



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Tesis presentada para obtener el grado de:
LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

“Aplicaciones del sistema CRISPR/Cas9
en las enfermedades de Alzheimer,
Parkinson y Huntington”

Presenta:

SALVADOR GÓMEZ FUENTES

Directora de Tesis:

Dra. Nidia Gary Pazos Salazar

Asesor de Tesis:

Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León

Puebla – México, abril de 2022



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	4
INDICE DE FIGURAS	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN.....	8
MARCO TEÓRICO	9
1. Generalidades de las enfermedades neurodegenerativas.....	9
1.1. Fundamentos moleculares de la Enfermedad de Alzheimer	11
1.2. Fundamentos moleculares de la Enfermedad de Parkinson.....	14
1.3. Fundamentos moleculares de la Enfermedad de Huntington.....	16
2. Primeros sistemas de edición génica	17
2.1. Edición génica programable por nucleasas quiméricas: ZFNs y TALENs.....	18
3. Sistema CRISPR/Cas.....	19
3.1. Descubrimiento de los loci CRISPR y genes cas asociados	19
3.2. Clasificación y mecanismo de acción del sistema inmune procariota CRISPR/Cas	20
4. Adaptación del sistema CRISPR/Cas para la manipulación programable del genoma..	23
4.1. Tecnología CRISPR/Cas9	23
4.2. Mecanismos de reparación de la escisión del ADN.....	25
MARCO DE REFERENCIA	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
JUSTIFICACIÓN.....	29
OBJETIVOS.....	30
DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	31
DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
APLICACIONES DEL SISTEMA CRISPR/CAS9 EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	33
Formas familiares de la Enfermedad de Alzheimer: mutaciones en el gen APP	33
Formas familiares de la Enfermedad de Alzheimer: mutaciones en el gen PSEN1	35
Formas familiares de la Enfermedad de Alzheimer: mutaciones en el gen PSEN2	35
Genes implicados en la síntesis de péptido A β : APP.....	37

Genes implicados en la generación de péptido A β : PSEN1 y PSEN2.....	37
Genes implicados en la generación de péptido A β : BACE1.....	38
Alelo APOE ϵ 4, principal factor de riesgo genético en la EA	39
APLICACIONES DEL SISTEMA CRISPR/CAS9 EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	44
Formas familiares de la Enfermedad de Parkinson: mutaciones en el gen SNCA	44
Mutaciones en el gen LRRK2	45
Mutaciones en el gen VPS35	46
Genes reguladores de la patogénesis de la EP: PARK2 y PINK1	48
Genes reguladores de la patogénesis de la EP: PARK7	49
Genes reguladores de la patogénesis de la EP: GBA	50
APLICACIONES DEL SISTEMA CRISPR/CAS9 EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	55
Estrategias terapéuticas	55
Líneas de investigación	58
CONCLUSIONES.....	62
BIBLIOGRAFÍA	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aplicaciones de la tecnología CRISPR/Cas9 con potencial terapéutico en la corrección de mutaciones asociadas a formas familiares de la EA.

Tabla 2. Contribuciones de la aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 sobre genes implicados en la generación de péptido A β .

Tabla 3. Contribuciones de la aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 sobre el alelo APOE ϵ 4.

Tabla 4. Contribuciones de la tecnología CRISPR/Cas9 en el tratamiento e investigación de mutaciones asociadas a la patogénesis de la Enfermedad de Parkinson.

Tabla 5. Contribuciones de la tecnología CRISPR/Cas9 en la caracterización de genes con potencial papel regulador de la patogénesis de la Enfermedad de Parkinson.

Tabla 6. Aplicaciones de la tecnología CRISPR/Cas9 con potencial terapéutico en la Enfermedad de Huntington.

Tabla 7. Contribuciones de la tecnología CRISPR/Cas9 en el desarrollo de líneas de investigación de la Enfermedad de Huntington.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procesamiento proteolítico de APP.

Figura 2. Mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas.

Figura 3. Diagrama general de trabajo.

Figura 4. Áreas de aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 en la Enfermedad de Alzheimer.

Figura 5. Áreas de aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 en la Enfermedad de Parkinson.

Figura 6. Áreas de aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 en la Enfermedad de Huntington.

LISTA DE ABREVIATURAS

AICD | Amyloid precursor protein intracellular domain
APP | Amyloid precursor protein
A β | Amyloid beta peptide
CAG | Triplet CAG
Cas | CRISPR-associated
CRISPR | Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CRISPR/Cas | Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR-associated proteins
CRISPR/Cas9 | Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats /CRISPR-associated protein 9
crRNA | CRISPR RNA
DHSs | DNase I-hypersensitive sites
EA | Enfermedad de Alzheimer
EH | Enfermedad de Huntington
ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay
EP | Enfermedad de Parkinson
eQTL | Expression quantitative trait locus
FACS | Fluorescence-activated cell sorting
HDR | Homology directed repair
NHEJ | Nonhomologous DNA end joining
OMS | Organización Mundial de la Salud
p3 | péptido p3
PAM | Protospacer adjacent motif
pb | pares de bases
ROS | Reactive oxygen species
RT-qPCR | Quantitative reverse transcription PCR
sAPP α | Soluble amyloid precursor protein
sAPP β | Soluble APP beta protein
sgRNA | Single-guide RNA

SNC | Sistema nervioso central

SNP | Single nucleotide polymorphism

SpCas9 | *S. pyogenes* Cas9

TALENs | Transcription activator-like effector nucleases

tracrRNA | trans-activating CRISPR RNA

ZFNs | Zinc finger nucleases

α CTF | α c-terminal fragment

β CTF | β -carboxyl-terminal fragment

RESUMEN

La tecnología de edición génica CRISPR/Cas9 es una de las herramientas más poderosas y versátiles disponibles en la actualidad para el estudio integral de enfermedades humanas complejas, como son las enfermedades neurodegenerativas. Esta tecnología surgió como una adaptación del “sistema inmune” procariota CRISPR/Cas, la cual consiste en una nucleasa programable por ARN capaz de editar de forma dirigida secuencias específicas dentro del genoma. Las enfermedades neurodegenerativas, como son las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, han sido una de las áreas de oportunidad que más se han abordado mediante esta tecnología con el objetivo de buscar nuevas estrategias terapéuticas eficaces contra estos padecimientos que contribuyan a disminuir su prevalencia a nivel mundial. El presente trabajo de investigación analizó diferentes artículos científicos de la base de datos PubMed donde se reportó la aplicación del sistema CRISPR/Cas9 en el estudio de las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, considerando que el sello patológico distintivo de estas enfermedades implica alteraciones del proteoma neuronal en la que participan blancos moleculares potencialmente editables mediante esta plataforma. Los resultados de esta investigación mostraron una serie de contribuciones exitosas del sistema CRISPR/Cas9, tanto en la comprensión de la fisiopatología del proceso neurodegenerativo, así como al desarrollo de un enfoque terapéutico emergente de terapia génica de las enfermedades neurodegenerativas mediada por CRISPR/Cas9.

INTRODUCCIÓN

Según las predicciones de la OMS, para el año 2040 las enfermedades neurodegenerativas superarán al cáncer para convertirse en la segunda causa de muerte a nivel mundial, solo detrás de las enfermedades cardiovasculares, condición favorecida por el rápido envejecimiento de la población. El tratamiento farmacológico actual indicado para estas enfermedades genera un gasto de miles de millones de dólares anualmente, por lo que los gobiernos de todo el mundo han comenzado a destinar un mayor presupuesto para impulsar la generación de nuevas líneas de investigación que contribuyan a comprender a detalle los mecanismos involucrados en la patogenia de estas enfermedades con el objetivo de impulsar el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas con el potencial de detener o retrasar el progreso neurodegenerativo, además de la identificación de nuevos biomarcadores que posibiliten un diagnóstico oportuno antes de que aparezcan afectaciones neurológicas irreversibles (Cuny, 2012).

La enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP) son las enfermedades neurodegenerativas con mayor prevalencia a nivel mundial, la cual aumenta gravemente conforme la edad, ambas presentándose como trastornos de tipo esporádico o familiar (Campdelacreu, 2014). Por otro lado, la enfermedad de Huntington (EH), una enfermedad monogénica, cobra relevancia debido a su naturaleza genética, y aunque presenta una incidencia mucho menor que la EA y EP, es uno de los objetivos más abordables mediante la aplicación de tecnologías de edición génica debido a su menor complejidad en comparación con la EA y la EP (Bates et al., 2015).

El presente trabajo busca recopilar y analizar algunas de las aplicaciones más relevantes del sistema CRISPR/Cas9 en las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, su contribución a la investigación de la función génica y los mecanismos fisiopatológicos de la neurodegeneración mediante su modelado *in vitro* e *in vivo*, la identificación de nuevos biomarcadores genéticos que contribuyan a un diagnóstico eficaz y oportuno, y al desarrollo de un enfoque de terapia génica basado en la corrección del genotipo alterado en estas enfermedades.

MARCO TEÓRICO

1. Generalidades de las enfermedades neurodegenerativas

En términos generales, las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por una pérdida progresiva en el número y/o función de diversas poblaciones celulares dentro del sistema nervioso, un fenómeno multifactorial sumamente complejo (Gitler et al., 2017; Dugger y Dickson, 2017). Cada uno de estos trastornos presenta una sintomatología clínica característica determinada principalmente por el grupo celular que se ve mayoritariamente afectado (Erkkinen et al., 2018).

