Plásmidos utilizados y sus plásmidos accesorios.

<i>PLÁSMIDO</i>	<i>PHAGE-CDK4- R24L</i>	<i>PLV-HTERT-IRES- HYGRO</i>
PLÁSMIDO EMPAQUETAMIENTO	8 µg pCMV- ΔR8.74	6,5 µg pMDL-g/p- RRE 3,5 µg pRSV-Rev
PLÁSMIDO DE CUBIERTA	2,5 µg pMD2.G	2,5 µg pCMV- VSVg

b) Infecciones virales

i. SV40

Se han realizado múltiples abordajes para infectar monocitos primarios con vectores virales. Inicialmente se probó con el vector pLentiSV40. El número de células se ha variado entre 370.000 y 460.000 en placas P24 o desde 500 hasta 50.000 en placas P96. En cada infección, la cantidad de vector se ajustó para obtener valores de multiplicidad de infección (MOI) desde 0,5 hasta 100 y se añadió polibreno (bromuro de hexadimetrina, H9268, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 4 µg/mL. Tanto el número de células como el MOI se combinaron con diferentes métodos de infección. Por una parte, se incubaron los monocitos con el medio de infección durante 24 horas, tras las cuales se quitó el medio y se añadió medio de cultivo MM6. Por otra parte, se realizaron infecciones mediante espinoculación a

1500 x g durante 4 horas a 32 °C, seguido diferentes tiempos de incubación (0, 2 y 24 horas) y tras esto, se cambió a medio de cultivo MM6. Finalmente, las células infectadas se mantuvieron en cultivo y se observaron regularmente por el microscopio, como se ha comentado en los casos anteriores.

ii. hTERT y CDK4

Otra estrategia utilizada ha sido la infección de monocitos primarios con los vectores lentivirales de expresión de hTERT y CDK4, en dos infecciones consecutivas o simultáneamente en una misma coinfección (183). Una vez aislados los monocitos, se incubaron con los sobrenadantes virales descongelados en proporción 1:1 con el medio de cultivo suplementado con polibreno (4 µg/mL). A las 24 horas, se cambió por medio MM6 fresco y se realizó el seguimiento del cultivo mediante observación al microscopio.

3.3. Establecimiento de una línea celular de linfocitos B inmortalizados

Ante las dificultades halladas a la hora de generar una línea de monocitos, se optó por la inmortalización de linfocitos B mediante infección con EBV (184). Además, las líneas obtenidas de linfocitos B inmortalizados con EBV han sido utilizadas previamente para el estudio de otras muchas enfermedades (185).

3.3.1. Inmortalización de linfocitos B

El primer paso en la inmortalización de linfocitos B fue el aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de voluntarios sanos y de pacientes con DAAT que aceptaron participar en el estudio mediante la firma del consentimiento informado (Anexo 1). Estas células se aislaron a partir de sangre total, utilizando EDTA como anticoagulante, mediante gradiente de densidad generado por centrifugación con *Ficoll-Hypaque* (10771, Sigma-Aldrich). De esta forma, los componentes de la sangre se separan y se obtiene una fase blanquecina donde se encuentran las PBMC.

Estas células se diluyeron en medio de cultivo CM20 con 2 µg/mL de Ciclosporina A a una concentración de entre 5 y

10 millones de células en 1 mL. Esta suspensión se sembró en una placa P24 y se añadió 0,5 mL de sobrenadante viral EBV recién descongelado. Tras unos días de incubación, las células infectadas comenzaron a formar agregados. A los 10-12 días se añadió 1 mL de medio CM20 suplementado con Ciclosporina A (2 µg/mL). A partir de ese momento, se fue incorporando más medio CM20 cada 7-10 días, traspasando las células desde una placa P24 a un frasco de 25 cm², hasta los 10 mL, y de este, a otro de 75 cm², hasta los 40 mL. Los frascos se incubaron en vertical y la densidad celular se mantuvo entre 500.000 y 800.000 células/mL, para que el cultivo se encontrara siempre en fase de crecimiento exponencial.

3.3.2. Caracterización celular

Una vez establecidas las líneas de linfocitos B, se caracterizaron respecto a su nivel de expresión génica, número de copias del gen *SERPINA1*, genotipo y síntesis de AAT.

a) *Expresión génica*

Mediante qPCR se determinó si el gen *SERPINA1* se expresaba en las líneas inmortalizadas de linfocitos B. Para ello, se realizaron tres extracciones del RNA celular de cada línea siguiendo las indicaciones del kit NucleoSpin TriPrep (740966.50,

Macherey-Nagel), basado en columnas de sílice y diferentes tampones que permiten eluir el DNA y el RNA por separado partiendo de la misma muestra. Del RNA obtenido, 600 ng se retrotranscribieron a DNA complementario (cDNA) con el kit *High-Capacity cDNA RNA-to-cDNA* (4387406, Thermo Fisher Scientific) aplicando los siguientes ciclos de temperatura: 37 °C durante 1 hora y 95 °C durante 5 minutos.

El estudio de la expresión génica se realizó mediante qPCR con 2 µL del cDNA y utilizando los ensayos TaqMan® -que contienen los cebadores y la sonda específica- del gen diana *SERPINA1* (Hs00165475_m1, PN4453320, Applied Biosystems) y del gen constitutivo que codifica para la proteína ribosomal L13A (*RPL13A*; Hs01578912_m1, PN4331182, Applied Biosystems) junto con la TaqMan® *Gene Expression Master Mix* (PN4371135, Applied Biosystems). Cada gen se ensayó por separado y siempre por duplicado. La reacción de qPCR se llevó a cabo en el equipo de PCR QuantStudio® 5 (Applied Biosystems) aplicando los siguientes ciclos de temperaturas: 95 °C durante 10 minutos y 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. En cada ciclo, el equipo midió la fluorescencia emitida por las sondas en el paso a 60 °C. Los valores de ciclo umbral de la amplificación (C_t) obtenidos se analizaron siguiendo el método $2^{-\Delta C_t}$ descrito

anteriormente (186) para calcular la expresión relativa del gen *SERPINA1* normalizado frente al gen constitutivo.

b) Número de copias del gen

Para conocer el número de copias del gen *SERPINA1* en las líneas celulares de linfocitos B inmortalizados se utilizaron los reactivos diseñados para este fin de TaqMan® Applied Biosystems. En estos ensayos se compara mediante sondas TaqMan® el gen de interés, en este caso el gen *SERPINA1* (Hs07078052_cn; PN4400291), con un gen de referencia, *RNasa P* (PN4403326). Cada sonda está marcada en su extremo 5' con un fluoróforo diferente, lo que permite combinarlas en una misma reacción y comparar la fluorescencia emitida. En este caso, la sonda que se une al gen *SERPINA1* está marcada con el fluoróforo FAM y la sonda que se une al gen *RNasa P*, con el fluoróforo VIC (Figura 15).

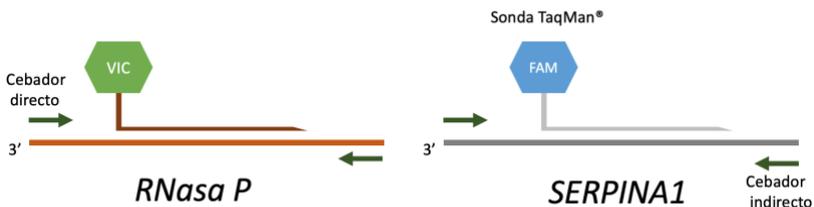


Figura 15. Fundamento del ensayo para la determinación del número de copias de un gen.

Para la reacción de qPCR se diluyeron los dos ensayos y la TaqMan® *Gene Expression Master Mix* en agua libre de RNasas junto con 10 ng de DNA de los linfocitos B inmortalizados y de PBMC aisladas de voluntarios sanos como control. Los ciclos de temperatura aplicados fueron los mismos que en el ensayo de expresión génica. Tras la reacción de qPCR, en la que se mide la fluorescencia en el último paso de cada ciclo, los resultados obtenidos se analizaron siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (186). Este método compara los valores de C_t obtenidos de cada gen y normaliza la señal del gen de interés frente al gen de referencia y al mismo tiempo, compara con la línea celular control. De esta manera, se pudo estimar el número de copias del gen *SERPINA1*.

c) Genotipado

La determinación del genotipo de las líneas de linfocitos obtenidas se llevó a cabo mediante secuenciación Sanger. Para ello, primero se amplificó por PCR las regiones del gen *SERPINA1* que contienen la mutación Pi*Z y Pi*S. Los cebadores utilizados fueron FW-exV: 5'CTTGCTCGAGGCCTGGGATC3' y RV-exV: 5'ATGGAGGGGAGGGGTTGAG3' para la mutación Pi*Z; y FW-exIII: 5'CTTCAAACCTTCACTCACCCCTGGT3' y RV-exIII: 5'CTCCTCATGGAGCATGGATGGCG3' para la mutación Pi*S. Para la reacción de amplificación se combinaron 60 ng de DNA con los cebadores a una concentración final de 300 nM con la *AmpliTaq*

Gold® 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific) en un volumen final de 50 μ L. El ciclo de temperaturas aplicado fue el siguiente: 10 minutos a 95 °C; 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 30 segundos a 72 °C; finalmente, 7 minutos a 72 °C. Tras la reacción de PCR, el DNA amplificado fue purificado mediante el kit *PureLink® PCR Purification* (K310001, Thermo Fisher Scientific), basado en columnas de centrifugación con membranas de sílice por las que se eliminan restos de enzimas, cebadores, nucleótidos y sales. El producto purificado fue enviado a la sección de Genómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental de la Universidad de Valencia, donde se realizó la secuenciación mediante el método Sanger. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa 4Peaks.

d) Síntesis de AAT

La síntesis de la AAT en los linfocitos inmortalizados con EBV se ensayó mediante *Western Blot*, realizado en condiciones desnaturalizantes y reductoras. La extracción de las proteínas se llevó a cabo mediante la lisis de un millón de células en 70 μ L de tampón de lisis de células de mamíferos (ab179835, Abcam) complementado con inhibidores de fosfatasas y de proteasas. Primero, 40 μ g de las proteínas extraídas se diluyeron en tampón de Laemmli (1610747, Bio-Rad) con β -mercaptoetanol

como agente reductor y se incubaron a 95 °C durante 5 minutos para su desnaturalización. A continuación, las proteínas desnaturalizadas, junto con un marcador de peso molecular, se cargaron en un gel de poliacrilamida en gradiente 4-20 % *Mini-PROTEAN TGX Stain Free* (4568094, Bio-Rad), que permite visualizar la totalidad de las proteínas cargadas sin tinción, mediante la activación con luz ultravioleta. La electroforesis se realizó a 110 V durante 90 minutos. La transferencia de las proteínas del gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno hidrófobo se llevó a cabo con el sistema *Trans Blot® Turbo™ Transfer* (1704150, Bio-Rad) con las siguientes condiciones de amperaje, voltaje y tiempo: 2,5 A, 25 V y 7 minutos. Las membranas se bloquearon durante toda la noche en tampón *tris buffered saline* con detergente Tween20 al 0,1 % (TBST; 1706435, Bio-Rad) suplementado con un 5 % de leche desnatada a 4 °C y en agitación lenta.

El anticuerpo primario utilizado es un clon de IgG de ratón que reconoce monómeros y polímeros de la AAT humana denominado 3C11 (HM2358-IA, HyCult Biotech). El anticuerpo secundario reconoce la IgG de ratón y está conjugado con la enzima peroxidasa HRP (160-6516, Bio-Rad). Tras el bloqueo, las membranas se incubaron en agitación durante 3 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario diluido 1:50

en solución de bloqueo. A continuación, se lavaron con TBST y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido 1:10.000 en TBST con 5 % de albúmina sérica bovina (BSA; A4503, Sigma-Aldrich) durante 1 hora en agitación. Finalmente, las membranas se revelaron utilizando el sustrato quimioluminiscente de la peroxidasa HRP *Clarity Max Western ECL* (1705062, Bio-Rad) y el equipo ChemiDoc MP (17001402, Bio-Rad) para la toma de imágenes. El análisis de las cuales se realizó con el programa Image Lab™ (Bio-Rad). La señal quimioluminiscente de la AAT se normalizó frente a las proteínas totales del carril detectadas en la membrana mediante la tecnología *stain free* de Bio-Rad (187,188).

3.3.3. Optimización de la transfección

Para determinar las condiciones óptimas de transfección en estas líneas de linfocitos B inmortalizados, se utilizó el equipo Amaxa™ 4D-Nucleofector™ junto con el kit SF *Cell Line* 4D-Nucleofector™ X (V4XC-2032, Lonza) que incluye las cubetas de transfección en formato de tiras *Nucleocuvette*™ de 20 µL. Mediante una adaptación del protocolo de nucleofección establecido por el CIBERER Biobank en colaboración con el laboratorio de la Dra. Pilar González-Cabo (*Universitat de*

València-CIBERER) para esta línea celular en el que se determinó que el tampón SF y el pulso EO-115 era la combinación óptima, se realizó una transfección de optimización usando como indicador de eficiencia el plásmido pmaxGFP. Este plásmido expresa la proteína verde fluorescente (GFP) y está incluido en el mismo kit de transfección.

Se sembraron los linfocitos B a una concentración de 500.000 cels/mL. Al día siguiente, se preparó la solución de transfección siguiendo las indicaciones del fabricante. Por otra parte, se separaron alícuotas de 300.000 y 500.000 células y se centrifugaron a 80 x g durante 5 minutos. Los *pellets* celulares, tras un lavado con tampón fosfato salino (PBS), se resuspendieron en 20 μ L de la solución de transfección y se añadió 0,1 o 0,2 μ g del plásmido pmaxGFP. Esta suspensión de células y DNA se transfirió a las cubetas para realizar el pulso EO-115 en la subunidad X del equipo. Inmediatamente después, se recogieron las células y se traspasaron a una placa P96 que contenía 180 μ L de medio CM20 atemperado a 37 °C. Tras 48 horas de incubación, se determinó mediante citometría de flujo en el Servicio de Citometría de Flujo de la Unidad Central de Investigación de Medicina de la *Universitat de València*, qué porcentaje de células emitía fluorescencia. Se utilizó el láser azul

488 para el filtro FITC (530/20 nm) del equipo FACSVerse (Becton Dickinson).

3.4. Edición génica mediante CRISPR/Cas9

3.4.1. Diseño de las sgRNA

La edición génica con el sistema CRISPR/Cas9 comienza con el diseño de las sgRNA, que son las que van a dirigir la unión de la nucleasa Cas9 con el sitio de interés. Estas moléculas guía deben cumplir dos requisitos: la longitud de la secuencia complementaria al gen diana debe ser de 20 nucleótidos y adyacente a ella debe encontrarse el triplete PAM, que no se incluye en la sgRNA.

Inicialmente se diseñaron tres guías que reconocían el alelo Pi*M del exón V del gen *SERPINA1* para la puesta a punto de la transfección y la edición de la mutación Pi*Z en las células control. Para diseñarlas se utilizó la herramienta *online* Invitrogen™ *TrueDesign™ Genome Editor*, que busca los tripletes PAM más próximos a la secuencia que se quiere editar. Se introdujeron 50 bp del gen que incluían, aproximadamente en el centro, el nucleótido responsable de la mutación y el *software* detectó tres posibles secuencias que podrían funcionar como guías:

- sgRNA-IVT1: GTGCTGACCATCGACGAGAA
- sgRNA-IVT2: TTCAGTCCCTTTCTCGTCGA

– sgRNA-IVT3: TGCTGACCATCGACGAGAAA

La guía sgRNA-IVT2, se une a la cadena complementaria del DNA (Figura 16).



Figura 16. Diseño de las sgRNA-IVT. Se muestra parte del exón V del gen *SERPINA1* que incluye el *locus* de la mutación Pi*Z, en negrita y subrayada. Se indican las secuencias de las sgRNA-IVT y la secuencia PAM, que no se encuentra en la guía, en línea discontinua.

Las sgRNA diseñadas fueron analizadas mediante la herramienta *online* Cas-OFFfinder (www.rgenome.net/cas-offfinder) para comprobar su especificidad. Este programa detecta todas las secuencias PAM presentes en el genoma del organismo indicado y, posteriormente, busca las posibles dianas para la secuencia de la sgRNA introducida (189). En este caso, los parámetros de búsqueda aplicados fueron: presencia de dos o menos emparejamientos de bases no complementarias y de protuberancias en el DNA y en la sgRNA de un nucleótido o menos.