Al día de hoy existen diversas teorías que intentan explicar la fisiopatología de este tipo de trastornos, aunque la gran mayoría coinciden en la estrecha relación entre factores de riesgo genéticos internos y factores de riesgo ambientales externos que, con el paso del tiempo, contribuyen al desarrollo de la enfermedad (Kovacs, 2016). Si bien es cierto que estos trastornos son de carácter multifactorial, un fenómeno en común que presentan la mayoría de estas enfermedades es la alteración del proteoma celular que, eventualmente, se pone en manifiesto mediante la deposición de proteínas en el cerebro de los pacientes afectados, denominadas también “enfermedades conformacionales” (Li et al., 2006; Soto y Pritzkow, 2018); este indicador ha reforzado la investigación del aporte de diferentes genes y sus mutaciones a la patogénesis del proceso neurodegenerativo.

Las enfermedades neurodegenerativas representan un problema común de mortalidad y morbilidad en la población mundial, afectando principalmente a la población geriátrica, sector que presenta una mayor prevalencia debido a que la mayoría de estos padecimientos aparece en la edad adulta media y progresa continuamente durante el envejecimiento, el factor de riesgo más importante en las enfermedades neurodegenerativas (Hou et al., 2019). A medida que la neurodegeneración avanza, los síntomas pasan de ser leves, como problemas de coordinación motriz y dificultad para recordar algunas cosas, a graves, detonando estados de incapacidad total y pérdida de la cognición, lo que impacta negativamente en la facultad para realizar actividades cotidianas que, en muchas instancias, conlleva a desenlaces fatales.

Las enfermedades neurodegenerativas son, hasta el día de hoy, de carácter incurable, y el manejo farmacológico actual está indicado únicamente para el tratamiento de los síntomas

(Kiaei, 2013). El tratamiento farmacológico actual prescrito en la terapéutica de las enfermedades neurodegenerativas puede incluir fármacos dopaminérgicos para el tratamiento de trastornos del movimiento de la EP (Zahoor et al., 2018), inhibidores de la colinesterasa para reforzar la transmisión colinérgica en la EA leve y moderada (Sharma, 2019), fármacos antipsicóticos para el tratamiento de los trastornos conductuales que acompañan a los diferentes tipos de demencia (Tampi et al., 2016) y analgésicos para aliviar el dolor crónico, consecuencia del deterioro nervioso (Chaudhuri y Schapira, 2009) principalmente, así como fármacos con actividad neuroprotectora indicados para retrasar el progreso neurodegenerativo (Traynor et al., 2006); paralelo a la terapia farmacológica se han desarrollado nuevas intervenciones terapéuticas basadas en la estimulación cerebral profunda (Lozano et al., 2019), logrando detener algunos trastornos del movimiento clásicos de estas enfermedades. Si bien todas las estrategias mencionadas han contribuido a mejorar la calidad de vida del paciente, todavía no existe cura para estas enfermedades, por lo que resulta imperativo explorar nuevas alternativas que contribuyan a detener la muerte neuronal y a restaurar su fisiología.

Si bien la mayoría de los pacientes presentan formas esporádicas de la enfermedad (es decir, sin un contribuyente genético claramente identificado), históricamente se han reportado diferentes formas familiares heredables con algún componente genético alterado capaz de acelerar la tasa de acumulación de proteínas disfuncionales en el tejido afectado, exacerbando así la gravedad de la enfermedad (Bertram y Tanzi, 2005). Aunque las formas familiares afectan a un porcentaje minoritario, el conocer con exactitud qué genes están involucrados y cuáles son sus alteraciones de riesgo, así como el impacto de dichos cambios en la fisiología neuronal, ha permitido desarrollar estrategias emergentes dirigidas a la corrección puntual de los genes afectados (Rahman et al., 2019), hecho que se ha acelerado en los últimos años gracias a las nuevas tecnologías disponibles para editar el genoma (Gaj et al., 2016), una ciencia emergente y en crecimiento que ha contribuido también a la identificación de nuevos componentes genéticos que podrían ser clave en la patogénesis de la neurodegeneración (Shin y Lee, 2018).

1.1. Fundamentos moleculares de la Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es la enfermedad neurodegenerativa de mayor prevalencia a nivel mundial y causa principal de demencia en la población de adultos mayores, con un estimado de 47 millones de personas afectadas hasta el año 2018 (dos Santos et al., 2018). Se trata de un trastorno progresivo de neurodegeneración y muerte de tejido encefálico que implica pérdida de la memoria y deterioro cognitivo principalmente, además de cambios conductuales y una disminución de la capacidad personal para realizar actividades cotidianas (DeTure y Dickson, 2019; Cao et al., 2020), aunque las manifestaciones clínicas pueden variar en cada persona.

En términos generales, la EA puede clasificarse en dos grupos principales: la EA de inicio temprano y la EA de inicio tardío, los cuales pueden o no presentar algún componente genético alterado; la enfermedad de Alzheimer familiar (de naturaleza 100 % genética) suele incluirse dentro de la EA de inicio temprano debido a que constituye la mayoría de los casos dentro de este grupo (Felson, 2020).

La EA de inicio temprano representa del 5 al 10 % de los casos de EA, iniciando típicamente antes de los 65 años (Mendez, 2017; Ayodele et al., 2021); estos casos suelen estar asociados a la presencia de mutaciones de heredabilidad dominante en los genes APP, PSEN1 y PSEN2, impactando de forma crítica en la producción y acumulación del péptido beta-amiloide ($A\beta$) (Lanoiselée et al., 2017). Por otro lado, la EA de inicio tardío (que engloba la mayoría de los casos de EA) suele presentarse después de los 65 años de edad (Koedam et al., 2010), en la cual los factores de riesgo no genéticos figuran como principales responsables, entre los que destacan exposiciones constantes ante ciertos agentes químicos, estilos de vida poco saludables y condiciones médicas preexistentes (Jiang et al., 2013); dentro de este grupo, se ha identificado que el alelo APOE ϵ 4 aumenta de forma considerable el riesgo de padecer la enfermedad, incluso a una edad más temprana (Strittmatter y Roses, 1996; Kim et al., 2009).

Patológicamente, la EA está definida por dos marcadores microscópicos característicos: placas seniles, que contienen péptido $A\beta$, y ovillos neurofibrilares, ricos en proteína tau hiperfosforilada (Knopman et al., 2021).

1.1.1. Procesamiento de APP, generación de péptido A β y formación de la placa senil

La proteína precursora amiloidea (Amyloid Precursor Protein) es una proteína transmembrana tipo I codificada por el gen APP localizado en el cromosoma 21 (Breijyeh y Karaman, 2020). Su proceso de empalme alternativo genera 8 diferentes isoformas que se expresan en diferentes tejidos, de las cuales la isoforma APP695 se expresa de forma predominante en el sistema nervioso central (Bayer et al. 1999). Si bien el rol fisiológico de APP aún no es comprendido en su totalidad, se sabe que esta proteína desempeña varias funciones biológicas de suma importancia para el desarrollo, mantenimiento y buen funcionamiento del sistema nervioso; en contraste, también se sabe que uno de los productos derivados de su procesamiento proteolítico, el péptido A β , desempeña un rol clave en la patogénesis de la EA (Müller y Zheng, 2012).

La APP puede ser procesada por al menos dos vías proteolíticas principales según el orden de escisión en el que participen las diferentes proteasas implicadas. La vía no amiloidogénica, en la que α -secretasa escinde la secuencia A β , produce dos fragmentos: un fragmento C-terminal anclado a la membrana (α CTF) y un fragmento soluble N-terminal (sAPP α) (Bergström et al., 2016); a su vez, α CTF puede ser escindido por γ -secretasa para generar un fragmento denominado péptido p3, el cual se asume presenta actividad neuroprotectora (Han et al., 2011). Por otro lado, en la vía amiloidogénica, β -secretasa escinde el primer aminoácido del sitio A β , produciendo dos fragmentos: un fragmento C-terminal anclado a la membrana (β CTF) y un fragmento soluble N-terminal (sAPP β) (Bergström et al., 2016); posteriormente, el fragmento β CTF puede ser escindido por γ -secretasa para producir dos fragmentos: un extremo C-terminal (AICD), el cual se sugiere podría participar en procesos de regulación génica (Beckett et al., 2012), y un fragmento soluble denominado péptido A β , cuya longitud puede variar de 38 a 42 aminoácidos (Portelius et al., 2012) (Figura 1).

La evidencia científica sugiere que los pacientes con EA presentan alteraciones en las rutas que regulan la producción y la eliminación del péptido A β , lo cual incrementa los niveles de A β en el cerebro favoreciendo su agregación (Bharadwaj et al., 2009); de todas las especies producidas, los fragmentos A β 40 y A β 42 son los más abundantes y presentan mayor tendencia a depositarse en forma de agregados, proceso favorecido por sus características de hidrofobicidad, particularmente el fragmento A β 42 (Selkoe, 2001). De hecho, las placas

seniles (depósitos extracelulares neurotóxicos de péptido A β) presentes en el cerebro de pacientes con EA están constituidas primordialmente por A β 42, incluso algunas contienen sólo esta isoforma, a pesar de que la concentración de A β 40 sea superior a la de A β 42 (Murphy y LeVine, 2010).