3.4.2. Síntesis *in vitro* de las sgRNA

Para obtener las sgRNA como moléculas de RNA de simple cadena se utilizó el kit *Precision gRNA Synthesis* (A29377,

Thermo Fisher Scientific) que permite la transcripción *in vitro* de las sgRNA, denominadas por esto sgRNA-IVT, a partir de dos parejas de cebadores y del molde del fragmento constante de 80 bp del crRNA/tracrRNA. La primera pareja de cebadores es universal: el cebador directo contiene la secuencia del promotor T7 y el reverso, parte del fragmento crRNA/tracrRNA. La segunda pareja de cebadores es específica de cada guía y se solapan en la secuencia de la sgRNA complementaria al gen diana. Además, el cebador directo contiene la secuencia del promotor T7 y el reverso, parte del fragmento crRNA/tracrRNA (Figura 17). Mediante una reacción de PCR, en la que estos oligonucleótidos actúan como cebador y molde al mismo tiempo, se obtuvo un molde de las guías de DNA. Por último, sobre este DNA se realizó una transcripción *in vitro* para la obtención de la molécula simple de RNA que constituye la sgRNA-IVT.

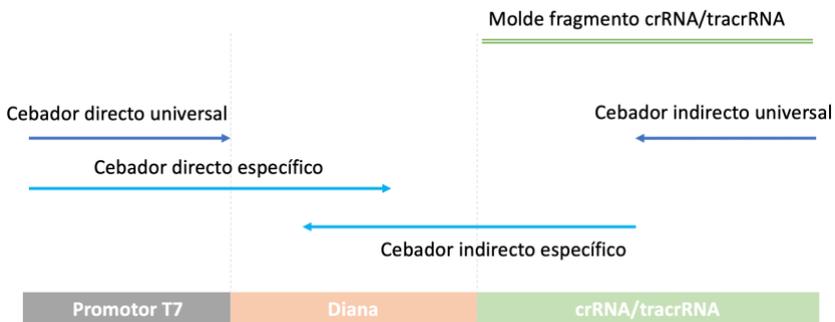


Figura 17. Síntesis del molde de DNA previo a la obtención de las sgRNA-IVT. Esquema de los cebadores utilizados para la síntesis *in vitro* de las sgRNA-IVT y estructura final del molde de DNA de la sgRNA-IVT.

3.4.3. Puesta a punto del sistema CRISPR/Cas9

Inicialmente, para la puesta a punto de las condiciones de transfección y la validación de las sgRNA-IVT sintetizadas en el laboratorio, se utilizó la línea celular humana de riñón HEK293.

a) Caracterización de la línea HEK293

Como en el caso de los linfocitos B inmortalizados, antes de trabajar con la línea HEK293 para la edición del gen *SERPINA1*, se caracterizaron estas células. Para ello, se extrajo el DNA para el estudio del número de copias del gen y del genotipo correspondiente a la mutación de interés y el RNA para realizar el ensayo de expresión génica.

b) Optimización de la transfección en HEK293

Se realizó una primera aproximación a la transfección de las HEK293 con el reactivo Lipofectamina™ 3000 (Thermo Fisher Scientific) y un plásmido que expresa GFP, p3C-eGFP, cedido por el Dr. Salvador Aliño (*Universitat de València*), para comprobar que estas células son transfectadas eficientemente mediante lipofección.

Se sembró en una placa P24, un número diferente de células HEK293 -70.000, 100.000 y 130.000- por pocillo. Tras 24 horas, se realizó la transfección mediante Lipofectamina™ 3000 (Thermo Fisher Scientific) y distintas cantidades del plásmido p3CeGFP: 1; 1,5; 2; 2,5 y 3 µg. Se mezclaron en un tubo, 25 µL

de medio reducido Opti-MEM™ con 1,5 µL de Lipofectamina™ 3000. En otros tubos se añadió la cantidad correspondiente de plásmido junto con 1 µL del reactivo P3000™ y 25 µL de Opti-MEM™. A continuación, se combinó el contenido de ambos tubos y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los lipoplejos. Después, estos 50 µL se añadieron a las células en cultivo y se incubaron durante 48 horas.

La eficiencia de la transfección se estimó a través de la fluorescencia emitida por el p3C-eGFP a las 24 y 48 horas. La fluorescencia se detectó mediante microscopía de fluorescencia y espectrofluorimetría, fijando la longitud de onda de excitación en 482 nm y la de emisión en 502 nm. En base a la confluencia celular y a la fluorescencia leída se decidió la condición óptima para la lipofección de la línea HEK293.

c) Validación de las sgRNA

La transfección de HEK293 con RNP, formadas por las sgRNA-IVT y la proteína *GeneArt™ Platinum™ Cas9 Nuclease* (B25640, Thermo Fisher Scientific), se llevó a cabo utilizando el reactivo de lipofección optimizado para CRISPR/Cas9, Lipofectamina™ CRISPRMAX™ (Thermo Fisher Scientific). Se sembraron 100.000 células en cuatro pocillos de una placa P24 y se incubaron durante 24 horas. Tras este tiempo se procedió a la

transfección. Siguiendo las indicaciones del fabricante para la formación de los complejos RNP, se mezclaron, por una parte, 625 ng de la proteína TrueCut™ Cas9 y 125 ng de cada una de las tres sgRNA-IVT con 25 μ L de Opti-MEM™ y 1,3 μ L de reactivo Cas9 Plus™. Además, se incluyó un control negativo que no contenía la endonucleasa Cas9. Por otra parte, se mezclaron 25 μ L de Opti-MEM con 1,5 μ L de Lipofectamina™ CRISPRMAX™. Estas dos diluciones se combinaron y, tras una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente para la formación de los lipoplejos, la mezcla se añadió al cultivo. Las células se incubaron durante 72 horas, tiempo suficiente para que se llevara a cabo la edición del gen *SERPINA1*.

Tras esta incubación se procedió a la validación de las sgRNA-IVT para determinar si habían sido capaces de unirse a la secuencia diana y editarla, en esta ocasión, de forma no homóloga mediante la ruta NHEJ. Para esto, se adquirió el kit *GeneArt™ Genomic Cleavage Detection* (A24372, Thermo Fisher Scientific), que contiene todos los reactivos necesarios para realizar el ensayo de la endonucleasa T7.

Primero, se eliminó el sobrenadante del cultivo y se lisaron las células añadiendo, directamente sobre la placa, 50 μ L de tampón de lisis suplementado con proteinasa K. El lisado se transfirió a tubos de PCR y se aplicaron los siguientes ciclos de

temperatura para la degradación de las proteínas y obtención del DNA: 15 minutos a 68 °C y 10 minutos a 95 °C. En caso de haber edición por CRISPR/Cas9, en el DNA obtenido habría tanto moléculas no editadas como moléculas editadas de forma aleatoria debido a la falta de un DNA molde.

A continuación, se amplificaron por PCR 2 µL de los lisados celulares utilizando el reactivo *AmpliTaq Gold® 360 Master Mix* y los cebadores correspondientes a una concentración final de 200 nM. Para cada sgRNA-IVT se obtuvo una pareja de cebadores específica que daba lugar a un amplicón de aproximadamente 600 bp que contenía la mutación correspondiente. Las parejas de cebadores utilizadas se indican a continuación:

- GCD1: 5'ATGCTGGGCTTGAATCCA3' y
 5'CCCATCAGCCAAAGCCTTGA3'
- GCD2: 5'CTTGAATCCAGGGGGGACTGAA3' y
 5'CAAAGCCTTGAGGAGGAGCAA3'
- GCD3: 5'ACATGCTGGGCTTGAATCCA3' y
 5'CCCATCAGCCAAAGCCTTGA3'

El programa de PCR que se llevó a cabo fue el siguiente: 10 minutos a 95 °C; 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 30 segundos a 72 °C; finalmente, 7 minutos a 72 °C.

Tras comprobar mediante electroforesis en un gel de agarosa (A9539, Sigma-Aldrich) al 2 % en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE; 10399519, Thermo Fisher Scientific) que la PCR había dado lugar a un amplicón único del tamaño esperado, se procedió a la purificación del producto de PCR. Se realizó mediante el kit *PureLink® PCR Purification* (Thermo Fisher Scientific).

Finalmente, el producto purificado de la PCR fue sometido a una reacción de desnaturalización y re-anillamiento y una posterior digestión con la endonucleasa T7. El fundamento de esta prueba es el siguiente: en el primer paso se desnaturaliza el DNA aumentando la temperatura hasta 95 °C y se mantiene durante 5 minutos, así se separan las dos cadenas complementarias. A continuación, se baja de nuevo la temperatura en dos pasos: de 95 °C a 85 °C con una velocidad de -2 °C/s y de 85 °C a 25 °C con una velocidad de $-0,1\text{ °C/s}$. De esta manera se permite el re-anillamiento de las cadenas de DNA, pero esta vez de forma aleatoria. En el caso de que hubiera habido edición por CRISPR/Cas9, la muestra no será homogénea y se formarán tanto moléculas homodúplex *wild type* perfectamente complementarias, como moléculas heterodúplex, donde una hebra está editada y la otra no. La endonucleasa T7 reconoce estos puntos donde la

complementariedad no es perfecta y corta la doble cadena, creando así moléculas de DNA de diferente tamaño: los homodúplex del tamaño del amplicón y los heterodúplex, que han sido cortados en dos fragmentos más pequeños (Figura 18).



Figura 18. Fundamento del ensayo de la endonucleasa T7. Se muestra el funcionamiento esquemático de la reacción de desnaturalización y anillamiento y la posterior digestión. Las líneas azules representan las cadenas de DNA amplificadas. Los puntos grises representan las mutaciones aleatorias provocadas por CRISPR/Cas9.

Para realizar el ensayo de la endonucleasa T7 se partió de 100 ng del producto purificado de PCR. Las muestras se mezclaron con 1 μ L del tampón de reacción y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 9 μ L. Entonces se llevó a cabo la reacción de desnaturalización y re-anillamiento por duplicado en cada muestra. A continuación, se añadió 1 μ L de la

endonucleasa T7 únicamente a uno de los duplicados, mientras que en el otro se agregó 1 μ L de agua, obteniendo así un control negativo. Se incubó durante 3 horas a 37 °C.

Las muestras digeridas y no digeridas se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % en tampón TAE durante una hora a 80 V. Las imágenes obtenidas del gel se analizaron con el programa Image LabTM (Bio-Rad) y el porcentaje de edición se calculó con la fórmula: $1 - [(1 - \text{fracción de digestión})^{1/2}]$, donde la fracción de digestión es igual a la suma de intensidades de las bandas digeridas entre el total de la suma de intensidades de las bandas digeridas y no digeridas (190).

3.4.4. Edición del gen *SERPINA1*

a) Edición en cultivos primarios

Se aislaron monocitos a partir de la sangre total de un donante sano y se sembraron 300.000 células por pocillo en una placa P24. Tras 24 horas, se procedió a la transfección con las mismas condiciones puestas a punto en la línea HEK293, es decir, utilizando el reactivo LipofectaminaTM CRISPRMAXTM añadiendo 625 ng de Cas9 y 125 ng de las sgRNA-IVT. 72 horas después de la transfección se realizó el ensayo de la endonucleasa T7.

También se transfectaron macrófagos derivados de monocitos primarios. Para ello, en una placa P24, se sembraron 300.000 monocitos primarios por pocillo aislados de un donante sano y se mantuvieron en cultivo. Dos semanas después, los monocitos se habían diferenciado a macrófagos. Sobre estos macrófagos se realizó la misma transfección que en los monocitos primarios y, tras 72 horas, se llevó a cabo el ensayo de la endonucleasa T7.

b) Edición de linfocitos B inmortalizados

Teniendo en cuenta la transfección realizada con pmaxGFP, para la edición con CRISPR/Cas9 en linfocitos B inmortalizados se utilizó el kit *SF Cell Line 4D-Nucleofector™ X* y el equipo Amaxa™ 4D-Nucleofector™. Los linfocitos se sembraron a una densidad de 500.000 cels/mL 24 horas antes de la transfección. Al día siguiente, se separaron alícuotas de 300.000 células y se lavaron con PBS para eliminar los restos de medio de cultivo. Para la formación de las RNP, se incubaron 125 ng de cada una de las sgRNA-IVT durante 15 minutos, a temperatura ambiente, junto con 625 ng de la proteína Cas9 en un volumen total de 5 µL en PBS. Transcurrido este tiempo, se añadieron 20 µL de la solución de transfección completa, preparada según las indicaciones del fabricante, y se resuspendieron las células. A continuación, las células con las RNP se traspasaron a las cubetas y se introdujeron

Materiales y métodos

en la subunidad X del equipo para llevar a cabo el pulso EO-115. Inmediatamente después se traspasaron las células a una placa P96 que contenía medio CM20 a 37 °C y se incubaron durante 72 horas. Finalmente, se realizó el ensayo de la endonucleasa T7.

3.5. Análisis estadístico y cálculos matemáticos

Para el cálculo de los valores de $2^{-\Delta Ct}$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalización de la síntesis proteica y porcentaje de edición génica se utilizó el programa Microsoft Excel.

Los datos obtenidos de los ensayos de expresión génica ($2^{-\Delta Ct}$) y del número de copias del gen ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) se expresan como la media de los triplicados \pm la desviación estándar. En el caso del ensayo del número de copias del gen, se comprobó la distribución normal de los datos mediante el test Shapiro-Wilk y se realizó un ensayo de comparación múltiple ANOVA. Se consideraron resultados estadísticamente significativos cuando el p valor fue menor a 0,05. Todo esto se llevó a cabo con el *software* Graph Pad Prism 6.0.

4. RESULTADOS

4.1. Establecimiento de una línea de monocitos inmortalizados

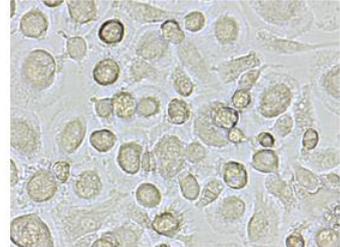
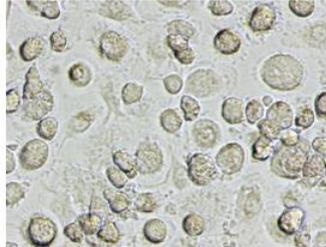
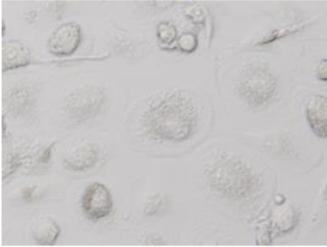
La utilización tanto de vectores no virales (Figura 19 y 20) como de vectores virales (Figura 21) se ha mostrado ineficaz a la hora de establecer una línea de monocitos inmortalizados. Han sido múltiples los abordajes y variadas las estrategias empleadas; sin embargo, en todos los casos, el resultado obtenido fue similar. La transfección alteraba el ciclo celular normal de los monocitos, ya que mientras las células control sin transfectar se diferenciaban a macrófagos, se observaba como el resto de las condiciones no lo hacían manteniendo la morfología esférica propia de los monocitos, aunque sin detectar proliferación celular. Inicialmente, en algún caso, sí que se expandió ligeramente el cultivo, pero posteriormente se detuvo el crecimiento. Algunos cultivos se mantuvieron durante algo más de un mes, pero las células no se dividían y acababan muriendo.

Resultados

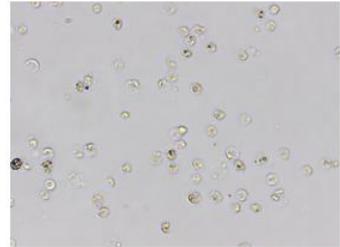
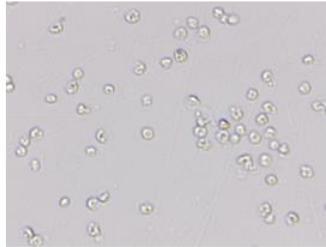
10 días

14 días

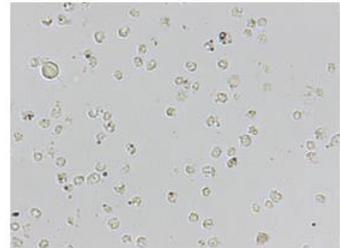
16 días



Control



3 µg SV40 + 3 µg hTERT



5 µg SV40 + 5 µg hTERT

Figura 19. Monocitos transfectados mediante electroporación con los plásmidos de expresión del antígeno T grande de SV40 (pBSSVD2005) y hTERT (pBABE-puro-hTERT).

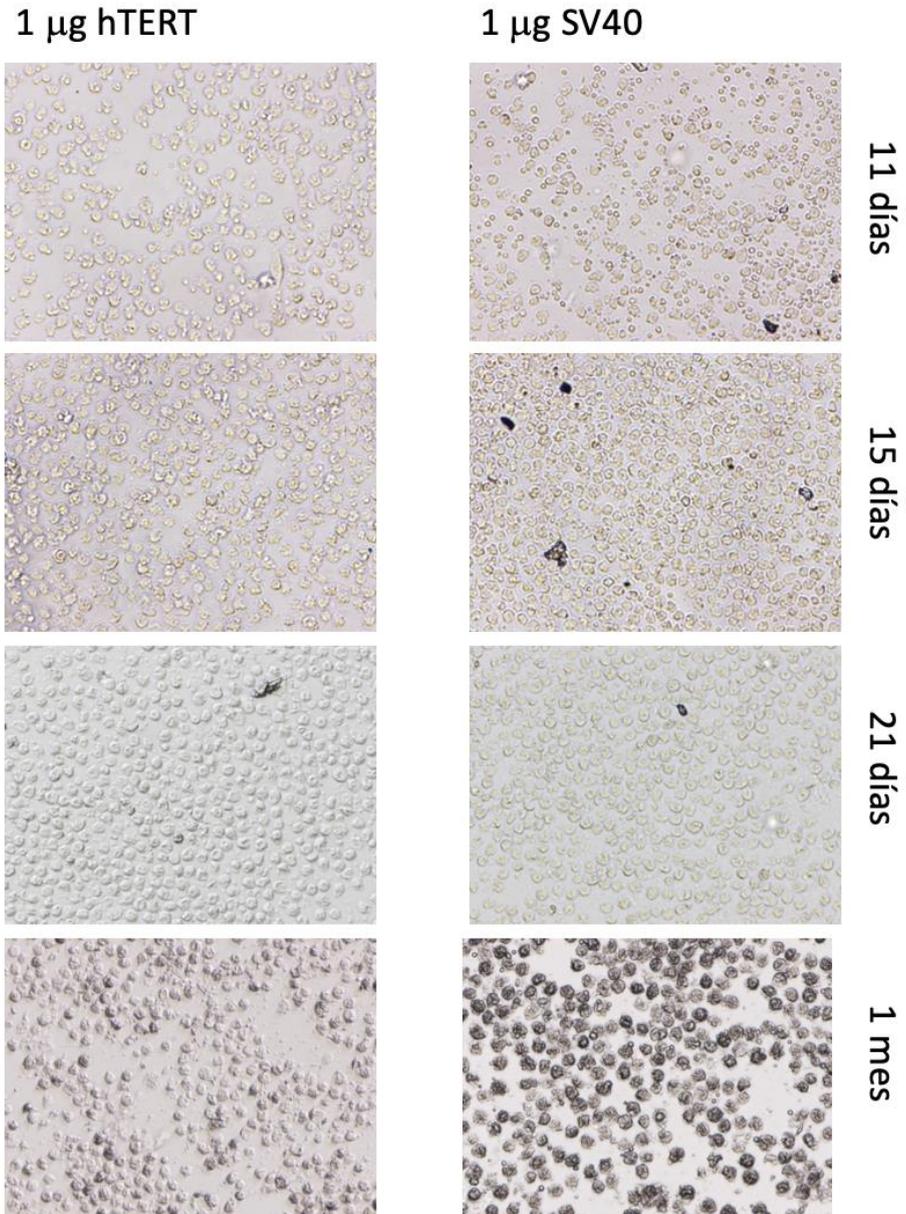
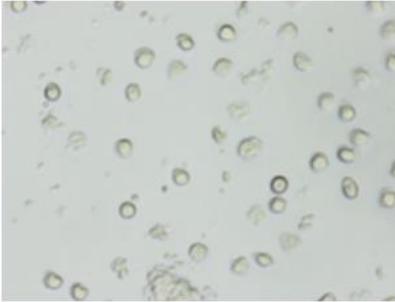
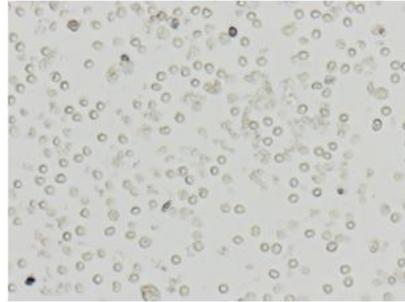


Figura 20. Monocitos transfectados mediante PEI con los plásmidos de expresión del antígeno T grande de SV40 (pBSSVD2005) y hTERT (pBABE-puro-hTERT).

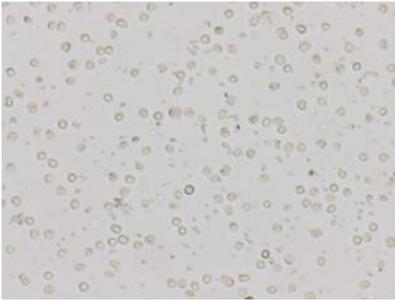
hTERT+CDK4



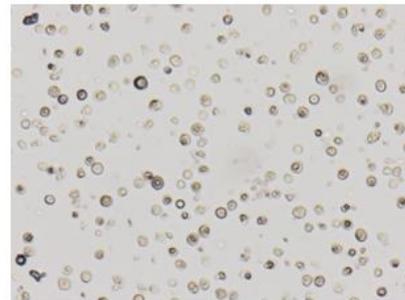
22 días



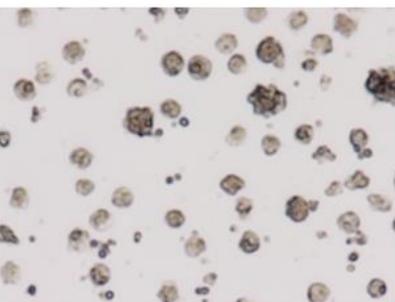
27 días



1 mes



1 mes y 4 días



1 mes y 9 días

Figura 21. Monocitos infectados con vectores lentivirales de expresión de hTERT (pLV-hTERT-IRES-hygro) y de CDK4 (pHAGE-CDK4-R24L).

4.2. Establecimiento de una línea de linfocitos B inmortalizados

4.2.1. Inmortalización de linfocitos B

En el presente trabajo, se han establecido cuatro líneas de linfocitos B inmortalizados con EBV provenientes de pacientes diagnosticados de DAAT: una como control con genotipo Pi*MM y tres deficitarias con genotipos: Pi*MS, Pi*SS y Pi*MZ, a las que se ha denominado, respectivamente, L-MM, L-MS, L-SS y L-MZ.

4.2.2. Caracterización celular

a) *Expresión génica*

El ensayo de expresión génica realizado a partir del RNA extraído de los linfocitos B inmortalizados permitió determinar no solo que había expresión del gen *SERPINA1* en estas líneas celulares sino también a qué nivel. Al normalizar los valores de C_t obtenidos para el gen *SERPINA1* frente a la expresión del gen *RPL13A* mediante el método $2^{-\Delta C_t}$ (186), se obtuvieron los niveles de expresión que se muestran en la tabla 6. Los valores obtenidos indican que el gen *SERPINA1* presenta un 1,7 % de expresión respecto al gen *RPL13A* en la línea L-MM; un 16,1 %

en la línea L-MS; un 33,9 % en la línea L-SS y un 26,2 % en la línea L-MZ.

Tabla 6. Valores de C_t obtenidos para cada línea celular (valor medio de los triplicados \pm desviación estándar) y cada uno de los dos genes ensayados y cálculo del $2^{-\Delta C_t}$ que indica el nivel de expresión del gen *SERPINA1* respecto a *RPL13A*

MUESTRA	<i>SERPINA1</i>	<i>RPL13A</i>	$2^{-\Delta C_t}$
L-MM	33,799 \pm 0,201	27,931 \pm 0,168	0,017 \pm 0,004
L-MS	31,018 \pm 1,371	28,223 \pm 0,584	0,161 \pm 0,073
L-SS	30,361 \pm 0,703	28,735 \pm 0,210	0,339 \pm 0,114
L-MZ	30,109 \pm 0,546	28,004 \pm 0,327	0,262 \pm 0,119

b) Cálculo del número de copias del gen

El número de copias del gen *SERPINA1* se determinó comparándolo por un lado con el gen *RNasa P*, utilizado como estándar, ya que se sabe que presenta dos copias en el genoma diploide humano, y por otro, con la expresión en PBMC primarias de un donante sano. Para ello se aplicó el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (186). Los resultados obtenidos en cada línea son cercanos a 1 y, tras un análisis estadístico aplicando el test ANOVA, no se detectan diferencias significativas con la muestra control. En consecuencia, el gen *SERPINA1* presenta la misma carga

genómica que el gen *RNasa P*, es decir, dos copias en el genoma celular (Tabla 7).

Tabla 7. Valores de C_t obtenidos para cada muestra (valor medio de los triplicados \pm desviación estándar) y cada uno de los dos genes ensayados y cálculo del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para la estimación del número de copias del gen *SERPINA1*, utilizando las PBMC como muestra de referencia.

MUESTRA	<i>SERPINA1</i>	<i>RNASE P</i>	$2^{-\Delta\Delta C_t}$
L-MM	27,502 \pm 1,160	29,243 \pm 1,492	1,160 \pm 0,086
L-MS	26,262 \pm 0,295	27,663 \pm 0,305	1,098 \pm 0,056
L-SS	26,966 \pm 0,939	28,345 \pm 0,936	1,082 \pm 0,048
L-MZ	27,509 \pm 0,565	28,809 \pm 0,635	1,024 \pm 0,070
PBMC	26,723 \pm 0,055	27,990 \pm 0,180	

c) Genotipado

La secuenciación Sanger confirmó la carga alélica esperada de todas las líneas celulares con los dos cebadores utilizados para cada mutación (FW y RV). Para el exón III, la secuencia Pi*M es GAA (FW)/TTC (RV) mientras que la secuencia Pi*S es GTA (FW)/ TAC (RV). En cambio, en el exón V la secuencia Pi*M corresponde al triplete GAG (FW)/CTC (RV) y la secuencia Pi*Z, al triplete AAG (FW)/CTT (RV). Como se puede observar en la figura 22, las secuencias obtenidas confirman que la línea L-MM es Pi*MM; la línea L-MS, Pi*MS; la línea L-SS, Pi*SS y la línea L-MZ, Pi*MZ. En las dos líneas heterocigotas se detectan dos picos

superpuestos en el electroferograma en el nucleótido responsable de la mutación, lo que indica que los dos alelos están presentes en la muestra. Aunque en la secuenciación de la línea L-MZ con el cebador FW del exón V la señal es muy baja y no se distingue con claridad estos dos picos de señal, podemos confirmar la presencia de los dos alelos en la secuenciación con el cebador RV.

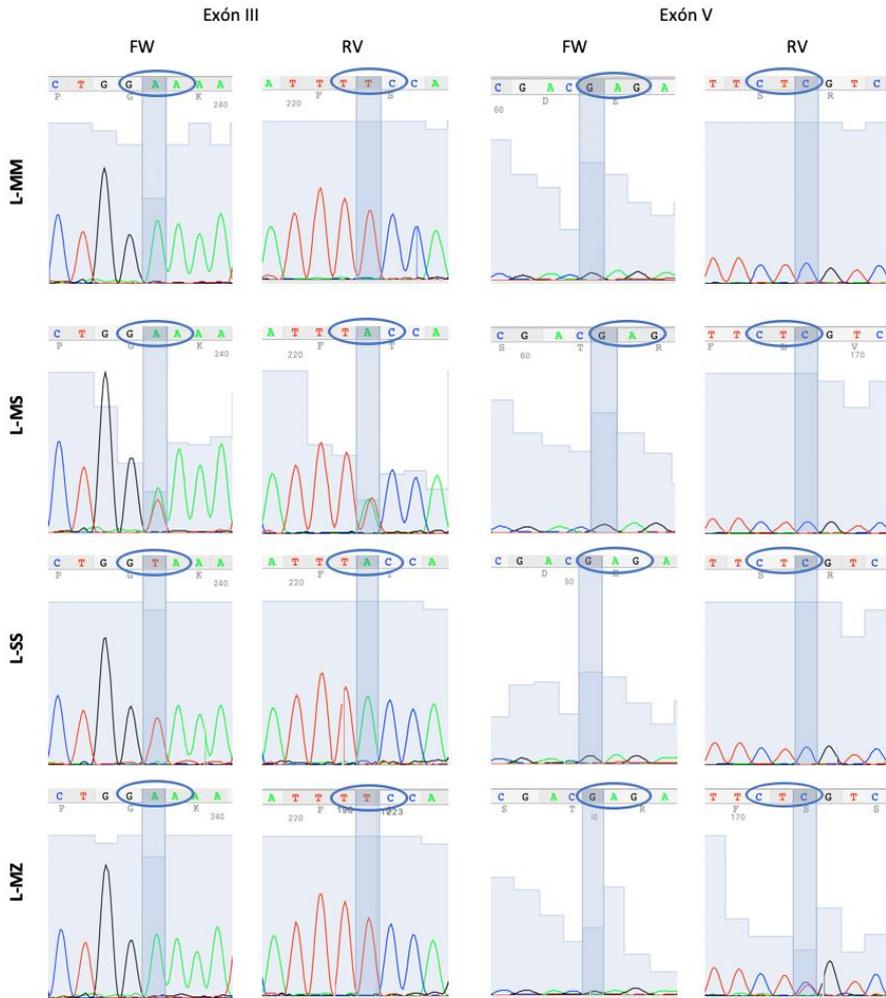


Figura 22. Electroferogramas obtenidos por secuenciación Sanger de las líneas de linfocitos B en los que se confirma la carga alélica de cada una de ellas. Con un círculo azul se indica el triplete de interés y destacado, el nucleótido responsable de la mutación.

d) Síntesis de AAT

Mediante *Western Blot* del lisado proteico de las células se detectó una banda del tamaño esperado, confirmando así a nivel de proteína la expresión detectada a nivel de mRNA (Figura 23). El análisis densitométrico realizado con el programa Image Lab™, permitió la normalización de la AAT frente a las proteínas totales detectadas con la tecnología *stain free* de Bio-Rad. Se obtuvieron los siguientes resultados: 0,0109 para L-MM; 0,0086 para L-MS; 0,0095 para L-SS; 0,0143 para L-MZ. Concluimos, por tanto, que los niveles de expresión de AAT total son similares entre los distintos fenotipos.

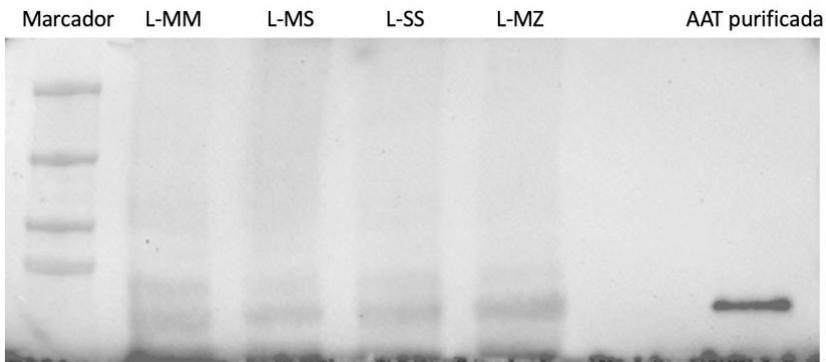


Figura 23. Resultado de la detección de la AAT mediante el anticuerpo 3C11 en los lisados celulares de las cuatro líneas de linfocitos B inmortalizados y un control positivo con AAT humana purificada.

4.2.3. Eficacia de la transfección con GFP

Se realizó una prueba de transfección utilizando el plásmido pmaxGFP con la línea L-MM de linfocitos B para determinar las condiciones óptimas de transfección con el equipo Amaxa™ 4D-Nucleofector™. Dos días después de la transfección se midió la fluorescencia del cultivo mediante citometría de flujo. Se seleccionó la población de linfocitos determinándose en ella el porcentaje de células positivas para la emisión de GFP (P2) (Figura 24), siendo este el porcentaje de células transfectadas. En base a los resultados mostrados en la tabla 8, se determinó que la condición más eficaz fue la que utilizó 300.000 células y 0,2 µg del plásmido.