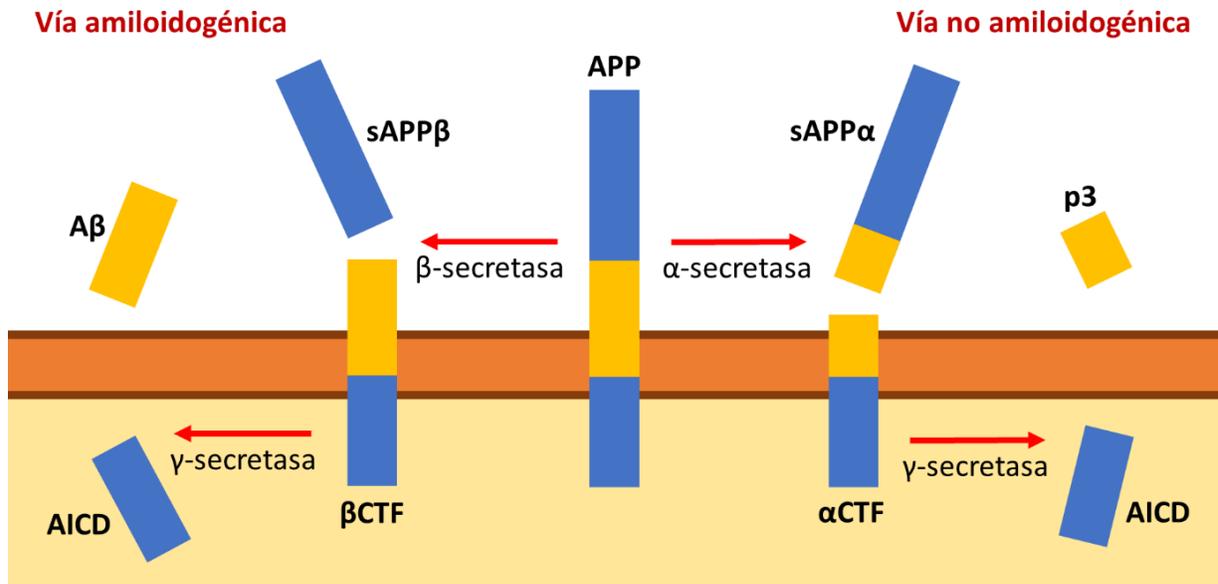


Figura 1. Procesamiento proteolítico de APP. En la vía no amiloidogénica, α -secretasa escinde la secuencia A β , produciendo residuos que no participan en la patología amiloide; en la vía amiloidogénica, β -secretasa escinde el sitio A β , produciendo el fragmento β CTF, que al ser escindido por γ -secretasa produce péptido A β , cuya longitud puede variar de 38 a 42 aminoácidos.

1.1.2. Hiperfosforilación de la proteína tau y formación de ovillos neurofibrilares

Las proteínas tau constituyen un grupo de 6 diferentes isoformas altamente solubles producidas por el proceso de empalme alternativo de los exones 2, 3 y 10 del gen MAPT localizado en el cromosoma 17 (Neve et al., 1986; Andreadis et al., 1995). Este gen está constituido por 16 exones, y las isoformas de los transcritos resultantes del proceso de empalme alternativo generan productos con una longitud que varía de 352 a 441 aminoácidos (Sergeant et al., 2005).

La proteína tau pertenece al grupo de proteínas intrínsecamente desordenadas, las cuales mantienen su funcionalidad a pesar de no presentar una estructura tridimensional bien definida, incluso bajo condiciones fisiológicas (Skrabana et al., 2006). No obstante, esta proteína cumple con funciones esenciales en el autoensamblaje y estabilización de microtúbulos, por lo que desempeña un rol clave en el transporte axonal, además de participar en otros procesos cognitivos (Alonso et al., 2018).

En contraste con sus funciones biológicas, cuando tau presenta un estado anormal de hiperfosforilación tiende a acumularse en forma de marañas de filamentos helicoidales emparejados (Alonso et al., 1996), elementos que conforman depósitos intracelulares insolubles denominados ovillos neurofibrilares, rasgo distintivo de diferentes patologías denominadas “tautopatías”, entre ellas la EA (Hernandez y Avila, 2007). Si bien la hiperfosforilación de tau ha sido uno de los rasgos más estudiados en la fisiopatología de la EA, otras modificaciones postraduccionales adicionales también parecen estar implicadas en la patogénesis de la EA, lo que hace de este evento un fenómeno bioquímico sumamente complejo (Martin et al., 2011).

La evidencia científica muestra que los ovillos neurofibrilares aparecen antes que la placa senil durante el envejecimiento normal del cerebro (Tsartsalis et al., 2018), aunque todavía se desconocen todos los factores que favorecen esta evolución patológica. Si bien tanto los ovillos neurofibrilares como la placa senil constituyen el rasgo patológico más representativo de esta enfermedad, los mecanismos fisiológicos que detonan la aparición de la EA aún no se conocen con exactitud, aunque la evidencia histórica sugiere que tanto la deposición intracelular de la proteína tau como la agregación extracelular del péptido A β podrían actuar de forma sinérgica agravando el proceso neurodegenerativo (Bloom, 2014).

1.2. Fundamentos moleculares de la Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es el trastorno de movimiento más común a nivel global, y representa la segunda enfermedad neurodegenerativa de mayor incidencia, sólo detrás de la enfermedad de Alzheimer (Tysnes y Storstein, 2017). La EP ocurre debido a la neurodegeneración y disminución excesiva de dopamina asociada a la muerte de neuronas dopaminérgicas que conforman la sustancia negra pars compacta del mesencéfalo, una región

del cerebro implicada en la microrregulación de los sistemas límbico y motor (Murray et al., 2019; Marino et al., 2020). El sistema dopaminérgico desempeña un rol clave en diferentes procesos neurofisiológicos, tales como el control motor, la cognición, el comportamiento y la generación de emociones (Klein et al., 2019), por tanto, sus alteraciones modifican el procesamiento de la información que envía la corteza somatosensitiva de la corteza cerebral al cuerpo estriado, ocasionando una desregulación en el procesamiento de la información de los ganglios basales que se pone en manifiesto a través de un cuadro clínico progresivo que incluye episodios de temblor en reposo, rigidez y bradicinesia principalmente (Clarke, 2007).

Patológicamente, el sello distintivo de la EP es la distribución de agregados fibrilares intracelulares en las neuronas que constituyen la sustancia negra mesencefálica, denominados cuerpos de Lewy (Wakabayashi et al., 2007; Capouch et al., 2018). Estas estructuras también se encuentran presentes en la demencia con cuerpos de Lewy, un tipo de α -sinucleopatía caracterizado por la agregación de la proteína α -sinucleína dentro del tejido encefálico (McKeith y Mosimann, 2004; Outeiro et al., 2019).

La proteína α -sinucleína, principal componente de los cuerpos de Lewy, es una proteína presináptica altamente soluble que se distribuye en diferentes compartimentos neuronales; si bien su función exacta todavía no se conoce por completo, se sabe que esta proteína está involucrada en diferentes procesos fisiológicos, entre ellos la liberación de dopamina y la plasticidad neuronal (Gupta y Dawson, 2010; Bernal-Conde et al., 2020). α -sinucleína está codificada por el gen SNCA localizado en el cromosoma 4 (Xu et al., 2015), y está constituida por 140 aminoácidos que conforman 3 dominios estructurales: un dominio N-terminal α -hélice de unión a lípidos, un dominio central de unión a amiloide y un dominio C-terminal de extremo ácido (Emamzadeh, 2016), de los cuales el dominio central le confiere la capacidad de formar agregados en condiciones fisiológicas debido a su alta hidrofobicidad (Iwai et al., 1995; Hashimoto et al., 2000). Actualmente se sabe que esta proteína podría intervenir de diferentes maneras en la patogénesis de la EP; se cree que las protofibrillas (agregados de α -sinucleína desplegada antes de constituirse en forma de cuerpos de Lewy) son responsables de la mayor parte del daño celular al interactuar en diferentes procesos, efecto que conduciría a la muerte neuronal, además del daño potencial que representa la excreción de esta proteína en la periferia celular, pudiendo propagar el daño hacia neuronas vecinas (Stefanis, 2012).

Al igual que en la EA, en la patogénesis de la EP participan factores ambientales y genéticos, los cuales convergen en mecanismos complejos de disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, agregación proteica, entre otros (Simon et al., 2020). En términos generales, esta enfermedad puede clasificarse en dos grandes grupos según la causa que la origine: la EP de naturaleza genética (que incluye a menudo formas familiares monogénicas de la enfermedad), que representa entre el 5 y 10 % de la totalidad de los casos, y la EP esporádica (de causa desconocida, aunque la edad avanzada representa el factor de riesgo más importante), que representa la fracción mayoritaria de pacientes afectados; no obstante, cada vez son más los factores genéticos ligados a la patogénesis de esta enfermedad, lo cual sugiere que ambos grupos podrían compartir algunos mecanismos fisiopatológicos (Lesage y Brice, 2009; Reed et al., 2019).

Desde que comenzó a estudiarse la naturaleza genética de la EP se ha descubierto la contribución de diferentes mutaciones a la patogénesis de la EP monogénica (Lesage y Brice, 2009; Bandres-Ciga et al., 2020); asimismo, la evidencia científica muestra que la EP esporádica también puede detonarse ante la presencia de mutaciones en diferentes genes, como SNCA y LRRK2 (Satake et al., 2009; Simon-Sanchez et al., 2009).

1.3. Fundamentos moleculares de la Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington es un trastorno neurodegenerativo progresivo de tipo autosómico dominante que se caracteriza por una expansión en el número de repeticiones del triplete CAG dentro del exón 1 del gen HTT ubicado en el cromosoma 4, lo cual resulta en una extensión anormal del segmento poliglutamina localizado en el extremo N-terminal de la proteína huntingtina, producto codificado por este gen (MacDonald et al., 1993; Bates, 2003; McColgan y Tabrizi, 2018).

El gen HTT contiene aproximadamente 35 repeticiones normales del triplete CAG, mientras que en los alelos mutados este número de repeticiones puede incrementarse a más de 40; un número elevado de repeticiones interrumpe la función normal de la proteína huntingtina, promoviendo una serie de interacciones anormales con otras proteínas que conduce finalmente a que el proceso neurodegenerativo se lleve a cabo (Li y Li, 2004). Esta enfermedad surge solo

en personas que presentan una expansión mayor o igual a 36 repeticiones del triplete CAG dentro del exón 1 de HTT, lo cual promueve la deposición de agregados proteicos intracelulares cuyo componente principal está constituido por fragmentos N-terminales que contienen el dominio poliglutamina de la proteína huntingtina (Bates, 2003; Chen y Wolynes, 2017). Si bien la causa que detona esta patología implica la expresión de mutantes que expanden la región de repeticiones CAG de HTT, se ha demostrado que otros factores genético-ambientales podrían modular la edad de aparición de la EH (Wexler, 2004).

La proteína huntingtina resulta esencial para el desarrollo neuronal al participar en procesos importantes, como el tráfico vesicular y la división celular, además de otras actividades fuera del SNC (Saudou y Humbert, 2016); las consecuencias del mal funcionamiento de esta proteína impactan en la fisiología de los procesos motores, cognitivos y conductuales, afectando primordialmente a las neuronas que conforman el cuerpo estriado (Huang et al., 2016), cuyas implicaciones clínicas se traducen principalmente en movimientos coreoatetósicos, deterioro cognitivo y trastornos psiquiátricos (Kirkwood et al., 2001). A diferencia de la EA y la EP, la patogénesis de esta enfermedad parece ser mucho menos compleja, además de presentar una prevalencia sumamente rara respecto a estas dos enfermedades (Pringsheim et al., 2012).

2. Primeros sistemas de edición génica

La edición génica comprende un conjunto de técnicas diseñadas para modificar la información presente en los genes de un organismo, confiriéndole así de nuevas características genotípicas que impactan sobre su fenotipo (Gupta y Musunuru, 2014). En 1979, Scherer y Davis desarrollaron el primer método de modificación genética *in vitro* en el microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* mediante la introducción de ADN exógeno, demostrando así la posibilidad de introducir nueva información genética de forma estable dentro del genoma de un organismo. En aquella época, esta tecnología fue aplicada sólo en unos cuantos organismos modelo debido a la complejidad del procedimiento (Doetschman et al., 1987; Thomas y Capecchi, 1987; Rudnicki et al., 1992); a pesar de que esta tecnología mostró resultados alentadores, el rendimiento del proceso, los costos de operación y la poca especificidad dentro del proceso de edición genética seguían representando un reto. Años después, y gracias a la

identificación de endonucleasas capaces de realizar cortes en sitios específicos dentro del genoma, comenzó a desarrollarse un nuevo concepto dentro de las técnicas clásicas de edición génica: la edición génica programable por nucleasas.

2.1. Edición génica programable por nucleasas quiméricas: ZFNs y TALENs

La edición genética programable mediada por endonucleasas de restricción marcó una pauta sin precedente en el campo de la ingeniería genética. En 1970, Hamilton Smith y Kent Wilcox reportaron la primera endonucleasa de restricción tipo II aislada de *Haemophilus influenzae*, denominada HindII; este tipo de enzimas presentan la capacidad de escindir el ADN de forma sitio-específico al posicionarse sobre su secuencia blanco de reconocimiento. Gracias a esta especificidad para realizar cortes precisos dentro del genoma, las enzimas de restricción serían posteriormente incorporadas a los trabajos de ingeniería genética, lo que resultaría en una revolución de las tecnologías clásicas de edición génica.

Dada la naturaleza bilateral que presentan ciertas enzimas, como la endonucleasa FokI, se concibió la idea de construir nucleasas quiméricas de especificidad programable, fusionando dominios proteicos de unión al ADN con el dominio catalítico de FokI que escinde al ADN cuando se dimeriza (Bitinaite et al., 1998). Las primeras herramientas que se posicionaron con éxito en la edición genética programable aplicando este principio fueron las nucleasas con dedos de zinc (Zinc-Finger Nucleases) y las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) (Yan et al., 2013). Después de la escisión del ADN mediada por ZFNs y TALENs, la maquinaria celular de reparación del ADN pone en marcha su batería enzimática de reparación; si bien el objetivo de este sistema es corregir inmediatamente la ruptura en la continuidad del genoma, un error en la reparación del sitio de corte podría generar cambios genotípicos importantes que impacten en un cambio funcional de los elementos alterados (Kim y Kim, 2014; Kosicki et al., 2018), principio aprovechado por estos tipos de nucleasas quiméricas programables para introducir mutaciones dentro del sitio de corte.

Si bien ambas plataformas resultaron ser altamente precisas en las técnicas de edición genética de aquel entonces, su programación representaba una labor sumamente compleja, ya que ambos sistemas requerían de un diseño de quimera exclusivo para cada secuencia blanco del proceso de edición. El impacto de estas herramientas novedosas en la edición específica del

genoma causó gran revuelo en la comunidad científica global, y una serie de aplicaciones exitosas de las nucleasas programables fueron publicadas (Kandavelou et al., 2009; Ramalingam et al., 2013; Ramalingam et al., 2014), mientras el actual protagonista en materia de edición génica programable estaría por debutar.

3. Sistema CRISPR/Cas

Sin lugar a duda, la herramienta más exitosa en los procesos de edición génica programable es la tecnología basada en el sistema CRISPR/Cas. Esta plataforma surgió como resultado de la adaptación del “sistema inmune” adaptativo procariota CRISPR/Cas presente en bacterias y arqueas que les confiere la capacidad de defenderse ante la presencia de elementos genéticos invasores (Wang et al., 2016).

3.1. Descubrimiento de los loci CRISPR y genes cas asociados

El patrón de repeticiones presente en el ahora denominado locus CRISPR fue descubierto accidentalmente en 1987, mientras Ishino y colaboradores identificaban secuencias repetidas de ADN separadas río abajo del gen codificante de una isoenzima de fosfatasa alcalina de *Escherichia coli*. Poco después se reportó el descubrimiento de secuencias similares provenientes de otras cepas bacterianas (Nakata et al., 1989; Hermans et al., 1991). En 1993, Mojica y colaboradores (Mojica et al., 1993) reportaron por primera vez el hallazgo de estos patrones de repeticiones en arqueas mientras estudiaban el efecto de la salinidad en el crecimiento de *Haloferax mediterranei*, una arquea halofílica, aunque los patrones que reportaron carecían de similitud con los que se habían encontrado previamente en *E. coli*.

En el año 2002, Jansen y colaboradores propusieron el término CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) para hacer referencia a estas secuencias, además de reportar el hallazgo de que los loci CRISPR se encuentran asociados a nucleasas Cas (CRISPR-associated proteins), codificadas por genes altamente conservados en los microorganismos a los que previamente se les había identificado la presencia de dichos loci. Subsecuentemente se reportaron hallazgos paralelos que reforzaron la hipótesis de la capacidad de asociación del sistema para defender al huésped ante la invasión de material

genético exógeno (Haft et al., 2005; Pourcel et al., 2005), por lo que se le comenzó a reconocer como un sistema de inmunidad adaptativa procariota.

3.2. Clasificación y mecanismo de acción del sistema inmune procariota CRISPR/Cas

Como se mencionó previamente, los organismos que contienen el locus CRISPR son capaces de detectar ADN invasor y escindirlo mediante mecanismos que simulan una especie de inmunidad adaptativa ante invasiones posteriores por el mismo agente. Ahora bien, ¿cómo se orquestan los diferentes elementos que integran el sistema para defender al hospedador de una invasión por ADN exógeno?

En términos generales, el sistema CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated) procariota funciona mediante la adquisición genómica de fragmentos de ADN proveniente de agentes invasores (bacteriófagos o plásmidos); después, estos fragmentos son transcritos y procesados en fragmentos de ARN que funcionan como una especie de molécula guía que, acoplada a proteínas Cas efectoras con actividad endonucleasa, integran un complejo ribonucleoproteico capaz de dirigirse hacia la secuencia complementaria de la molécula de ARN presente en material genético invasor (protoespaciador), sección que será escindida por la proteína efectora una vez que se lleve a cabo el proceso de reconocimiento (Rath et al., 2015; Brouns et al., 2008).

El sistema inmune adaptativo CRISPR/Cas está compuesto por dos elementos genéticos: el locus CRISPR y los genes asociados a CRISPR; el locus CRISPR está constituido por fragmentos de ADN espaciador de naturaleza exógena (protoespaciadores) posicionados entre secuencias repetidas de ADN endógeno, mientras que los genes asociados a CRISPR, localizados adyacentemente al locus CRISPR, codifican proteínas Cas que participan en diferentes etapas del proceso.

En general, todas las variantes del sistema CRISPR/Cas están conformadas por tres etapas, las cuales actúan ordenadamente para generar una respuesta inmune completa contra el ADN invasor (Bondy-Denomy y Davidson, 2014; Garneau et al., 2010) (Figura no. 2).

- Etapa de adquisición (1): en esta etapa ocurre la incorporación de un protoespaciador proveniente del material genético invasor, sea genoma viral o algún tipo de plásmido, al interior del locus CRISPR del genoma del hospedador.