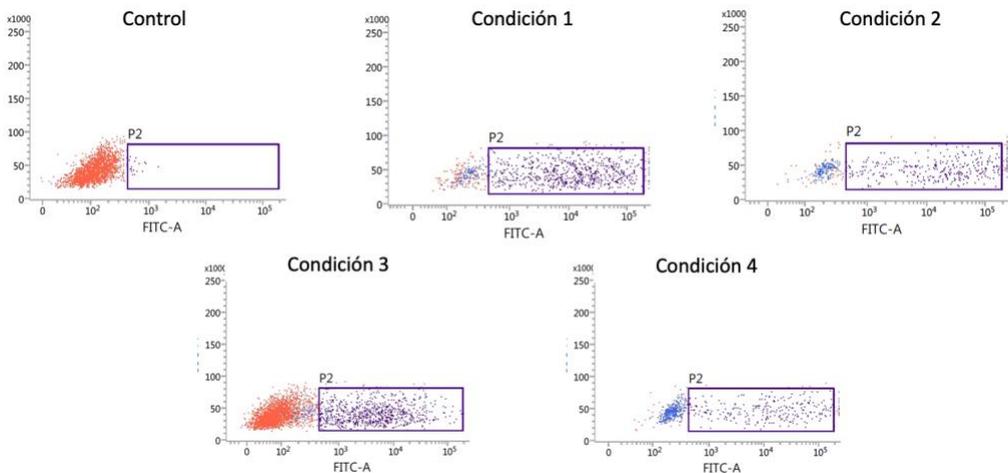


Figura 24. Selección por citometría de las células GFP positivas en la ventana P2 en las diferentes condiciones de transfección.

Tabla 8. Porcentaje de células transfectadas y sus condiciones de transfección.

	<i>TRANSFECCIÓN</i>		<i>% CÉLULAS TRANSFECTADAS (GFP +)</i>
	<i>Número células</i>	<i>Plásmido (μg)</i>	
CONTROL	300.000		
1	300.000	0,2	70,5
2	500.000	0,2	56,5
3	300.000	0,5	22,7
4	500.000	0,5	41,8

4.3. Puesta a punto del sistema CRISPR/Cas9

4.3.1. Caracterización celular HEK293

a) *Expresión génica*

Al realizar el ensayo de expresión génica partiendo del mRNA retrotranscrito de las células HEK293, se detectó amplificación del gen *SERPINA1* con un valor de C_t igual a $35,599 \pm 1,990$. Aplicando el cálculo del $2^{-\Delta C_t}$ (186) para normalizar frente a la expresión de *RPL13A*, se obtuvo un valor de $0,007 \pm 0,003$. Este valor es demasiado pequeño, por lo que se asume que no hay expresión de AAT en la línea celular HEK293 o, si la hay, la consideramos residual.

b) *Cálculo del número de copias del gen*

El ensayo del número de copias y el cálculo del $2^{-\Delta \Delta C_t}$ (186) permitió determinar que esta línea es diploide para el gen *SERPINA1*, dado que el valor obtenido es $1,073 \pm 0,125$ y no se detectaron diferencias estadísticamente significativas con la muestra control.

c) Genotipado

Los resultados de la secuenciación Sanger confirman que la línea celular HEK293 es homocigota Pi*M para la mutación de interés Pi*Z (Figura 25).

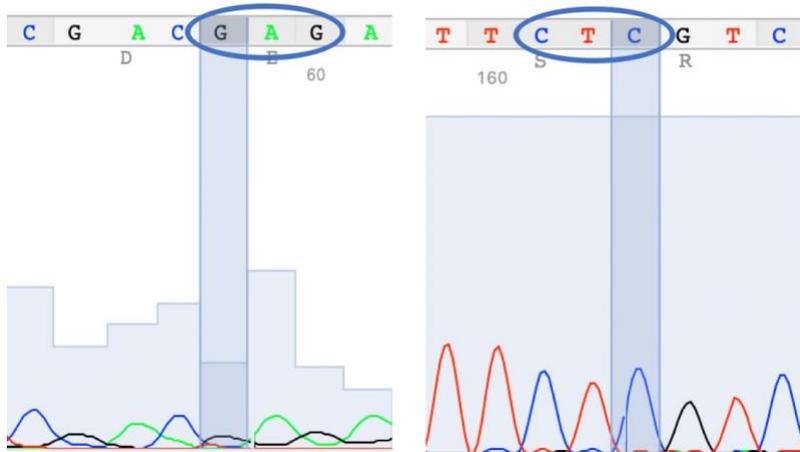


Figura 25. Electroferogramas obtenidos por secuenciación Sanger de la mutación Pi*Z de la línea células HEK293, en la que únicamente detectamos el alelo Pi*M. Con un círculo azul se indica el triplete mutado y, destacado, el nucleótido responsable de la mutación.

4.3.2. Optimización de las condiciones de transfección en HEK293

Con la finalidad de comprobar la eficacia de transfección de las células HEK293 mediante lipofección y establecer las condiciones de cultivo, se realizó una prueba utilizando distintas cantidades del plásmido p3C-eGFP y variando el número de células por pocillo. Se midió la fluorescencia a las 24 y 48 horas,

tanto por microscopía (Figura 26) como por espectrofluorimetría (Tabla 9). Teniendo en cuenta los valores de fluorescencia medidos, la confluencia celular tanto en el momento de la transfección como a las 48 horas y la cantidad de plásmido empleado, se estableció la condición con 100.000 células y 1 μg de plásmido como la óptima para la transfección de HEK293.

Tabla 9. Fluorescencia medida por espectrofluorimetría 48 horas después de la transfección.

	<i>PLÁSMIDO</i>	<i>1 μG</i>	<i>1,5 μG</i>	<i>2 μG</i>	<i>2,5 μG</i>	<i>3 μG</i>	<i>CONTROL</i>
<i>CÉLULAS</i>	130.000	4183	5327	4231	3932	4376	1076
	100.000	5357	3910	3759	5194	4475	1097
	70.000	4869	2713	3303	5651	6504	1064

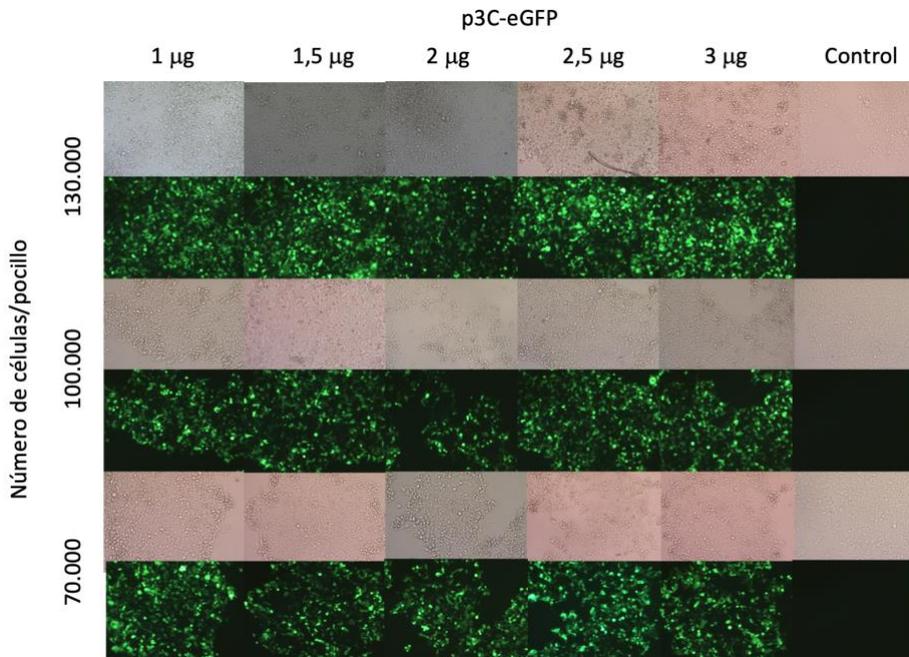


Figura 26. Células fluorescentes observadas mediante microscopía de fluorescencia y microscopía óptica a las 48 horas.

4.3.3. Validación de las sgRNA-IVT

d) Análisis de especificidad de las sgRNA-IVT

El análisis de las sgRNA-IVT, diseñadas con la herramienta Cas-OFFinder, da como resultado una lista de todas las secuencias diana que cumplen con los parámetros introducidos. Varias de ellas coinciden con el sitio diana en el gen *SERPINA1*, principalmente son las que presentan 0 y 1 emparejamientos no complementarios de bases, pero también algunas secuencias

con protuberancias y 2 emparejamientos no complementarios. Estos desajustes se encuentran en los nucleótidos más lejanos a la secuencia PAM. El resto de las secuencias -que son las posibles uniones inespecíficas para cada una de las sgRNA-IVT- y sus características, se muestran en la tabla 10. Todas aquellas que contienen una protuberancia en la sgRNA o el DNA, presentan también 2 uniones no complementarias, por lo que no cabe esperar actividad inespecífica en estos lugares predichos por el *software*. Además, el contenido en GC de las tres guías es menor del 60 %, reduciendo la probabilidad de cortes inespecíficos. Por tanto, cabe esperar que las sgRNA-IVT diseñadas sean específicas para el *locus* del exón V del gen *SERPINA1*.

Tabla 10. Características de las posibles secuencias de unión inespecíficas de las sgRNA-IVT diseñadas.

	% GC	PROTUBERANCIA	BASES NO COMPLEMENTARIAS	Nº SECUENCIAS
sgRNA- IVT1	55	DNA	2	1
		RNA	2	9
sgRNA- IVT2	50	DNA	2	1
		RNA	2	16
sgRNA- IVT3	50	RNA	2	4

e) *Análisis de la edición génica en HEK293*

El ensayo de la endonucleasa T7 demostró que las guías diseñadas fueron capaces de unirse al *locus* de la mutación Pi*Z del gen *SERPINA1* y de editarla de forma no homóloga en la línea celular HEK293. En el gel de agarosa, tras la electroforesis, se puede observar en todos los carriles una banda de 600 bp que corresponde al amplicón *wild type*. En las muestras digeridas se observan, además, unas bandas de menor tamaño que corresponden a los fragmentos generados por la endonucleasa T7 (Figura 27). Se detecta una banda de aproximadamente 400 bp y otras dos más pequeñas, de 220 y 200 bp. Esto indica la presencia de moléculas heterodúplex y, por ello, la edición provocada por el sistema CRISPR/Cas9. Para el cálculo de la eficiencia de transfección se han utilizado las bandas de los tamaños esperados, es decir, 400 y 200 bp. Para cada sgRNA-IVT, el porcentaje de edición obtenido ha sido el siguiente: 16 % para sgRNA-IVT1; 13,6 % para sgRNA-IVT2 y 14,3 % para sgRNA-IVT3.

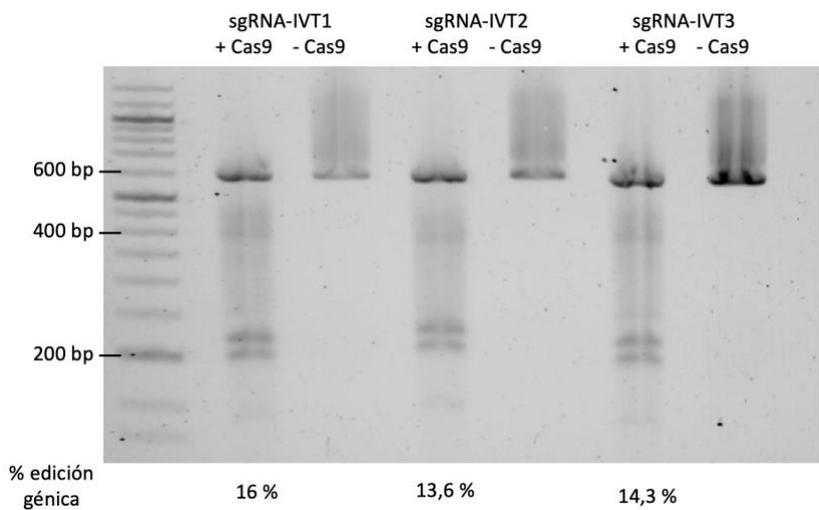


Figura 27. Resultado del ensayo de la endonucleasa T7 en la línea celular HEK293.

4.4. Edición génica del gen *SERPINA1*

4.4.1. Edición génica en cultivos primarios

Ante las dificultades en la obtención de una línea inmortalizada de monocitos para aplicar CRISPR/Cas9, se probó la edición no homóloga directamente sobre el cultivo primario tanto de monocitos como de macrófagos derivados de monocitos.

En la figura 28 se muestra el resultado de la electroforesis tras la digestión de los monocitos primarios. Primero las muestras transfectadas con las tres guías y la endonucleasa Cas9 y a continuación, una muestra transfectada únicamente con una de las guías, pero sin la Cas9 como control negativo. En todos los casos, el primer carril corresponde a la muestra digerida con la endonucleasa T7 y el segundo, a la muestra sin digerir. Se puede observar que, en los monocitos primarios, la única guía que parece haber sido capaz de editar el gen es la sgRNA-IVT2, ya que es la única en la que se detectan bandas de menor tamaño. El porcentaje de edición calculado, teniendo en cuenta las bandas de 400 y 200 bp, es de 14,2 %.

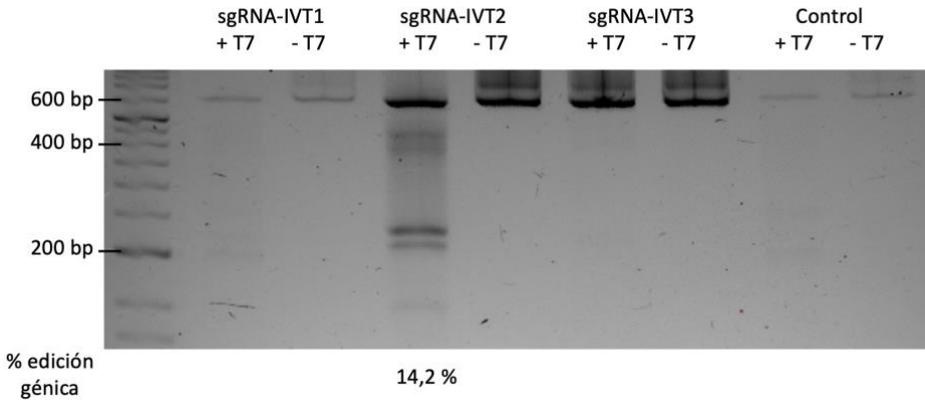


Figura 28. Resultado del ensayo de la endonucleasa T7 monocitos primarios.

En cambio, en los macrófagos, se transfectaron tres pocillos con las guías y la endonucleasa Cas9 y otros tres pocillos, únicamente con las guías como control negativo de cada una de ellas. En el ensayo de la endonucleasa T7 se digirieron todas las muestras. Como se observa en la imagen del gel de agarosa (Figura 29), se ha editado el gen tanto con la guía sgRNA-IVT2 como con la sgRNA-IVT3. Para el análisis de la edición solamente se han tenido en cuenta las bandas de 400 y 200 bp. El porcentaje de edición de la sgRNA-IVT2 es de 14,9 %, mientras que la de la sgRNA-IVT3 es de 12,3 %. La guía sgRNA-IVT1 en ninguno de los dos casos parece haber sido capaz de editar la mutación Pi*Z.

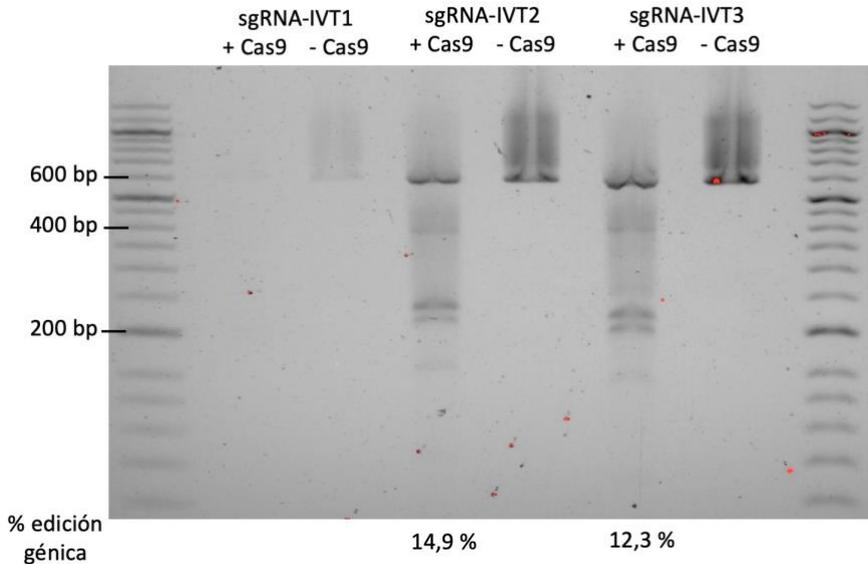


Figura 29. Resultado del ensayo de la endonucleasa T7 en macrófagos derivados de monocitos.

4.4.2. Edición génica en linfocitos B inmortalizados

La línea L-MM de linfocitos B se transfectó con las mismas guías que las HEK293 y los cultivos primarios para determinar si eran también eficaces en este modelo celular. Se transfectó con las tres guías junto con la endonucleasa Cas9 y, además, se añadió otra condición como control negativo, transfectada solo con una de las guías. En la figura 30 se muestra el resultado del ensayo de la endonucleasa T7. En el caso de la muestra control se digirió toda la muestra. En los siguientes carriles del gel se muestran las células transfectadas primero sin digerir y después,

digeridas con la endonucleasa T7. Del mismo modo que ocurre con los cultivos primarios, la guía sgRNA-IVT1 no ha sido capaz de editar el gen. No obstante, las guías sgRNA-IVT2 y sgRNA-IVT3 sí que han podido editar el gen *SERPINA1* en las células L-MM, ya que además del amplicón de 600 bp, se observan dos bandas de menor tamaño, de 400 y 200 bp. El porcentaje de edición calculado en este caso ha sido de 17 % para la guía sgRNA-IVT2 y de 7,9 % para la guía sgRNA-IVT3

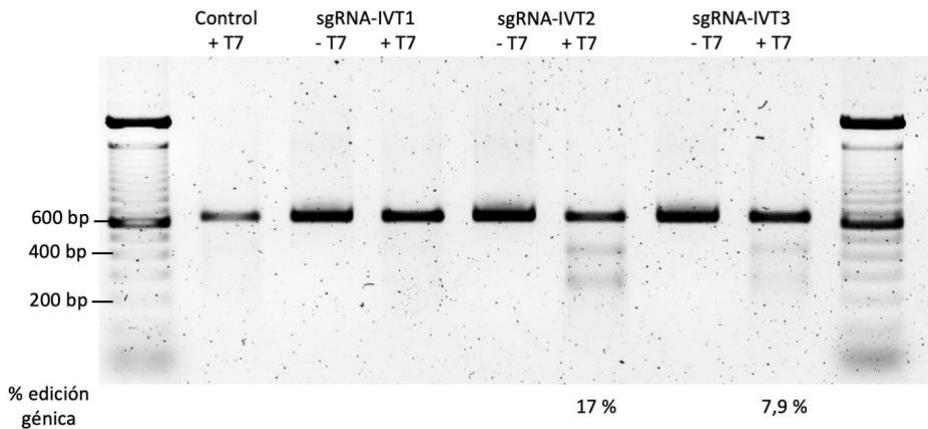


Figura 30. Resultado del ensayo de la endonucleasa T7 en la línea L-MM de linfocitos B.

5. DISCUSIÓN

A pesar de la controversia respecto a la eficacia clínica de la terapia aumentativa, no ha habido apenas avances ni mejoras desde que, en 1987, la FDA la aprobó para el tratamiento del DAAT. Cuestión destacable dado su elevado coste económico y el hecho de que no aborda la patología hepática, ni pueden beneficiarse de ella todos los pacientes (84). Se hace evidente, por tanto, la necesidad de hallar nuevas opciones para el tratamiento de esta enfermedad. Además, teniendo en cuenta su origen genético y que las mutaciones más prevalentes se encuentran perfectamente descritas, se puede pensar en la TG como potencial solución a este problema. En los últimos años, la descripción del sistema CRISPR/Cas9 para la edición génica ha revolucionado la investigación en este campo y ya se está aplicando para tratar otras enfermedades genéticas (116). Por ello, el objetivo de este trabajo fue la puesta a punto de la edición génica mediante CRISPR/Cas9 para la corrección de la mutación Pi*Z del gen *SERPINA1* en células de pacientes como primera aproximación a una posible TG del DAAT ante la falta de un tratamiento curativo.

Con este fin, primero se buscó un modelo *in vitro* de la enfermedad. Inicialmente, se transfectaron monocitos primarios para su immortalización, pero finalmente se establecieron cuatro líneas de linfocitos B immortalizados con

EBV que presentan diferentes genotipos del DAAT y, posteriormente, fueron caracterizadas. En paralelo, se diseñaron las sgRNA específicas para dirigir al sistema CRISPR/Cas9 a la mutación de interés, la mutación Pi*Z del gen *SERPINA1*, y se puso a punto la edición génica en la línea celular HEK293. Por último, una vez obtenido el modelo celular, se editó mediante CRISPR/Cas9 el *locus* de la mutación Pi*Z en los linfocitos B inmortalizados. También se realizó en cultivos primarios de monocitos y macrófagos derivados de monocitos. La edición se realizó de manera no homóloga, mediante la vía NHEJ que introduce pequeñas inserciones y deleciones aleatorias que interrumpen la expresión del gen.

Una parte importante del proyecto de esta tesis doctoral se centró en la obtención de un modelo celular del DAAT, necesario para la aplicación de CRISPR/Cas9. En otros ensayos publicados en la literatura, como modelo *in vitro*, se han utilizado células HEK293, en las que se introduce un plásmido que expresa la AAT en sus diferentes variantes alélicas (191). La sobreexpresión de AAT en esta línea celular se ha utilizado principalmente en estudios sobre la proteína y sus interacciones moleculares. En cambio, para la aplicación de CRISPR/Cas9, las hiPSCs han sido más utilizadas como modelo del DAAT (192). Sin embargo, estas células presentan algunos inconvenientes como la complejidad

del protocolo, la baja eficiencia de reprogramación y las altas tasas de mutaciones o alteraciones genéticas y epigenéticas que se pueden producir tanto por el proceso de reprogramación como por las condiciones de cultivo o la línea celular de origen (193).

Es por esto por lo que se buscó generar un modelo del DAAT a partir de células de pacientes diferente a los encontrados en otros ensayos. Se escogieron los monocitos porque son células productoras de AAT, se obtienen de manera poco invasiva y segura para el donante y son relativamente fáciles de aislar para ser cultivadas. No obstante, los monocitos no tienen capacidad de proliferación *in vitro*, sino que se diferencian a macrófagos cuando son mantenidos en cultivo. Para inducir la proliferación celular se introdujo, utilizando diferentes combinaciones, la expresión del antígeno T grande de SV40, hTERT y CDK4, ya establecidas como proteínas de inmortalización en otros cultivos primarios (178–180,183). Aunque se observaba una alteración del ciclo celular, ya que las células no se diferenciaban a macrófagos y se mantenían en cultivo durante semanas, no se alcanzó una proliferación mantenida en el tiempo con ninguna de las múltiples estrategias aplicadas. Tampoco se encontraron casos descritos en la literatura que hubieran llevado a cabo esta transformación previamente.

Esto llevó a la immortalización de linfocitos B mediante infección con EBV y su caracterización. Estas células se obtienen de forma poco invasiva para el paciente, el protocolo de immortalización está estandarizado y se han utilizado como modelo en otras enfermedades (184). De esta manera, se han establecido cuatro líneas celulares de linfocitos B immortalizados partiendo de células de pacientes que presentan los siguientes genotipos: Pi*MM, Pi*MS, Pi*SS y Pi*MZ. Una vez obtenidas y mantenidas en cultivo, se extrajo el DNA de las diferentes líneas para comprobar que la infección y transformación no había alterado el número de copias del gen *SERPINA1* ni la carga alélica del mismo. Esto era importante para la aplicación de CRISPR/Cas9 ya que un aumento en el número de copias del gen disminuiría la eficacia de la edición y la introducción de mutaciones podría impedir la unión de las sgRNA y dar lugar a la formación de moléculas heterodúplex que serían digeridas por la endonucleasa T7, distorsionando el cálculo del porcentaje de edición. Además, se analizó la producción de AAT tanto a nivel génico como de proteína. La caracterización llevada a cabo en el presente trabajo demuestra que el proceso de transformación no altera el número de copias ni el genotipo de los linfocitos B immortalizados con EBV y describe por vez primera que estas líneas celulares obtenidas de pacientes son capaces de expresar

la AAT, tanto a nivel de RNA como de proteína, con niveles de expresión suficientes para ser detectados por las técnicas qPCR y *Western Blot*.

En el repositorio de líneas celulares del Instituto Coriell encontramos cuatro líneas de linfocitos B transformados con EBV que presentan diferentes genotipos del DAAT: la línea GM20918 tiene el genotipo Pi*SZ; la línea GM03578, el Pi*ZZ; la línea GM03579, el Pi*MZ; y la línea GM20835, el Pi*MS. Se ha comprobado que en estas células no existe variabilidad entre los distintos laboratorios y que los resultados obtenidos son concordantes, pero únicamente a nivel de análisis del genotipo (194). No obstante, no se hace referencia a la expresión de la proteína AAT. Por consiguiente, el estudio realizado sobre las líneas celulares aquí generadas establece un nuevo modelo de la enfermedad, óptimo para estudios *in vitro*, con el que no se contaba hasta el momento y describe, por primera vez, que los linfocitos B inmortalizados también son células productoras de AAT.

A la hora de aplicar el sistema CRISPR/Cas9 para la edición de un gen, el primer punto para tener en cuenta es su introducción en las células. Se escogió utilizar RNP ya que, según la literatura, presentan ciertas ventajas en comparación con otros métodos. Las RNP suelen dar lugar a eficiencias de edición

más elevadas, son fáciles de obtener y minimizan la probabilidad de actividad inespecífica, ya que son degradadas al poco tiempo (195). Para la transfección se optó por vectores no virales por motivos de seguridad. Se utilizaron dos sistemas diferentes dependiendo de la línea celular. La Lipofectamina™ CRISPRMAX™ de ThermoFisher, que ha demostrado ser un sistema robusto de transfección (122), se aplicó sobre las células HEK293 y los cultivos primarios, y la electroporación mediante el equipo Amaxa™ 4D-Nucleofector™ (Lonza), eficaz en células difíciles de transfectar (120), se utilizó para las líneas de linfocitos B inmortalizados.

La puesta a punto del sistema CRISPR/Cas9 y la validación de las sgRNA diseñadas se llevó a cabo en la línea celular establecida HEK293. Se transfectaron mediante la Lipofectamina™ CRISPRMAX™ y se analizó si había habido edición con el ensayo de la endonucleasa T7. Como resultado se obtuvo que las tres guías ensayadas fueron capaces de editar el gen *SERPINA1* con unos porcentajes de edición entre el 13 y el 16 %. Una vez confirmada la actividad de las sgRNA-IVT se procedió a su aplicación sobre líneas celulares de interés para la fisiopatología del DAAT como son los monocitos primarios, los macrófagos derivados de monocitos y la línea establecida de linfocitos B inmortalizados. La sgRNA-IVT1 parece no tener

actividad en estas líneas, aunque sí que la tenía en las HEK293. En monocitos primarios, la sgRNA-IVT3 no ha dado lugar a edición, pero sí que lo ha hecho en los macrófagos derivados de monocitos y en los linfocitos B inmortalizados. En cambio, la sgRNA-IVT2 ha sido capaz de editar el gen diana en todas las líneas celulares estudiadas.

Los porcentajes de edición de los experimentos aquí realizados varían desde el 7 % al 17 %, no encontrando grandes diferencias entre los distintos tipos celulares y métodos de transfección utilizados. No obstante, en otros estudios, los porcentajes de edición por NHEJ presentan una gran variabilidad. Por ejemplo, en el caso del DAAT, en otro estudio realizado sobre hiPSCs, la edición del gen *SERPINA1*, mediante el uso de plásmidos para la expresión de CRISPR/Cas9 y electroporación, dio lugar a un 2,3 % de edición por NHEJ (175), porcentaje mucho más bajo que los obtenidos aquí para el mismo gen. En cambio, en otra investigación realizada usando también plásmidos, electroporación y la misma línea celular, pero esta vez con el gen *CCR5* como diana, la eficiencia de edición fue del 25 % (196). En otros ejemplos, la transfección de plásmidos mediante lipofección dio lugar a porcentajes de edición entre 7 y 54 % sobre el gen *USH2A* en fibroblastos primarios (197) y entre 15 y 22 % sobre el gen *CFTR* en la línea

celular HEK293T (198). En contraste, en un trabajo de optimización y comparación de diferentes reactivos de transfección, aplicando la Lipofectamina™ CRISPRMAX™ de ThermoFisher para introducir RNP dirigidas al gen *HPRT1* en la línea HEK293T, en condiciones similares a las utilizadas en este trabajo, la eficiencia obtenida es del 75 % (122). En el mismo estudio, aumentando la cantidad de RNP aplicada, la edición mediante CRISPR/Cas9 en hiPSCs cuando se usó Lipofectamina™ CRISPRMAX™, logró una eficiencia del 55 % que aumentó hasta el 85 % al utilizar la electroporación como vector. La gran variabilidad que se encuentra en la literatura respecto a las condiciones experimentales utilizadas y a los resultados obtenidos evidencia la multitud de factores que pueden afectar a la experimentación con CRISPR/Cas9 y a su eficiencia. Por tanto, los siguientes pasos de esta investigación podrían ir orientados a la optimización de estos factores para una transfección y una edición más eficiente, si bien los porcentajes de edición ya obtenidos son considerables y comparables con algunos de los estudios comentados anteriormente.

Hasta el momento, la TG aplicada al DAAT ha sido abordada principalmente desde la perspectiva del aumento genético basado en la introducción del gen que codifica para la AAT

funcional, pero sin modificar la carga alélica del paciente. Esto ha dado lugar a un considerable número de ensayos preclínicos y clínicos que no han alcanzado un efecto terapéutico (Tablas 3 y 4). No obstante, todavía se encuentran pocos ejemplos en los que se haya aplicado la tecnología CRISPR/Cas9 para la corrección de la mutación Pi*Z del gen *SERPINA1* mediante la vía HDR para la sustitución por la variante Pi*M. Uno de ellos se lleva a cabo utilizando un modelo de ratón transgénico Pi*Z *in vivo* (199) y otro, en hiPSCs *in vitro* (192). En este último, las células fueron transfectadas mediante electroporación con un plásmido para la expresión de la enzima Cas9 y la sgRNA, cuya secuencia coincide con la sgRNA-IVT1 diseñada en este trabajo, junto con el DNA molde, obteniendo un 6 % de corrección bialélica de la mutación (192). A pesar de que todavía quedan cuestiones por resolver como, entre otras, la especificidad y seguridad del tratamiento, la investigación sobre CRISPR/Cas9 ha avanzado mucho en pocos años y ya se está empezando a aplicar como TG en humanos, como es el caso de EDIT-101, desarrollada para tratar la amaurosis congénita de Leber tipo 10 (152). Resultados como los aquí obtenidos junto con los trabajos expuestos, acercan cada vez más el desarrollo de una terapia con CRISPR/Cas9 para el DAAT que podría llegar a los pacientes en el futuro.

En resumen, en el desarrollo de esta tesis doctoral se han generado cuatro líneas celulares de linfocitos B inmortalizados que presentan diferentes genotipos del DAAT. Estas líneas han sido caracterizadas por primera vez respecto a la expresión de AAT, que ha sido detectada tanto a nivel de mRNA como de proteína. Este hallazgo es relevante en tanto en cuanto describe un nuevo modelo celular del DAAT que reproduce diferentes genotipos de la enfermedad y es útil para estudios *in vitro* a nivel genético, como en este caso, y también, potencialmente, para ensayos a nivel de proteína. Sobre estas células y otros cultivos primarios de interés para la enfermedad, monocitos y macrófagos, se ha aplicado el sistema CRISPR/Cas9 dando lugar a la edición no homóloga del *locus* de la mutación Pi*Z, una de las variantes deficitarias más graves, validando el diseño experimental y las sgRNA empleadas.