- Etapa de procesamiento (2): posteriormente, las proteínas Cas codificadas por los genes asociados a CRISPR son expresadas, y el locus CRISPR es transcrito en forma de una molécula única denominada transcrito primario, que posteriormente será procesado en moléculas de crARN (crispr RNA) mediante diferentes mecanismos en los que participan algunas de las proteínas Cas expresadas previamente, además de factores accesorios adicionales propios del huésped. En este punto, la generación de otra molécula de ARN, denominada tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA), es necesaria para la formación del ARN guía del complejo efector, el cual estará conformado por un tracrRNA asociado a un crRNA.
- Etapa de interferencia (3): finalmente, el ARN guía forma un complejo efector al asociarse con la proteína Cas efectora, dirigiéndola hacia la secuencia objetivo ante una invasión posterior por el mismo agente gracias a la adquisición previa del protoespaciador, elemento responsable de la complementariedad del ARN guía con el ADN invasor. Una vez que el complejo efector se posiciona sobre el sitio de reconocimiento presente en el ADN invasor, la proteína efectora ejecuta su escisión, protegiendo a la célula huésped de una nueva invasión por el mismo agente.

La actividad de varios sistemas CRISPR/Cas está condicionada por la presencia de una secuencia PAM (Protospacer Adjacent Motif), un fragmento corto de ADN, normalmente de 2 a 6 pares de bases de longitud, localizado adyacentemente a la región donde hibrida el ARN guía dentro del ADN invasor (Gleditsch et al., 2019); la ausencia de esta secuencia dentro del locus CRISPR del hospedador protege su genoma una autoescisión (Figura 2).

Según las diferencias entre los componentes que participan dentro de todas las etapas del proceso y la forma en que lo hacen, los sistemas CRISPR/Cas pueden dividirse en dos clases principales (Makarova et al., 2015): los sistemas de clase 1, que a su vez están subdivididos en los tipos I, III y IV, y que tienen en común la característica de requerir una maquinaria efectora compleja en la que participan diferentes proteínas Cas efectoras acopladas a una molécula de ARN guía para mediar la escisión del ADN blanco. Por otro lado, los sistemas de clase 2 están subdivididos en los tipos II, V y VI, en los que una sola endonucleasa guiada por ARN es responsable de la escisión del elemento genético invasor (Shmakov et al., 2015); por su simpleza, los sistemas de clase 2 han sido los más explotados para la edición genética

debido a que son mucho menos complejos de programar respecto a los sistemas de clase 1, al requerir de una sola endonucleasa efectora acoplada a una molécula de ARN guía (Zetsche et al., 2015).

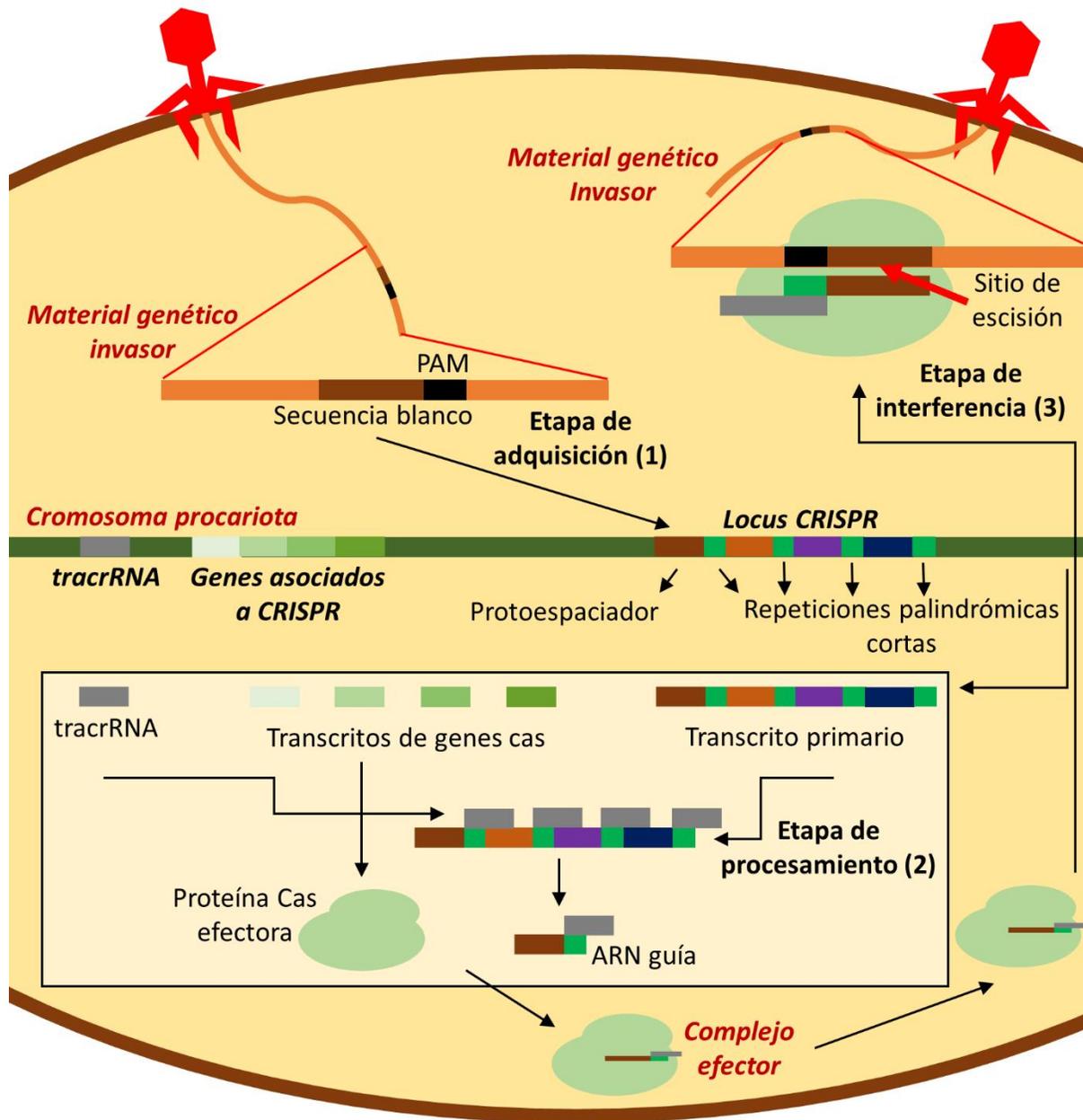


Figura 2. Mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas. La etapa de adquisición (1) permite la incorporación de un elemento protoespaciador en el interior del locus CRISPR bacteriano; posteriormente, en la etapa de procesamiento (2), las proteínas Cas son expresadas, y el locus CRISPR transcribe moléculas de crARN, que junto a tracrRNAs, integrarán los elementos del complejo efector; finalmente, en la etapa de interferencia (3), el

complejo efector se dirige hacia la secuencia objetivo ante una invasión posterior por el mismo agente, mediando la escisión de su material genético.

4. Adaptación del sistema CRISPR/Cas para la manipulación programable del genoma

En 2012, Jinek y colaboradores reportaron una nueva tecnología para editar genes inspirada en el sistema procariota CRISPR/Cas: un complejo efector, conformado por una endonucleasa (proteína Cas efectora) asociada a una molécula sintética de ARN guía. Esta tecnología busca “programar” el complejo efector mediante el acoplamiento de moléculas artificiales de ARN guía, las cuales son diseñadas en función de la secuencia genética que se desee editar. Gracias a su divulgación, esta tecnología comenzó a ser explotada por cientos de científicos alrededor del mundo para la manipulación programable del genoma a una escala nunca vista con las primeras nucleasas programables que figuraron en el campo de la edición génica.

4.1. Tecnología CRISPR/Cas9

Los sistemas CRISPR tipo II están subdivididos a su vez en tres subtipos diferentes según el grado de homología entre las proteínas Cas9 y la presencia o ausencia de alguna proteína Cas adicional (Shmakov et al., 2017). Los sistemas CRISPR/Cas tipo II-C representan la alternativa menos compleja respecto a los subtipos II-A y II-B, ya que por lo general hacen uso de sólo tres proteínas (Cas1, Cas2 y Cas9), mientras que los subtipos II-A y II-B requieren además de las proteínas Csn2 y Cas4 respectivamente (Mir et al., 2018).

Si bien la función exacta de las proteínas Cas1 y Cas2 todavía no se conoce con exactitud, estudios sugieren que ambos elementos son estrictamente necesarios para la etapa de adquisición de nuevos espaciadores dentro del locus CRISPR (Nuñez et al., 2014; He et al., 2018). Por otro lado, las proteínas Cas9 son consideradas los elementos protagónicos en los sistemas CRISPR tipo II-C, ya que participan en diferentes procesos de la vía CRISPR, incluyendo las etapas de adaptación e interferencia (Mir et al., 2018); el hecho de que los sistemas CRISPR II-C se encuentren tanto en bacterias como arqueas de entornos muy diversos da como resultado una batería diversa de proteínas Cas9 con propiedades únicas, las cuales pueden ser explotadas en función de sus características individuales, considerando también sus limitantes.

La tecnología CRISPR/Cas9 emplea la proteína Cas9 (proteína 9 asociada a CRISPR) como único elemento efector; al ser una endonucleasa de ADN guiada por ARN, Cas9 puede programarse fácilmente modificando la secuencia de su ARN guía para dirigir el sistema de edición hacia sitios variables dentro del genoma, lo cual simplifica enormemente el proceso de edición génica (Wang et al., 2016). Cas9 ha sido y sigue siendo la nucleasa más explotada en trabajos experimentales, específicamente la variante Cas9 proveniente de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) (Wang y Li, 2021).