6. CONCLUSIONES

- 1) La inmortalización de monocitos primarios obtenidos de pacientes mediante el uso de vectores virales y no virales para la expresión del antígeno T grande de SV40, hTERT o CDK4, aplicando diferentes combinaciones, no ha sido posible. Pese a observar alteraciones del cultivo, no se detectó proliferación celular.
- 2) La inmortalización de linfocitos B obtenidos de pacientes mediante infección con EBV ha dado lugar a cuatro líneas celulares con genotipos: Pi*MM, Pi*MS, Pi*SS y Pi*MZ.
- 3) La caracterización de las líneas celulares de linfocitos B ha demostrado que estas células son capaces de expresar AAT tanto a nivel de mRNA, detectado por qPCR, como de proteína, detectado por *Western Blot*.
- 4) El *locus* de la mutación Pi*Z del gen *SERPINA1* ha sido modificado mediante el sistema CRISPR/Cas9, en la línea celular HEK293, con las sgRNA diseñadas en este trabajo.
- 5) El *locus* de la mutación Pi*Z del gen *SERPINA1* ha sido modificado mediante el sistema CRISPR/Cas9, en monocitos primarios y en macrófagos derivados de monocitos de donantes voluntarios, con genotipo Pi*MM.

- 6) El *locus* de la mutación Pi*Z del gen *SERPINA1* ha sido modificado mediante el sistema CRISPR/Cas9 en la línea de linfocitos B inmortalizados con genotipo Pi*MM.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Blanco I, Lara B. Déficit de alfa-1 antitripsina: fisiopatología, enfermedades relacionadas, diagnóstico y tratamiento. 2ª edición. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica; 2016.
2. Orphanet: Deficiencia de alfa 1 antitripsina [Internet]. [citado 16 de julio de 2021]. Disponible en: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=ES&data_id=194&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=ORPHA60&Disease_Disease_Search_diseaseType=ORPHA&Enfermedad\(es\)/grupo%20de%20enfermedades=Deficiencia-de-alfa-1-antitripsina&title=Deficiencia%20de%20alfa-1%20antitripsina&search=Disease_Search_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=ES&data_id=194&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=ORPHA60&Disease_Disease_Search_diseaseType=ORPHA&Enfermedad(es)/grupo%20de%20enfermedades=Deficiencia-de-alfa-1-antitripsina&title=Deficiencia%20de%20alfa-1%20antitripsina&search=Disease_Search_Simple)
3. REDAAT - Registro Español de Pacientes con Déficit Alfa-1 Antritipsina [Internet]. [citado 4 de marzo de 2021]. Disponible en: <http://www.redaat.es/boletines.php>
4. Laurell C-B, Eriksson S. The Electrophoretic α ;1-Globulin Pattern of Serum in α ;1-Antitrypsin Deficiency. *Scand J Clin Lab Invest*. 1963;15(2):132-40.
5. Laurell C-B, Eriksson S. The serum α 1-antitrypsin in families with hypo- α 1-antitrypsinemia. *Clin Chim Acta*. 1965;11(5):395-8.
6. Fagerhol MK. The Pi-system: genetic variants of serum

- alpha-1-antitrypsin. *Ser Haematol.* 1968;151:153-61.
7. Sharp HL, Bridges RA, Krivit W, Freier EF. Cirrhosis associated with alpha-1-antitrypsin deficiency: a previously unrecognized inherited disorder. *J Lab Clin Med.* 1969;73(6):934-9.
 8. Berg NO, Eriksson S. Liver disease in adults with alpha-1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med.* 1972;287(25):1264-7.
 9. Janoff A. Inhibition of human granulocyte elastase by serum α 1-antitrypsin. *Am Rev Respir Dis.* 1972;105(1):121-2.
 10. Jeppsson J-O, Laurell C-B, Fagerhol MK. Properties of Isolated Human α 1-Antitrypsins of Pi Types M, S and Z. *Eur J Biochem.* 1978;83(1):143-53.
 11. Owen MC, Carrell RW, Brennan SO. The abnormality of the S variant of human α -1-antitrypsin. *Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct.* 1976;453(1):257-61.
 12. Long GL, Chandra T, Woo SL, Davie EW, Kurachi K. Complete sequence of the cDNA for human. alpha. 1-antitrypsin and the gene for the S variant. *Biochemistry.* 1984;23(21):4828-37.
 13. Perlino E, Cortese R, Ciliberto G. The human alpha 1-antitrypsin gene is transcribed from two different promoters in macrophages and hepatocytes. *EMBO J.* 1987;6(9):2767-71.
 14. Allen RC, Harley RA, Talamo RC. A new method for determination of alpha-1-antitrypsin phenotypes using isoelectric

focusing on polyacrylamide gel slabs. *Am J Clin Pathol.* 1974;62(6):732-9.

15. SERPINA1 homepage - CCHMC Molecular Genetics Laboratory Mutation Database - Leiden Open Variation Database [Internet]. [citado 12 de marzo de 2021]. Disponible en: https://research.cchmc.org/LOVD2/home.php?select_db=SERPINA1

16. Chapman K, Burdon J, Piitulainen E, Sandhaus R, Seersholm N, Stocks J, et al. RAPID Trial Study Group. Intravenous augmentation treatment and lung density in severe α 1 antitrypsin deficiency (RAPID): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2015;386(9991):360-8.

17. Fregonese L, Stolk J. Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. *Orphanet J Rare Dis.* 2008;3:16.

18. Hafeez W, Ciliberto G, Perlmutter DH. Constitutive and modulated expression of the human alpha 1 antitrypsin gene. Different transcriptional initiation sites used in three different cell types. *J Clin Invest.* 1992;89(4):1214-22.

19. Li Y, Zhou L, Twining SS, Sugar J, Yue BY. Involvement of Sp1 elements in the promoter activity of the α 1-proteinase inhibitor gene. *J Biol Chem.* 1998;273(16):9959-65.

20. Morgan K, Chappell S, Guetta-Baranés T, Morley S, Kalsheker N. The alpha-1-antitrypsin gene promoter in human

- A549 lung derived cells, and a novel transcription initiation site. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(5):1157-64.
21. Knoell D, Ralston DR, Coulter KR, Wewers MD. Alpha 1-antitrypsin and Protease Complexation Is Induced by Lipopolysaccharide, Interleukin-1 β , and Tumor Necrosis Factor- α in Monocytes. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(1):246-55.
22. Perlmutter DH, May LT, Sehgal PB. Interferon beta 2/interleukin 6 modulates synthesis of alpha 1-antitrypsin in human mononuclear phagocytes and in human hepatoma cells. *J Clin Invest.* 1989;84(1):138-44.
23. Gilchrist MA, Wagner A. A model of protein translation including codon bias, nonsense errors, and ribosome recycling. *J Theor Biol.* 2006;239(4):417-34.
24. Abboud RT, Nelson TN, Jung B, Mattman A. Alpha1-antitrypsin deficiency: a clinical-genetic overview. *Appl Clin Genet.* 2011;4:55-65.
25. Huber R, Carrell RW. Implications of the three-dimensional structure of alpha1-antitrypsin for structure and function of serpins. *Biochemistry.* 1989;28(23):8951-66.
26. Janciauskiene S, Wrenger S, Immenschuh S, Olejnicka B, Greulich T, Welte T, et al. The Multifaceted Effects of Alpha1-Antitrypsin on Neutrophil Functions. *Front Pharmacol.* 2018;9:341.

27. Janciauskiene SM, Bals R, Koczulla R, Vogelmeier C, Köhnlein T, Welte T. The discovery of α 1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respir Med.* 2011;105(8):1129-39.
28. Sun Z, Yang P. Role of imbalance between neutrophil elastase and α 1-antitrypsin in cancer development and progression. *Lancet Oncol.* 2004;5(3):182-90.
29. Lomas DA, Parfrey H. α ₁-Antitrypsin deficiency • 4: Molecular pathophysiology. *Thorax.* 2004;59(6):529.
30. M Hunt J, Tudor R. Alpha 1 anti-trypsin: one protein, many functions. *Curr Mol Med.* 2012;12(7):827-35.
31. Bergin DA, Hurley K, McElvaney NG, Reeves EP. Alpha-1 Antitrypsin: A Potent Anti-Inflammatory and Potential Novel Therapeutic Agent. *Arch Immunol Ther Exp.* 2012;60(2):81-97.
32. Jonigk D, Al-Omari M, Maegel L, Müller M, Izykowski N, Hong J, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of α 1-antitrypsin without inhibition of elastase. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(37):15007.
33. Lewis EC. Expanding the Clinical Indications for α 1-Antitrypsin Therapy. *Mol Med.* 2012;18(6):957-70.
34. Shapiro L, Pott GB, Ralston AH. Alpha-1-antitrypsin inhibits human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J.* 2001;15(1):115-22.
35. Münch J, Ständker L, Adermann K, Schulz A, Schindler

- M, Chinnadurai R, et al. Discovery and optimization of a natural HIV-1 entry inhibitor targeting the gp41 fusion peptide. *Cell*. 2007;129(2):263-75.
36. Bryan CL, Beard KS, Pott GB, Rahkola J, Gardner EM, Janoff EN, et al. HIV infection is associated with reduced serum alpha-1-antitrypsin concentrations. *Clin Invest Med*. 2010;E384-9.
37. Congote LF. The C-terminal 26-residue peptide of serpin A1 is an inhibitor of HIV-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343(2):617-22.
38. Knappstein S, Ide T, Schmidt MA, Heusipp G. α 1-Antitrypsin binds to and interferes with functionality of EspB from atypical and typical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun*. 2004;72(8):4344-50.
39. Griese M, Latzin P, Kappler M, Weckerle K, Heinzlmaier T, Bernhardt T, et al. α 1-Antitrypsin inhalation reduces airway inflammation in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J*. 2007;29(2):240-50.
40. Forney JR, Yang S, Healey MC. Interaction of the human serine protease inhibitor α -1-antitrypsin with *Cryptosporidium parvum*. *J Parasitol*. 1996;496-502.
41. Petrache I, Fijalkowska I, Zhen L, Medler TR, Brown E, Cruz P, et al. A novel antiapoptotic role for α 1-antitrypsin in the prevention of pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care*

Med. 2006;173(11):1222-8.

42. Levine RL, Berlett BS, Moskovitz J, Mosoni L, Stadtman ER. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev.* 1999;107(3):323-32.

43. Bucurenci N, Blake DR, Chidwick K, Winyard PG. Inhibition of neutrophil superoxide production by human plasma α 1-antitrypsin. *FEBS Lett.* 1992;300(1):21-4.

44. Kalis M, Kumar R, Janciauskiene S, Salehi A, Cilio CM. α 1-antitrypsin enhances insulin secretion and prevents cytokine-mediated apoptosis in pancreatic β -cells. *Islets.* 2010;2(3):185-9.

45. Lewis EC, Mizrahi M, Toledano M, DeFelice N, Wright JL, Churg A, et al. α 1-Antitrypsin monotherapy induces immune tolerance during islet allograft transplantation in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(42):16236-41.

46. Blanco I, de Serres FJ, Fernandez-Bustillo E, Lara B, Miravittles M. Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z alleles of α 1-antitrypsin deficiency in European countries. *Eur Respir J.* 2006;27(1):77.

47. Ferrarotti I, Baccheschi J, Zorzetto M, Tinelli C, Corda L, Balbi B, et al. Prevalence and phenotype of subjects carrying rare variants in the Italian registry for alpha₁-antitrypsin deficiency. *J Med Genet.* 2005;42(3):282.

48. Ogushi F, Fells GA, Hubbard RC, Straus SD, Crystal RG. Z-type alpha 1-antitrypsin is less competent than M1-type alpha

- 1-antitrypsin as an inhibitor of neutrophil elastase. *J Clin Invest.* 1987;80(5):1366-74.
49. Solís-Herruzo J, Solís-Muñoz P. Déficit de alfa-1 antitripsina. *GH Continuada.* 2009;8(1):44-8.
50. Teckman JH, Mangalat N. Alpha-1 antitrypsin and liver disease: mechanisms of injury and novel interventions. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;9(2):261-8.
51. Pan S, Huang L, McPherson J, Muzny D, Rouhani F, Brantly M, et al. Single nucleotide polymorphism-mediated translational suppression of endoplasmic reticulum mannosidase I modifies the onset of end-stage liver disease in alpha1-antitrypsin deficiency. *Hepatology.* 2009;50(1):275-81.
52. Bals R. Alpha-1-antitrypsin deficiency. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010;24(5):629-33.
53. DeMeo DL, Sandhaus RA, Barker AF, Brantly ML, Eden E, McElvaney NG, et al. Determinants of airflow obstruction in severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *Thorax.* 2007;62(9):806-13.
54. Turner AM, Stolk J, Bals R, Lickliter JD, Hamilton J, Christianson DR, et al. Hepatic-targeted RNA interference provides robust and persistent knockdown of alpha-1 antitrypsin levels in ZZ patients. *J Hepatol.* 2018;69(2):378-84.
55. Geraghty P, Rogan MP, Greene CM, Brantly ML, O'Neill SJ, Taggart CC, et al. Alpha-1-antitrypsin aerosolised

augmentation abrogates neutrophil elastase-induced expression of cathepsin B and matrix metalloprotease 2 in vivo and in vitro. *Thorax*. 2008;63(7):621.

56. Sinden NJ, Baker MJ, Smith DJ, Kreft J-U, Dafforn TR, Stockley RA. α -1-Antitrypsin variants and the proteinase/antiproteinase imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 2014;308(2):L179-90.

57. Escribano A, Amor M, Pastor S, Castillo S, Sanz F, Codoñer-Franch P, et al. Decreased glutathione and low catalase activity contribute to oxidative stress in children with α -1 antitrypsin deficiency. *Thorax*. 2015;70(1):82.

58. Johnson EF, Tolkachjov SN, Gibson LE. Alpha-1 antitrypsin deficiency panniculitis: clinical and pathologic characteristics of 10 cases. *Int J Dermatol*. 2018;57(8):952-8.

59. Savige JA, Chang L, Cook L, Burdon J, Daskalakis M, Doery J. α 1-Antitrypsin deficiency and anti-proteinase 3 antibodies in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol*. 1995;100(2):194-7.

60. Esnault VL, Testa A, Audrain M, Rogé C, Hamidou M, Barrier JH, et al. Alpha1-antitrypsin genetic polymorphism in ANCA-positive systemic vasculitis. *Kidney Int*. 1993;43(6):1329-32.

61. European RS, American Thoracic Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(7):818-900.
62. Hollander C, Westin U, Wallmark A, Piitulainen E, Sveger T, Janciauskiene SM. Plasma levels of alpha1-antichymotrypsin and secretory leukocyte proteinase inhibitor in healthy and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) subjects with and without severe α 1-antitrypsin deficiency. *BMC Pulm Med* [Internet]. 2007 [citado 22 de julio de 2021];7(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1800898/>
63. Davis DG, Schaefer DMW, Hinchcliff KW, Wellman ML, Willet VE, Fletcher JM. Measurement of Serum IgG in Foals by Radial Immunodiffusion and Automated Turbidimetric Immunoassay. *J Vet Intern Med.* 2005;19(1):93-6.
64. Morais IPA, Tóth IV, Rangel AOSS. Turbidimetric and Nephelometric Flow Analysis: Concepts and Applications. *Spectrosc Lett.* 2006;39(6):547-79.
65. Ruiz-Duque B, Bañuls L, Reinoso-Arija R, Carrasco-Hernandez L, Caballero-Eraso C, Dasí F, et al. Methodologies for the Determination of Blood Alpha1 Antitrypsin Levels: A Systematic Review. *J Clin Med.* 2021;10(21):5132.

66. Tonelli AR, Brantly ML. Augmentation therapy in alpha-1 antitrypsin deficiency: advances and controversies. *Ther Adv Respir Dis.* 2010;4(5):289-312.
67. Ottaviani S, Gorrini M, Scabini R, Kadija Z, Paracchini E, Mariani F, et al. C reactive protein and alpha1-antitrypsin: relationship between levels and gene variants. *Transl Res.* 2011;157(6):332-8.
68. Ljubic M, Topic A, Divac A, Nikolic A, Petrovic-Stanojevic N, Surlan M, et al. Isoelectric focusing phenotyping and denaturing gradient gel electrophoresis genotyping: a comparison of two methods in detection of alpha-1-antitrypsin variants. *Transl Res.* 2008;151(5):255-9.
69. Bartels CL, Marchetti AL, Edward Highsmith W, Tsongalis GJ. Real time PCR detection of the PI*Z and PI*S mutations associated with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Transl Res.* 2009;1(4):406-11.
70. Ferrarotti I, Zorzetto M, Scabini R, Mazzola P, Campo I, Luisetti M. A novel method for rapid genotypic identification of alpha 1-antitrypsin variants. *Diagn Mol Pathol Am J Surg Pathol Part B.* 2004;13(3):160-3.
71. Veith M, Klemmer A, Anton I, El Hamss R, Rapun N, Janciauskiene S, et al. Diagnosing Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Using A PCR/Luminescence-Based Technology. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2019;14:2535-42.