Las nucleasas Cas9 presentan un lóbulo de reconocimiento (que interacciona con la secuencia de ADN complementaria), y un lóbulo con actividad endonucleasa (capaz de escindir la doble hebra de ADN) (Nishimasu et al., 2014). Estas proteínas requieren de dos elementos, que en conjunto integrarán una sola molécula de ARN guía para mediar el proceso de reconocimiento: el crRNA, una secuencia de 17 a 20 nucleótidos que contiene la región variable de direccionamiento (secuencia responsable de reconocer el sitio objetivo); y el tracrRNA, que está constituido por una secuencia más larga de nucleótidos, la cual es constante y le confiere la capacidad de formar estructuras tallo-bucle necesaria para su anclaje a Cas9 (Deltcheva et al., 2011).

Una vez que el complejo de edición (Cas9-ARN guía) está integrado, el ARN guía dirige a Cas9 hacia su secuencia dentro del ADN diana, según la complementariedad de esta con el crRNA; adicionalmente, Cas9 deberá reconocer su sitio PAM río abajo de la secuencia diana antes de efectuar la ruptura en la doble hebra del sitio blanco (en el caso de SpCas9, la secuencia PAM es 5'-NGG-3', donde "N" puede ser cualquier base de nucleótido) (Anders et al., 2014). Cas9 induce rupturas en la doble cadena de ADN mediante la escisión de la cadena diana de ADN asociada al ARN guía (empleando el dominio HNH) y su cadena complementaria (mediante el dominio RuvC) (Jinek et al., 2012); esta ruptura puede repararse mediante la vía de unión de extremos no homólogos, NHEJ, o el sistema de reparación dirigida por homología, HDR (Liu et al., 2020), tema que se abordará más adelante.

Si bien, tanto el crRNA como el tracrRNA existen como moléculas individuales de RNA en la naturaleza, la opción más popular entre investigadores es el formato sgRNA (single guide RNA), una única molécula de ARN que contiene la secuencia crRNA (la cual es diseñada según el ADN objetivo) fusionada con la secuencia de anclaje proporcionada por el tracrRNA.

Las moléculas de ARN guía pueden generarse de forma sintética o a partir de una plantilla de ADN, ya sea *in vitro* o *in vivo* (Brazelton et al., 2015).

Aunque en la naturaleza existen diferentes opciones de proteínas Cas9 provenientes de varios organismos procariontes, en los últimos años se han diseñado nuevas variantes de nucleasas con el objetivo de satisfacer necesidades experimentales específicas, lo cual ha expandido la gama de aplicaciones de esta tecnología (Wang et al., 2016).

4.2. Mecanismos de reparación de la escisión del ADN

Las células de mamífero tienen la capacidad de reparar rupturas en la doble cadena de ADN mediante dos vías diferentes: la vía de unión de extremos no homólogos y el sistema de reparación dirigido por homología (Zaboikin et al., 2017). La vía de reparación por unión de extremos no homólogos ocurre con más frecuencia que la reparación dirigida por homología debido a que esta última vía requiere forzosamente de una plantilla con extremos homólogos a la región que flanquea el sitio de escisión. Un cromosoma homólogo rara vez puede fungir como plantilla de reparación debido a la baja probabilidad espacial de estar lo suficientemente cerca del sitio a reparar, además de que una ruptura en la continuidad de un cromosoma debe repararse lo suficientemente rápido como para no alterar su integridad, lo cual conduciría eventualmente a la muerte celular.

La vía de unión de extremos no homólogos es un proceso susceptible a errores que, por lo general, resulta en la inserción/eliminación de nucleótidos (indels) en el sitio de reparación (Shibata y Jeggo, 2020). Cuando un indel ocurre en el interior del marco de lectura de un gen, a menudo introduce mutaciones que pueden generar codones de término prematuros o desplazamientos del marco de lectura, los cuales anularían la expresión correcta del producto codificado por el gen; esta es una de las estrategias más explotadas de la tecnología CRISPR/Cas9, que al ser aplicada en genes codificadores de proteínas, induce potencialmente a que el alelo afectado pierda su función (gene knockout), generando así nuevas variantes genotípicas (Lalonde et al., 2017).

De forma alternativa, las rupturas inducidas por el sistema de edición pueden repararse siguiendo el sistema de reparación dirigido por homología al introducir una secuencia exógena

de ADN molde flanqueada por extremos homólogos a los laterales del sitio de escisión (Sansbury et al., 2019). Este mecanismo puede ser implementado para eliminar secuencias de ADN indeseadas (formas mutantes de un gen), o para introducir información exógena en un locus determinado de forma permanente (gene knock-in), usualmente en forma de transgenes, etiquetas de interés o mutaciones puntuales, lo cual se consigue introduciendo oligonucleótidos monocatenarios o plásmidos que contienen la información a “corregir” flanqueada por brazos homólogos a las secuencias presentes en los extremos del sitio de corte (Sakuma y Yamamoto, 2017).

MARCO DE REFERENCIA

La tecnología CRISPR/Cas9 ha sido aplicada en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas siguiendo diversos objetivos, lo que ha contribuido enormemente a los avances que se tienen hoy en día en materia de estas enfermedades.

Entender el rol que desempeñan los genes en el mantenimiento de la fisiología neuronal y las alteraciones que conducen a la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas resultaría clave para hacer frente a este problema de salud. La especificidad la tecnología CRISPR/Cas9 para dirigirse hacia blancos moleculares específicos dentro del sistema nervioso central (Cota-Coronado et al., 2019), además de su versatilidad para ser aplicada en varios modelos de forma *in vitro* e *in vivo* (Tu et al., 2015; Yan et al., 2018; Valadez-Barba et al., 2020) muestran su potencial aplicación en el desarrollo de la terapia génica de las enfermedades neurodegenerativas que presenten detonantes de origen genético, un enfoque terapéutico alternativo a la terapia farmacológica sumamente ambicioso que pretende el desarrollo de terapias de corrección génica lo suficientemente seguras como para ser aplicadas en seres humanos en un futuro no muy lejano para la corrección de genotipos patológicos, así como en la identificación de nuevos biomarcadores que permitan un diagnóstico oportuno de estas enfermedades.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades neurodegenerativas representan uno de los problemas de salud más preocupantes a nivel mundial debido a ausencia de tratamientos efectivos que hagan frente a estos padecimientos. Según estimaciones, para el año 2050 el número de personas afectadas superará los 150 millones a nivel mundial (Vanni et al., 2020), cifra sumamente alarmante considerando que la mayoría de los casos presentan un pronóstico desfavorable, además de los altos costos que implica su tratamiento.

Durante los últimos años, gracias al desarrollo de herramientas emergentes en el campo de la edición génica, como lo es la tecnología CRISPR/Cas9, se ha facilitado enormemente el estudio de enfermedades complejas, como son las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, los trastornos neurodegenerativos con mayor incidencia a nivel mundial (Kolli et al., 2018). Se sabe que en la enfermedad de Huntington existe una relación bien establecida entre el genotipo del individuo y el desarrollo de la enfermedad (Bates et al., 2015), en contraste con las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, en las que sólo una minoría del total de los casos presenta algún componente genético claramente identificado (Bekris et al., 2011); no obstante, la evidencia científica actual considera también la participación de factores de riesgo genético en el establecimiento y progresión de estas enfermedades (Billingsley et al., 2018).

Comprender mejor la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas es necesario para impulsar el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas de prevención y tratamiento, así como el descubrimiento de nuevos biomarcadores genéticos que permitan un diagnóstico oportuno, acciones que en conjunto podrían contribuir a hacer frente a tan importante problema de salud mundial.

JUSTIFICACIÓN

La patogénesis de las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington involucra mutaciones en varios genes (muchos aún desconocidos) que promueven la agregación regional de proteínas mal plegadas, rasgo patológico distintivo de estos trastornos, por lo que el abordaje de estas enfermedades mediante la tecnología CRISPR/Cas9 resulta completamente idóneo. En el caso de la enfermedad de Huntington, al ser una enfermedad de naturaleza 100 % genética, la tecnología CRISPR/Cas9 podría explotarse en el desarrollo de terapia génica, mientras que, para las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, esta tecnología podría dirigirse hacia blancos genéticos que aceleran la aparición y curso del proceso neurodegenerativo, reduciendo el deterioro de la calidad de vida del paciente, además de la corrección de mutaciones asociadas a formas familiares de estas enfermedades.

Por otro lado, la edición génica mediada por esta tecnología ha mostrado ser efectiva en el desarrollo de modelos de neurodegeneración, herramientas sumamente útiles en la identificación de biomarcadores de diagnóstico temprano y la exploración de nuevas alternativas farmacológicas que mejoren la calidad de vida del paciente.

Con este trabajo se busca recopilar algunas de las aplicaciones más relevantes de la tecnología CRISPR/Cas9 en el estudio y terapia génica de las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, mostrando el potencial y la versatilidad de la herramienta de edición génica más importante en la actualidad en este grupo de enfermedades complejas.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

Mostrar aplicaciones relevantes de la tecnología CRISPR/Cas9 en las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington.

2. Objetivos específicos

- 2.1. Recopilar evidencia científica que sustente la aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 en el estudio de las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington.
- 2.2. Clasificar la información recopilada en modelos de investigación y terapia génica.
- 2.3. Exponer información relevante sobre las aplicaciones más exitosas del sistema CRISPR/Cas9 en materia de las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington.

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

- a) Tipo de estudio: revisión bibliográfica.
- b) Universo del estudio: los resultados provienen de artículos científicos publicados desde el año 2015 hasta el año 2021 en PubMed, empleando las palabras clave: CRISPR Cas9 system, neurodegenerative diseases, gene function, disease modeling, gene therapy, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, y Huntington's disease.
- c) Tamaño de muestra: 27 artículos científicos revisados para el análisis de resultados.
- d) Sede y lugar del estudio: el trabajo de revisión se realizará mediante reuniones virtuales de colaboración entre el Laboratorio de Infectología Molecular (Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas, BUAP) y el Laboratorio de Neurofarmacología (Facultad de Ciencias Químicas, BUAP).
- e) Criterios de selección: se abordarán artículos científicos publicados en los últimos 7 años que contribuyan a cumplir los objetivos del trabajo. La información recopilada se presentará en tres diferentes capítulos:
 - Aplicaciones del sistema CRISPR/Ca9s en la enfermedad de Alzheimer.
 - Aplicaciones del sistema CRISPR/Cas9 en la enfermedad de Parkinson.
 - Aplicaciones del sistema CRISPR/Cas9 en la enfermedad de Huntington.
- f) Criterios de exclusión: artículos científicos sobre trabajos de investigación aplicados al estudio de otras enfermedades neurodegenerativas, diferentes a las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington.
- g) Criterios de eliminación: artículos científicos cuya información no pueda ser consultada en su totalidad a través de la base de datos PubMed.
- h) Recursos humanos: pQFB Salvador Gómez Fuentes (tesista) | Dra. Nidia Gary Pazos Salazar (directora de tesis) | Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León (asesor de tesis).
- i) Recursos financieros: No requiere.
- j) Diseño estadístico: No requiere.

DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

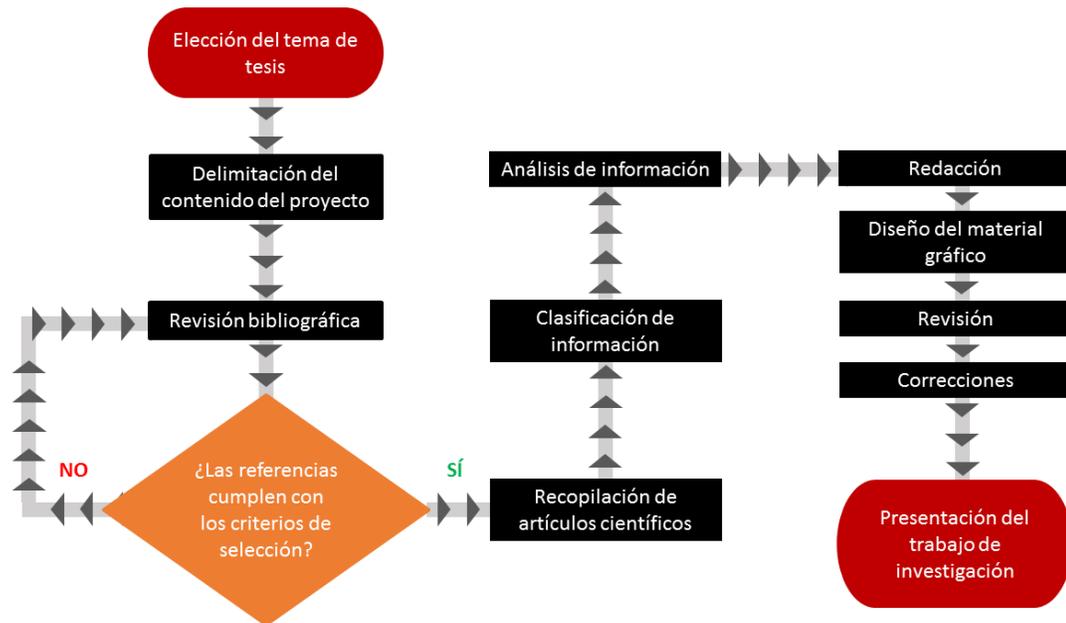


Figura 3. Diagrama general de trabajo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

APLICACIONES DEL SISTEMA CRISPR/CAS9 EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Formas familiares de la Enfermedad de Alzheimer: mutaciones en el gen APP

Si bien la evidencia científica ha demostrado que la deposición del péptido A β producido a partir del procesamiento proteolítico de APP es un elemento crucial en la patogénesis de la EA (Gandy, 2005; Zhang et al., 2011), hoy se sabe que esta proteína también desempeña funciones biológicas importantes en varios procesos neuronales, tanto en su forma completa como a través de los productos derivados de su procesamiento (Müller y Zheng, 2012), por lo que resulta necesario diseñar estrategias terapéuticas que impacten disminuyendo la acumulación de péptido A β neurotóxico sin bloquear la expresión del gen APP.

El péptido A β , tanto en forma soluble como en forma de agregados, resulta altamente tóxico para la fisiología neuronal según diferentes estudios que sugieren su influencia negativa sobre ciertos procesos metabólicos, como la cadena respiratoria mitocondrial (Hsu et al., 2010), producción de especies reactivas de oxígeno (Cheignon et al., 2018) y la homeostasis del calcio (Ferreiro et al., 2008), lo que en conjunto generaría las condiciones para que el proceso neurodegenerativo se lleve a cabo. En este sentido, todas las estrategias dirigidas a disminuir la sobreproducción de péptido A β podrían contribuir a restaurar la fisiología neuronal, evitando que el proceso neurodegenerativo avance hacia estadios irreversibles.

Se ha descrito ampliamente que la mutación sueca APP^{swe} (K595N/M596L) provoca la enfermedad de Alzheimer heredada de forma autosómica dominante al incrementar la escisión anormal de APP por la enzima β -secretasa (Lannfelt et al., 1993; György et al., 2018), por lo que los pacientes portadores de esta mutación presentan niveles aumentados de péptido A β tanto en el cerebro como en los tejidos periféricos (Gyorgy et al., 2016).

La idea de interrumpir de forma selectiva el alelo mutante sin afectar la expresión del alelo de tipo salvaje en individuos heterocigotos surgió como una estrategia potencial que reduciría la acumulación patológica de péptido A β en el tejido cerebral. Según datos proporcionados por Gyorgy y colaboradores (2016), es posible interrumpir de forma selectiva el alelo mutante APP^{SW} en fibroblastos de pacientes afectados por esta mutación, así como también el alelo de

tipo salvaje APP^{WT} en fibroblastos control no mutantes, todo esto mediante la aplicación de CRISPR/Cas9, lo cual contrarresta fuertemente la sobreproducción de péptido A β . Este ensayo consistió en la propagación de fibroblastos humanos con la mutación APP^{swe} y fibroblastos control no mutantes provenientes de individuos de la misma familia, cultivos que fueron transfectados posteriormente con un plásmido de expresión de Cas9 junto a diferentes ARN guías diseñados para dirigir la edición hacia el alelo mutante y no mutantes respectivamente. Posteriormente, la secuenciación de las células transfectadas demostró que los genotipos de los fibroblastos mutantes y de tipo salvaje fueron interrumpidos por deleciones e inserciones genómicas de forma exitosa mediante este procedimiento, además, las mediciones de ELISA proyectaron una disminución importante de A β 40 y A β 42 en células mutantes APP^{swe} y de tipo salvaje tratadas con sus respectivos ARN guía. La corrección específica del alelo mutante de APP realizada en este estudio proporcionó la primera evidencia experimental que sustentaría la aplicación del sistema CRISPR/Cas9 como futura alternativa terapéutica para la corrección del genotipo presente en formas familiares de la EA cuya causa esté asociada a mutaciones heredadas de forma autosómica dominante (Tabla 1).

Dos años más tarde, György y colaboradores (2018) reportaron la interrupción de los alelos APP^{SW} y APP^{WT} en fibroblastos humanos, observando una reducción aproximada de un 60 % en la secreción de péptido A β en los fibroblastos derivados del paciente diana, además de la generación de indels de APP tanto en neuronas primarias aisladas de embriones de ratón transgénico Tg2576 (APP^{swe}) como en el hipocampo de ratones adultos vivos Tg2576, todo esto mediante la aplicación la tecnología CRISPR/Cas9 (Tabla 1). En conjunto, estos resultados demuestran la capacidad de la tecnología CRISPR/Cas9 para la interrupción alelo-específica de APP, ahora empleando ensayos in vivo.

Otra mutación importante de APP que contribuye a la acumulación de péptido amiloide es V717I, una de las mutaciones de heredabilidad autosómica dominante con mayor incidencia en la EA (Goate et al., 1991). Recientemente, Hernández y colaboradores (2021) reportaron la corrección de V717I en un modelo de células madre pluripotentes inducidas generado previamente por Karch y colaboradores (2018); si bien el objetivo de este trabajo fue la generación de un control isogénico negativo para esta mutación, los resultados muestran

nuevamente la capacidad del sistema para corregir mutaciones de heredabilidad autosómica dominante siguiendo el principio de recombinación homóloga (Tabla 1).

Formas familiares de la Enfermedad de Alzheimer: mutaciones en el gen PSEN1

El gen PSEN1 codifica uno de los elementos de la subunidad de presenilinas del complejo enzimático γ -secretasa, el cual desempeña un papel fundamental en la generación de péptido A β a partir de APP (Sheng et al., 2009). Este complejo consta de cuatro subunidades esenciales: presenilinas (subunidad catalítica que incluye la presenilina 1 y presenilina 2), nicastrina, aph-1 y pen-2, las cuales interactúan para realizar proteólisis intramembrana en varias proteínas, entre ellas APP (Krishnaswamy et al., 2009; Zhang et al., 2014).

Se tiene registro de que las mutaciones de PSEN1 pueden detonar las formas más agresivas de la EA familiar (Poon et al., 2016), por lo tanto, la corrección de mutaciones que impactan este gen podría contribuir al desarrollo de la terapia génica de la EA familiar.