72. von Nussbaum F, Li VM-J. Neutrophil elastase inhibitors for the treatment of (cardio)pulmonary diseases: Into clinical testing with pre-adaptive pharmacophores. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015;25(20):4370-81.
73. Berthelier V, Harris JB, Estenson KN, Baudry J. Discovery of an inhibitor of Z-alpha1 antitrypsin polymerization. *PloS One*. 2015;10(5):e0126256.
74. Mullins CD, Wang J, Stoller JK. Major Components of the Direct Medical Costs of α 1-Antitrypsin Deficiency. *Chest*. 2003;124(3):826-31.
75. Franciosi AN, McCarthy C, McElvaney NG. The efficacy and safety of inhaled human α -1 antitrypsin in people with α -1 antitrypsin deficiency-related emphysema. *Expert Rev Respir Med*. marzo de 2015;9(2):143-51.
76. Stolk J, Tov N, Chapman KR, Fernandez P, MacNee W, Hopkinson NS, et al. Efficacy and safety of inhaled α 1-antitrypsin in patients with severe α 1-antitrypsin deficiency and frequent exacerbations of COPD. *Eur Respir J*. 2019;54(5):1900673.
77. Spencer LT, Humphries JE, Brantly ML. Antibody Response to Aerosolized Transgenic Human Alpha1-Antitrypsin. *N Engl J Med*. 2005;352(19):2030-1.
78. Karnaukhova E, Ophir Y, Golding B. Recombinant human alpha-1 proteinase inhibitor: towards therapeutic use.

Amino Acids. 2006;30(4):317-32.

79. Rudnick DA, Shikapwashya O, Blomenkamp K, Teckman JH. Indomethacin increases liver damage in a murine model of liver injury from alpha-1-antitrypsin deficiency. *Hepatology*. 2006;44(4):976-82.

80. Fairbanks KD, Tavill AS. Liver Disease in Alpha 1-Antitrypsin Deficiency: A Review. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(8):2136-41.

81. Teckman JH. Lack of Effect of Oral 4-Phenylbutyrate on Serum Alpha-1-Antitrypsin in Patients with α -1-Antitrypsin Deficiency: A Preliminary Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;39(1):34-7.

82. Herrero MJ, Sendra L, Miguel A, Aliño SF. Physical Methods of Gene Delivery. En: Brunetti-Pierri N, editor. *Safety and Efficacy of Gene-Based Therapeutics for Inherited Disorders* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 113-35. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-53457-2_6

83. Patil P, Chaudhari P, Sahu M, Duragkar N. Review article on gene therapy. *Res J Pharmacol Pharmacodyn*. 2012;4(2):77-83.

84. Torres-Durán M, Lopez-Campos JL, Barrecheguren M, Miravittles M, Martinez-Delgado B, Castillo S, et al. Alpha-1 antitrypsin deficiency: outstanding questions and future

- directions. *Orphanet J Rare Dis.* 2018;13(1):114.
85. Friedmann T, Roblin R. Gene Therapy for Human Genetic Disease? *Science.* 1972;175(4025):949-55.
86. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao G, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab.* 2003;80(1):148-58.
87. Russell S, Bennett J, Wellman JA, Chung DC, Yu Z-F, Tillman A, et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl.* 26 de agosto de 2017;390(10097):849-60.
88. Dunbar CE, High KA, Joung JK, Kohn DB, Ozawa K, Sadelain M. Gene therapy comes of age. *Science.* 2018;359(6372):eaan4672.
89. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93(3):1156-60.
90. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet.* 2010;11(9):636-46.
91. DiGiusto DL, Cannon PM, Holmes MC, Li L, Rao A, Wang J, et al. Preclinical development and qualification of ZFN-

mediated CCR5 disruption in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Mol Ther - Methods Clin Dev.* 2016;3:16067.

92. Reik A, Zhou Y, Wagner J, Hamlett A, Mendel M, Liu P-Q, et al. Zinc finger nucleases targeting the glucocorticoid receptor allow IL-13 zetakine transgenic CTLs to kill glioblastoma cells in vivo in the presence of immunosuppressing glucocorticoids. *Cancer Res.* 2008;68(9 Supplement):2557.

93. Lessard S, Rimmele P, Ling H, Moran K, Vieira B, Lin Y-D, et al. Zinc Finger Nuclease-Mediated Disruption of the BCL11A Erythroid Enhancer Results in Enriched Biallelic Editing, Increased Fetal Hemoglobin, and Reduced Sickling in Erythroid Cells Derived from Sickle Cell Disease Patients. *Blood.* 2019;134(Supplement_1):974.

94. Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, et al. Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science.* 2009;326(5959):1509-12.

95. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(1):49-55.

96. Ashmore-Harris C, Fruhwirth GO. The clinical potential of gene editing as a tool to engineer cell-based therapeutics. *Clin Transl Med.* 2020;9(1):e15.

97. Qasim W, Ciocarlie O, Adams S, Inglott S, Murphy C,

Rivat C, et al. Preliminary results of UCART19, an allogeneic anti-CD19 CAR T-cell product in a first-in-human trial (PALL) in pediatric patients with CD19+ relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017;130(Suppl 1):1271.

98. Graham C, Yallop D, Jozwik A, Patten P, Dunlop A, Ellard R, et al. Preliminary Results of UCART19, an Allogeneic Anti-CD19 CAR T-Cell Product, in a First-in-Human Trial (CALM) in Adult Patients with CD19+ Relapsed/Refractory B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 2017;130(Supplement 1):887-887.

99. 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(6096):816-21.

100. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(39):E2579-2586.

101. Warnock JN, Daigre C, Al-Rubeai M. Introduction to Viral Vectors. En: Merten O-W, Al-Rubeai M, editores. *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2011. p. 1-25. (Methods in Molecular Biology).

102. Al-Dosari MS, Gao X. Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. *AAPS J*.

2009;11(4):671.

103. Sendra L, Miguel A, Pérez-Enguix D, Herrero MJ, Montalvá E, García-Gimeno MA, et al. Studying Closed Hydrodynamic Models of «In Vivo» DNA Perfusion in Pig Liver for Gene Therapy Translation to Humans. *PloS One*. 2016;11(10):e0163898-e0163898.

104. Sendra Gisbert L, Miguel Matas A, Sabater Ortí L, Herrero MJ, Sabater Olivas L, Montalvá Orón EM, et al. Efficacy of hydrodynamic interleukin 10 gene transfer in human liver segments with interest in transplantation. *Liver Transpl*. 2017;23(1):50-62.

105. Kotnik T, Frey W, Sack M, Haberl Meglič S, Peterka M, Miklavčič D. Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2015;33(8):480-8.

106. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*. 2010;397(8):3173-8.

107. Parker AL, Newman C, Briggs S, Seymour L, Sheridan PJ. Nonviral gene delivery: techniques and implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*. 2003;5(22):1-15.

108. Ramamoorth M, Narvekar A. Non viral vectors in gene therapy- an overview. *J Clin Diagn Res JCDR*. 2015;9(1):GE01-6.

109. Sokolova V, Eppele M. Inorganic Nanoparticles as Carriers of Nucleic Acids into Cells. *Angew Chem Int Ed*.

2008;47(8):1382-95.

110. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987;169(12):5429-33.

111. Mojica FJM, Juez G, Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol.* 1993;9(3):613-21.

112. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J Mol Evol.* 2005;60(2):174-82.

113. Jansen R, Embden JDA van, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 2002;43(6):1565-75.

114. Ishino Y, Krupovic M, Forterre P. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *J Bacteriol.* 2018;200(7):e00580-17.

115. Hryhorowicz M, Lipiński D, Zeyland J, Słomski R. CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Arch Immunol Ther Exp.* 2017;65(3):233-40.

116. Pickar-Oliver A, Gersbach CA. The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(8):490-507.
117. Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol.* 2017;37:67-78.
118. Barrangou R, Marraffini LA. CRISPR-Cas Systems: Prokaryotes Upgrade to Adaptive Immunity. *Mol Cell.* 2014;54(2):234-44.
119. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281-308.
120. Liang X, Potter J, Kumar S, Zou Y, Quintanilla R, Sridharan M, et al. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol.* 2015;208:44-53.
121. Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim J-S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* 2014;24(6):1012-9.
122. Yu X, Liang X, Xie H, Kumar S, Ravinder N, Potter J, et al. Improved delivery of Cas9 protein/gRNA complexes using lipofectamine CRISPRMAX. *Biotechnol Lett.* 2016;38(6):919-29.

123. Zhu S, Li W, Liu J, Chen C-H, Liao Q, Xu P, et al. Genome-scale deletion screening of human long non-coding RNAs using a paired-guide RNA CRISPR–Cas9 library. *Nat Biotechnol.* 2016;34(12):1279-86.
124. Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, Wu J, Zhu J, Kim EJ, et al. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature.* 2016;540(7631):144-9.
125. Maddalo D, Manchado E, Concepcion CP, Bonetti C, Vidigal JA, Han Y-C, et al. In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature.* 2014;516(7531):423-7.
126. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell.* febrero de 2013;152(5):1173-83.
127. Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, Fu Y, Ho QH, Keith Joung J. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods.* 2013;10:977-9.
128. Gopalappa R, Suresh B, Ramakrishna S, Kim H. Paired D10A Cas9 nickases are sometimes more efficient than individual nucleases for gene disruption. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(12):71-71.
129. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX,

Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. enero de 2016;351(6268):84-8.

130. Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*. enero de 2016;529(7587):490-5.

131. Chen JS, Dagdas YS, Kleinstiver BP, Welch MM, Sousa AA, Harrington LB, et al. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature*. 2017;550(7676):407-10.

132. Vakulskas CA, Dever DP, Rettig GR, Turk R, Jacobi AM, Collingwood MA, et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Med*. 2018;24(8):1216-24.

133. Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, et al. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. abril de 2015;520(7546):186-91.

134. Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Topkar VV, Zheng Z, et al. Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition. *Nat Biotechnol*. 2015;33(12):1293-8.

135. Yamada M, Watanabe Y, Gootenberg JS, Hirano H, Ran FA, Nakane T, et al. Crystal Structure of the Minimal Cas9 from

- Campylobacter jejuni Reveals the Molecular Diversity in the CRISPR-Cas9 Systems. *Mol Cell*. 2017;65(6):1109-1121.e3.
136. Hou Z, Zhang Y, Propson NE, Howden SE, Chu L-F, Sontheimer EJ, et al. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(39):15644-9.
137. Kleinstiver BP, Tsai SQ, Prew MS, Nguyen NT, Welch MM, Lopez JM, et al. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*. enero de 2016;34(8):869-74.
138. 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(7603):420-4.
139. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*. 2017;551(7681):464-71.
140. Gajula KS. Designing an Elusive C•G→G•C CRISPR Base Editor. *Trends Biochem Sci*. 1 de febrero de 2019;44(2):91-4.
141. Anzalone AV, Koblan LW, Liu DR. Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol*. 2020;38(7):824-44.
142. O’Connell MR, Oakes BL, Sternberg SH, East-Seletsky

- A, Kaplan M, Doudna JA. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Nature*. 2014;516(7530):263-6.
143. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Franklin B, Koob J, Kellner MJ, Ladha A, et al. A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing. *Science*. 2019;365(6451):382-6.
144. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 2017;356(6336):438-42.
145. Fozouni P, Son S, Derby MD de L, Knott GJ, Gray CN, D'Ambrosio MV, et al. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy. *Cell*. 2021;184(2):323-33.
146. Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Franklin B, Kellner MJ, Joung J, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*. 2017;358(6366):1019-27.
147. Lu Y, Xue J, Deng T, Zhou X, Yu K, Deng L, et al. Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer. *Nat Med*. 2020;26(5):732-40.
148. Stadtmauer EA, Fraietta JA, Davis MM, Cohen AD, Weber KL, Lancaster E, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*. 2020;367(6481):eaba7365.

149. Xu L, Wang J, Liu Y, Xie L, Su B, Mou D, et al. CRISPR-Edited Stem Cells in a Patient with HIV and Acute Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med.* 2019;381(13):1240-7.
150. Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, Chen Y-S, Domm J, Eustace BK, et al. CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *N Engl J Med.* 2021;384(3):252-60.
151. Foss DV, Hochstrasser ML, Wilson RC. Clinical applications of CRISPR-based genome editing and diagnostics. *Transfusion.* 2019;59(4):1389-99.
152. Maeder ML, Stefanidakis M, Wilson CJ, Baral R, Barrera LA, Bounoutas GS, et al. Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nat Med.* 2019;25(2):229-33.
153. Editas Medicine Announces Positive Initial Clinical Data from Ongoing Phase 1/2 BRILLIANCE Clinical Trial of EDIT-101 for LCA10 | Editas Medicine [Internet]. [citado 5 de octubre de 2021]. Disponible en: <https://ir.editasmedicine.com/news-releases/news-release-details/editas-medicine-announces-positive-initial-clinical-data-ongoing>
154. Wagner DL, Peter L, Schmueck-Henneresse M. Cas9-directed immune tolerance in humans—a model to evaluate regulatory T cells in gene therapy? *Gene Ther.* 2021;28(9):549-59.

155. Finn JD, Smith AR, Patel MC, Shaw L, Youniss MR, van Heteren J, et al. A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing. *Cell Rep.* 2018;22(9):2227-35.
156. Li Y, Glass Z, Huang M, Chen Z-Y, Xu Q. Ex vivo cell-based CRISPR/Cas9 genome editing for therapeutic applications. *Biomaterials.* 2020;234:119711.
157. Zeitelhofer M, Vessey JP, Xie Y, Tübing F, Thomas S, Kiebler M, et al. High-efficiency transfection of mammalian neurons via nucleofection. *Nat Protoc.* 2007;2(7):1692-704.
158. Gong Y, Tian S, Xuan Y, Zhang S. Lipid and polymer mediated CRISPR/Cas9 gene editing. *J Mater Chem B.* 2020;8(20):4369-86.
159. Lin Y, Cradick TJ, Brown MT, Deshmukh H, Ranjan P, Sarode N, et al. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(11):7473-85.
160. Anderson EM, Haupt A, Schiel JA, Chou E, Machado HB, Strezoska Ž, et al. Systematic analysis of CRISPR–Cas9 mismatch tolerance reveals low levels of off-target activity. *J Biotechnol.* 2015;211:56-65.
161. Bañuls L, Pellicer D, Castillo S, Navarro-García MM, Magallón M, González C, et al. Gene Therapy in Rare Respiratory Diseases: What Have We Learned So Far? *J Clin*

Med. 2020;9(8):E2577.

162. Wozniak J, Wandtke T, Kopinski P, Chorostowska-Wynimko J. Challenges and Prospects for Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Gene Therapy. *Hum Gene Ther.* 2015;26(11):709-18.

163. Song S, Morgan M, Ellis T, Poirier A, Chesnut K, Wang J, et al. Sustained secretion of human alpha-1-antitrypsin from murine muscle transduced with adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95(24):14384.

164. Brantly ML, Spencer LT, Humphries M, Conlon TJ, Spencer CT, Poirier A, et al. Phase I Trial of Intramuscular Injection of a Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 2 α 1-Antitrypsin (AAT) Vector in AAT-Deficient Adults. *Hum Gene Ther.* 2006;17(12):1177-86.

165. Chiuchiolo MJ, Kaminsky SM, Sondhi D, Hackett NR, Rosenberg JB, Frenk EZ, et al. Intrapleural administration of an AAVrh.10 vector coding for human α 1-antitrypsin for the treatment of α 1-antitrypsin deficiency. *Hum Gene Ther Clin Dev.* 2013;24(4):161-73.

166. Mueller C, Tang Q, Gruntman A, Blomenkamp K, Teckman J, Song L, et al. Sustained miRNA-mediated Knockdown of Mutant AAT With Simultaneous Augmentation of Wild-type AAT Has Minimal Effect on Global Liver miRNA Profiles. *Mol Ther.* 1 de marzo de 2012;20(3):590-600.

167. Brantly ML, Chulay JD, Wang L, Mueller C, Humphries

M, Spencer LT, et al. Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AAT gene therapy. *Proc Natl Acad Sci.* 22 de septiembre de 2009;106(38):16363.

168. Flotte TR, Trapnell BC, Humphries M, Carey B, Calcedo R, Rouhani F, et al. Phase 2 Clinical Trial of a Recombinant Adeno-Associated Viral Vector Expressing α 1-Antitrypsin: Interim Results. *Hum Gene Ther.* 24 de mayo de 2011;22(10):1239-47.

169. Mueller C, Gernoux G, Gruntman AM, Borel F, Reeves EP, Calcedo R, et al. 5 Year Expression and Neutrophil Defect Repair after Gene Therapy in Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. *Mol Ther.* 7 de junio de 2017;25(6):1387-94.

170. Stiles KM, Sondhi D, Kaminsky SM, De BP, Rosenberg JB, Crystal RG. Intrapleural Gene Therapy for Alpha-1 Antitrypsin Deficiency-Related Lung Disease. *Chronic Obstr Pulm Dis Miami Fla.* 17 de agosto de 2018;5(4):244-57.

171. Remih K, Amzou S, Strnad P. Alpha1-antitrypsin deficiency: New therapies on the horizon. *Curr Opin Pharmacol.* 2021;59:149-56.

172. Brigham KL, Lane KB, Meyrick B, Stecenko AA, Strack S, Cannon DR, et al. Transfection of Nasal Mucosa with a Normal alpha1-Antitrypsin Gene in alpha1-Antitrypsin-Deficient Subjects: Comparison with Protein Therapy. *Hum Gene Ther.*

2000;11(7):1023-32.

173. Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, Varela I, Liu P-Q, Paschon DE, et al. Targeted gene correction of α 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;478(7369):391-4.

174. Choi SM, Kim Y, Shim JS, Park JT, Wang R-H, Leach SD, et al. Efficient drug screening and gene correction for treating liver disease using patient-specific stem cells. *Hepatology*. 2013;57(6):2458-68.

175. Smith C, Abalde-Atristain L, He C, Brodsky BR, Braunstein EM, Chaudhari P, et al. Efficient and allele-specific genome editing of disease loci in human iPSCs. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2015;23(3):570-7.

176. Bjursell M, Porritt MJ, Ericson E, Taheri-Ghahfarokhi A, Clausen M, Magnusson L, et al. Therapeutic Genome Editing With CRISPR/Cas9 in a Humanized Mouse Model Ameliorates α 1-antitrypsin Deficiency Phenotype. *EBioMedicine*. 2018;29:104-11.

177. Stephens CJ, Kashentseva E, Everett W, Kaliberova L, Curiel DT. Targeted in vivo knock-in of human alpha-1-antitrypsin cDNA using adenoviral delivery of CRISPR/Cas9. *Gene Ther*. 2018;25(2):139-56.

178. Ali SH, DeCaprio JA. Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin Cancer*

Biol. 2001;11(1):15-23.

179. Lundberg AS, Hahn WC, Gupta P, Weinberg RA. Genes involved in senescence and immortalization. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12(6):705-9.

180. Urata K, Kajihara I, Myangat TM, Tasaki Y, Otsuka-Maeda S, Sawamura S, et al. Overexpression of cyclin-dependent kinase 4 protein in extramammary Paget's disease. *J Dermatol.* 2019;46(5):444-8.

181. Hayer A, Shao L, Chung M, Joubert L-M, Yang HW, Tsai F-C, et al. Engulfed cadherin fingers are polarized junctional structures between collectively migrating endothelial cells. *Nat Cell Biol.* 2016;18(12):1311-23.

182. Ng PK-S, Li J, Jeong KJ, Shao S, Chen H, Tsang YH, et al. Systematic Functional Annotation of Somatic Mutations in Cancer. *Cancer Cell.* 2018;33(3):450-462.e10.

183. Zhu C-H, Mouly V, Cooper RN, Mamchaoui K, Bigot A, Shay JW, et al. Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Aging Cell.* 2007;6(4):515-23.

184. Pattengale P, Smith R, Gerber P. Selective transformation of B lymphocytes by E.B. virus. *The Lancet.* 1973;302(7820):93-4.

185. Choi SM, Liu H, Chaudhari P, Kim Y, Cheng L, Feng J, et al. Reprogramming of EBV-immortalized B-lymphocyte cell lines into induced pluripotent stem cells. *Blood*. 2011;118(7):1801-5.
186. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif*. 2001;25(4):402-8.
187. Ascenzi F, Barberi L, Dobrowolny G, Villa Nova Bacurau A, Nicoletti C, Rizzuto E, et al. Effects of IGF-1 isoforms on muscle growth and sarcopenia. *Aging Cell*. 2019;18(3):e12954.
188. Vigelsø A, Dybbøe R, Hansen CN, Dela F, Helge JW, Guadalupe Grau A. GAPDH and β -actin protein decreases with aging, making Stain-Free technology a superior loading control in Western blotting of human skeletal muscle. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985*. 2015;118(3):386-94.
189. Bae S, Park J, Kim J-S. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*. 2014;30(10):1473-5.
190. Miller JC, Holmes MC, Wang J, Guschin DY, Lee Y-L, Rupniewski I, et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*. 2007;25(7):778-85.

191. Laffranchi M, Berardelli R, Ronzoni R, Lomas DA, Fra A. Heteropolymerization of α -1-antitrypsin mutants in cell models mimicking heterozygosity. *Hum Mol Genet.* 2018;27(10):1785-93.
192. Kaseran JE, Hurley K, Dodge M, Villacorta-Martin C, Vedaie M, Jean J-C, et al. A Highly Phenotyped Open Access Repository of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep.* 2020;15(1):242-55.
193. Jacobson EF, Tzanakakis ES. Who Will Win: Induced Pluripotent Stem Cells Versus Embryonic Stem Cells for β Cell Replacement and Diabetes Disease Modeling? *Curr Diab Rep.* 2018;18(12):133.
194. Barker SD, Bale S, Booker J, Buller A, Das S, Friedman K, et al. Development and characterization of reference materials for MTHFR, SERPINA1, RET, BRCA1, and BRCA2 genetic testing. *J Mol Diagn JMD.* 2009;11(6):553-61.
195. Ringer KP, Roth MG, Garey MS, Piorczynski TB, Suli A, Hansen JM, et al. Comparative analysis of lipid-mediated CRISPR-Cas9 genome editing techniques. *Cell Biol Int.* 2018;42(7):849-58.
196. Ye L, Wang J, Beyer AI, Teque F, Cradick TJ, Qi Z, et al. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 Δ 32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(26):9591-6.

197. Fuster-García C, García-García G, González-Romero E, Jaijo T, Sequedo MD, Ayuso C, et al. USH2A Gene Editing Using the CRISPR System. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2017;8:529-41.
198. Chung WY, Song M, Park J, Namkung W, Lee J, Kim H, et al. Generation of Δ F508-CFTR T84 cell lines by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Biotechnol Lett*. 2016;38(12):2023-34.
199. Shen S, Sanchez ME, Blomenkamp K, Corcoran EM, Marco E, Yudkoff CJ, et al. Amelioration of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Diseases with Genome Editing in Transgenic Mice. *Hum Gene Ther*. 2018;29(8):861-73.

8. TRABAJOS DERIVADOS Y FINANCIACIÓN

8.1. Artículos publicados

1. **Título:** Alpha-1 antitrypsin deficiency: outstanding questions and future directions

Autores: Torres-Durán M, Lopez-Campos JL, Barrecheguren M, Miravittles M, Martinez-Delgado B, Castillo S, Escribano A, Baloira A, Navarro-Garcia MM, Pellicer D, **Bañuls L**, Magallón M, Casas F, Dasí F

Revista: Orphanet Journal of Rare Diseases

Año de publicación: 2018

Identificador PMID: 29996870

2. **Título:** Gene Therapy in Rare Respiratory Diseases: What Have We Learned So Far?

Autores: **Bañuls L**, Pellicer D, Castillo S, Navarro-García MM, Magallón M, González C, Dasí F

Revista: Journal of Clinical Medicine

Año de publicación: 2020

Identificador PMID: 32784514

3. **Título:** Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress in Rare Respiratory Diseases.

Autores: Magallón M, Pastor S, Carrión AE, **Bañuls L**, Pellicer D, Castillo S, Bondía S, Navarro-García MM, González C, Dasí F

Revista: Journal of Clinical Medicine

Año de publicación: 2021

Identificador PMID: 33803835

4. **Título:** Methodologies for the Determination of Blood Alpha1 Antitrypsin Levels: A Systematic Review.

Autores: Ruiz-Duque B, **Bañuls L**, Reinoso-Arija R, Carrasco-Hernandez L, Caballero-Eraso C, Dasí F, Lopez-Campos JL

Revista: Journal of Clinical Medicine

Año de publicación: 2021

Identificador PMID: 34768650

5. **Título:** New Laboratory Protocol to Determine the Oxidative Stress Profile of Human Nasal Epithelial Cells Using Flow Cytometry

Autores: Reula A, Pellicer D, Castillo S, Magallón M, Armengot M, Herrera G, O'Connor JE, **Bañuls L**, Navarro-García MM, Escribano A, Dasí F

Revista: Journal of Clinical Medicine

Año de publicación: 2021

Identificador PMID: 33799667

8.2. Posters presentados en congresos

- Título:** *In vitro genome editing using CRISPR/Cas9 to edit SERPINA1 PiZ mutation*

Autores: Bañuls L, Pellicer D, Castillo S, Magallón M, Navarro-García MM, Escribano A, Dasi Fernández F

Congreso: *European Respiratory Society Annual Meeting*

Lugar y año: Madrid, 2019
- Título:** Edición de la mutación PiZ del gen *SERPINA1* mediante CRISPR/Cas9

Autores: Bañuls L, Pellicer D, Castillo S, Magallón M, Navarro-García MM, Escribano A, Dasi Fernández F

Congreso: Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica

Lugar y año: Santiago de Compostela, 2019
- Título:** *SERPINA 1 PiZ mutation editing using CRISPR-Cas9*

Autores: Bañuls L, Pellicer D, Castillo S, Magallón M, Navarro-García MM, Escribano A, Dasi Fernández F

Congreso: *II International Meeting on Rare Respiratory Diseases*

Lugar y año: Valencia, 2018

8.3. Proyectos de investigación financiados

1. **Título:** Edición génica del gen *SERPINA1* mediante el uso de CRISPR/Cas9 en monocitos de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina

Investigador principal: Dr. Francisco Dasí

Entidad financiadora: Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica

Años: 2017-2019

2. **Título:** Diseño y desarrollo de un método basado en CRISPR/Cas9 para la reparación del gen de la alfa-1-antitripsina

Investigadora principal: Dra. Amparo Escribano

Entidad financiadora: Sociedad Valenciana de Neumología

Años: 2016-2018

8.4. Financiación predoctoral

Subvención: Subvenciones para la contratación de personal investigador de carácter predoctoral (ACIF)

Número de expediente: ACIF/2019/231

Entidad financiadora: *Conselleria d'educació, investigació, cultura i esport. D. G. D'universitat, investigació i ciència. Generalitat Valenciana.*

Título del proyecto: Edición génica del gen *SERPINA1* mediante el uso de CRISPR/Cas9 en monocitos de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina

Año de inicio: 2019

9. ANEXOS

ANEXO 1

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Se le ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado “**Edición génica del gen *SERPINA1* mediante el uso de CRISPR/Cas9 en monocitos de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina**” que está siendo realizado por los **Drs. Amparo Escribano Montaner y Francisco Dasí Fernández** del Servicio de **Pediatría** y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Antecedentes

El déficit de alfa-1-antitripsina (DAAT) es un trastorno metabólico de carácter hereditario (que se transmite de padres a hijos) que está causado por cambios en una proteína que se llama alfa-1 antitripsina (AAT), la cual se produce principalmente en el hígado. La principal función de la AAT es proteger al tejido pulmonar del daño causado por una proteína llamada elastasa. A causa de esto, los pacientes pueden llegar a desarrollar problemas pulmonares y en el hígado que en algunos casos pueden ser graves. No obstante, debido entre otras causas al bajo número de pacientes afectados, no se dispone de tratamientos eficientes y definitivos que consigan mejorar la calidad de vida de los pacientes que la padecen. Una vía de investigación novedosa, es la edición génica mediante el sistema CRISPR/Cas9, estrategia con la que ya se ha conseguido la reparación de genes mutados causantes de enfermedades como la fibrosis quística y la distrofia muscular de Duchenne.

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

El objetivo del presente estudio es la puesta a punto de un método bioquímico basado en la tecnología CRISPR/Cas9 que permita reparar el gen de la alfa-1 antitripsina humana.

¿Por qué se le ha pedido que participe?

Se le pide su participación en este estudio ya que ha sido diagnosticado de **Déficit de alfa-1 antitripsina**.

¿En qué consiste su participación? ¿Qué tipo de pruebas o procedimientos se le realizarán?

Se le solicita permiso para utilizar con fines científicos **una muestra de sangre.**

La participación en el presente proyecto no supone ninguna alteración del tratamiento que esté llevando (si lo tiene) y todo tratamiento que se le pueda poner a partir de los estudios clínico-bioquímicos que se le realicen será siempre bajo criterio médico.

¿Cuáles son los riesgos generales de participar en este estudio?

El único riesgo previsible de su participación será el mínimo riesgo que conlleva la extracción de una muestra de sangre, que incluye molestias, dolor, enrojecimiento e hinchazón y/o pequeños hematomas en el lugar del brazo donde se ha producido la extracción.

¿Cuáles son los beneficios de la participación en este estudio?

Es muy posible que los resultados obtenidos en esta investigación tengan poco valor diagnóstico o predictivo para usted, pero podrá ayudar a conocer mejor su enfermedad y mejorar el pronóstico y el tratamiento de futuros pacientes.

¿Qué pasará si decido no participar en este estudio?

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. En caso de que decida no participar en el estudio, esto no modificará el trato y seguimiento que de su enfermedad realicen ni su médico ni el resto del personal sanitario que se ocupa de su enfermedad. Así mismo, podrá retirarse del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones.

¿A quién puedo preguntar en caso de duda?

Es importante que comente con cualquiera de los investigadores de este proyecto los pormenores o dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para su participación. Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con los investigadores que están realizando el proyecto, los **Drs. Amparo Escribano Montaner** en el teléfono **961 973 879** o el **Dr. Francisco Dasí Fernández** en el teléfono **676 515 598**.

Confidencialidad:

Todos sus datos, así como toda la información médica relacionada con su enfermedad será tratada con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Así mismo, si los resultados del estudio fueran susceptibles de publicación en revistas científicas,

en ningún momento se proporcionarán datos personales de los pacientes que han colaborado en esta investigación.

Tal y como contempla la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de carácter personal, podrá ejercer su derecho a acceder, rectificar o cancelar sus datos contactando con el investigador principal de este estudio.

¿Qué pasará con las muestras biológicas obtenidas durante la investigación?

Durante su participación en este estudio, se le extraerá una muestra de sangre periférica.

Esta muestra será siempre utilizada con fines científicos, pudiéndose utilizar si usted así lo autoriza en el marco de otros proyectos de investigación que tengan como objetivo el estudio de su enfermedad y que previamente hayan sido evaluados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital.

Dicha muestra será conservada en una colección registrada en el ISCIII ubicada en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina piso 2E en un congelador de -80 °C durante un periodo de tiempo de 4 años.

Además, este material no será bajo ningún concepto ni en ningún momento motivo de lucro, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto titulado: **Edición génica del gen *SERPINA1* mediante el uso de CRISPR/Cas9 en monocitos de pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina**

Investigador principal: **Dr. Francisco Dasí Fernández**

Servicio: Pediatría

Yo, _____ he sido informado por el Dr. _____, colaborador del proyecto de investigación arriba mencionado, y declaro que:

- He leído la Hoja de Información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas
- He recibido suficiente información sobre el estudio

Comprendo que mi participación es voluntaria

Comprendo que todos mis datos serán tratados confidencialmente

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

SE RECUERDA QUE EL APARTADO SIGUIENTE ÚNICAMENTE SE DEBE MANTENER CUANDO PROCEDA.

Autorizo a que las muestras obtenidas durante el proyecto de investigación sean utilizadas con fines científicos en otros proyectos de investigación que tengan por objeto el estudio de mi enfermedad y que hayan sido aprobados por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia

Sí No

Quiero que se me pida autorización previa para utilizar mis muestras biológicas para futuros proyectos de investigación

Sí No

Con esto doy mi conformidad para participar en este estudio,

Firma del paciente:

Fecha:

Firma del Investigador:

Fecha