En 2012, Wallon y colaboradores realizaron un estudio en familias con EA de inicio temprano con heredabilidad autosómica dominante, en donde reportaron la mutación L150P. Cuatro años más tarde, Poon y colaboradores (2016) aplicaron la tecnología CRISPR/Cas9 en una línea de células madre pluripotentes inducidas generada previamente a partir de una biopsia de piel obtenida de un paciente con Alzheimer portador de esta mutación (Tubsuwan et al., 2016); aunque el objetivo de este estudio era la generación de un control isogénico negativo para L150P (L150P-GC-hiPSC), los resultados mostraron también la posibilidad de corregir mutaciones presentes en las formas más agresivas de la EA familiar, al menos de forma in vitro (Tabla 1).

Formas familiares de la Enfermedad de Alzheimer: mutaciones en el gen PSEN2

Otro factor importante en la patogenia de la EA familiar autosómica dominante de inicio temprano son las mutaciones del gen PSEN2, que codifica la presenilina 2. Se ha reportado que algunas mutaciones en este gen pueden contribuir a incrementar la producción de péptido A β 42 al aumentar la actividad del complejo γ -secretasa, hecho que las convierte en un factor

de riesgo importante para desarrollar EA familiar (Citron et al., 1997; Cai et al., 2015). En 2017, Ortiz-Virumbrales y colaboradores lograron revertir el aumento del índice A β 42/40 en neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal derivadas de células madre pluripotentes inducidas portadoras de la mutación N141I de PSEN2 mediante la tecnología CRISPR/Cas9, demostrando la posibilidad de aplicar el sistema para revertir incrementos patológicos en el índice A β 42/40 asociado a mutaciones de PSEN2 que promueven la síntesis patógena de A β 42 (Tabla 1).

Aplicaciones de la tecnología CRISPR/Cas9 con potencial terapéutico en la corrección de mutaciones asociadas a formas familiares de la EA				
Mutación	Autores	Objetivo	Modelo empleado	Resultados
APP K595N/ M596L	Gyorgy et al., 2016	Interrupción selectiva del alelo APP ^{SW}	Fibroblastos	Reducción de la secreción de péptido A β
	György et al., 2018		Fibroblastos, Neuronas primarias Tg2576, Ratón Tg2576	
APP V717I	Hernández et al., 2021	Generación de un control isogénico negativo para V717I	Células madre pluripotentes inducidas	Corrección in vitro de la mutación
PSEN1 L150P	Poon et al., 2016	Generación de un control isogénico negativo para L150P		
PSEN2	Ortiz-	Corrección in	Neuronas	Decremento del

N141I	Virumbrales et al., 2017	vitro de N141I	colinérgicas del prosencéfalo basal	índice A β 42/40
-------	--------------------------	----------------	-------------------------------------	------------------------

Tabla 1. Aplicaciones de la tecnología CRISPR/Cas9 con potencial terapéutico en la corrección de mutaciones asociadas a formas familiares de la EA.

Genes implicados en la síntesis de péptido A β : APP

Uno de los trabajos más recientes en materia de edición génica de células madre pluripotentes inducidas fue publicado recientemente por Ye y colaboradores (2021), quienes aplicaron el sistema CRISPR/Cas9 para estudiar el efecto de la dosis de APP en células madre pluripotentes inducidas provenientes de un paciente portador de tres copias de dicho gen. En este trabajo se desarrollaron nickasas emparejadas de Cas9 para generar líneas knockout mono, bi y trialélicas de APP; las neuronas corticales generadas a partir de estas líneas celulares exhibieron una corrección del fenotipo en la secreción de péptido A β e hiperfosforilación de tau dependiente de la dosis de APP (Tabla 2). Desregulaciones génicas como estas representan una de las principales causas de enfermedades autosómicas dominantes al aumentar la expresión del producto codificado, por lo que la generación de líneas celulares con diferentes dosis de genes mediante CRISPR/Cas9 contribuye enormemente a estudiar su contribución a la patogénesis de la EA familiar.

Genes implicados en la generación de péptido A β : PSEN1 y PSEN2

En 2020, Pimenova y Goate presentaron un modelo doble knockout de los genes PSEN1 y PSEN2 en células de neuroblastoma de ratón (N2a) generado por CRISPR/Cas9, obteniendo como resultado una supresión completa de la producción de péptido A β (Tabla 2); la generación de este tipo de modelos celulares resulta valiosa para abordar estudios de patogenicidad en los genes implicados en la síntesis de péptido A β , aunque la caracterización individual de los componentes resulta necesaria, ya que su actividad no es exclusiva del proceso de síntesis de péptido A β . En 2019, Lessard y colaboradores generaron modelos knockout PSEN1, PSEN2 y doble knockout PSEN1/PSEN2 en células HEK 293T,

encontrando que PS2 genera más péptido A β intracelular que PS1 (Tabla 2), lo que podría favorecer la muerte celular y una consecuente liberación de péptido A β a las células vecinas, expandiendo su efecto tóxico; trabajos como este contribuyen enormemente a la caracterización individual de los componentes del complejo gamma secretasa, que además de participar en la secreción patógena de A β , regula el metabolismo de otros sustratos.

Genes implicados en la generación de péptido A β : BACE1

El gen BACE1 codifica la principal β -secretasa que participa en la vía de generación de péptido A β neuronal (Cai et al., 2001). El hecho de que BACE1 juegue un papel crítico en la generación de péptido A β lo ha convertido en un objetivo importante para estudiar el efecto fisiológico de la disminución de su expresión en la patogenia de la EA.

En 2019, Park y colaboradores aplicaron nanocomplejos CRISPR/Cas9 dirigidos hacia el gen BACE1 en un ensayo in vivo con el objetivo de eliminar la expresión del gen en neuronas postmitóticas de cerebro de ratón adulto, obteniendo como resultado una supresión del efecto acumulativo del péptido A β y del deterioro cognitivo asociado sin la aparición de efectos secundarios importantes con afecciones mínimas fuera del blanco de edición (Tabla 2). La aplicación de esta plataforma en modelos animales es sumamente importante debido al gran aporte que representa tanto para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos como en el desarrollo de futuros estudios preclínicos.

Contribuciones de la aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 sobre genes implicados en la generación de péptido A β					
Blanco molecular	Autores	Objetivo	Modelo empleado	Resultados	Contribución
APP	Ye et al., 2021	Generación de líneas knockout mono, bi y trialélicas de	Células madre pluripotentes inducidas	Corrección del fenotipo patológico en función de la dosis	Desregulaciones en la dosis de APP contribuyen al fenotipo

		APP		de APP	patológico de la EA
PSEN1/ PSEN2	Pimenova y Goate, 2020	Generación de un modelo doble knockout PSEN1/PSEN2	Células de neuroblastoma de ratón (N2a)	Eliminación de la expresión de A β	La caracterización de los genes PSEN1 y PSEN2 permite evaluar su patogenicidad de forma individual
	Lessard et al., 2019	Generación de modelos knockout PSEN1, PSEN2 y PSEN1/PSEN2	Células HEK 293T	PS2 genera más péptido A β intracelular que PS1	
BACE1	Park et al., 2019	Eliminar la expresión in vivo de BACE1	Ratón	Supresión del efecto patológico de A β	La eliminación de BACE1 disminuye la acumulación de péptido A β

Tabla 2. Contribuciones de la aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 sobre genes implicados en la generación de péptido A β .

Alelo APOE ϵ 4, principal factor de riesgo genético en la EA

Los estudios de asociación de todo el genoma representan una herramienta poderosa en la búsqueda de genes que representan un factor de riesgo genético para desarrollar enfermedades (Cano-Gamez y Trynka, 2020). La aplicación de esta plataforma en el estudio de la EA ha revelado que el alelo APOE ϵ 4 es el principal factor de riesgo genético en la EA de inicio tardío (Shen y Jia, 2016), aunque también se ha reportado que la presencia de este alelo podría aumentar considerablemente la prevalencia de la EA al reducir la edad de aparición hasta en 20 años (Rabinowitz et al., 2019).

El gen APOE humano presenta tres alelos principales: APOE ϵ 2, APOE ϵ 3 y APOE ϵ 4, los cuales codifican diferentes isoformas de esta proteína (Pérez, 2017). ApoE es una proteína que se encuentra ampliamente distribuida dentro del SNC, cuyas funciones están relacionadas con el almacenamiento, transporte y redistribución de lípidos cerebrales y la homeostasis del colesterol principalmente (Mahley, 2016); por otro lado, existe una relación estrecha entre la expresión de la variante APOE ϵ 4 con la fisiopatología de la EA debido a su influencia en el proceso de formación de la placa senil y en la deposición de péptido amiloide en los vasos sanguíneos cerebrales (Deane et al, 2008), por lo que hoy se reconoce a esta variante como un factor de riesgo genético importante en el establecimiento de esta patología. Las diferentes isoformas de esta proteína presentan cambios sutiles dentro de su secuencia aminoacídica que influyen enormemente en sus propiedades fisicoquímicas, afectando su interacción con receptores y partículas lipoproteicas (Bateman et al., 2019); en contraste con el alelo APOE ϵ 4, se sabe que el alelo APOE ϵ 2 presenta efecto citoprotector contra el desarrollo de la EA de inicio tardío (Corder et al., 1994), mientras que el alelo APOE ϵ 3, que es el alelo más común en la población, parece no representar riesgo genético (Pérez, 2017); con base en esto, una de las estrategias más prometedoras para disminuir el riesgo genético de desarrollar EA que conllevaría portar el alelo APOE ϵ 4 consiste en desarrollar estrategias que permitan bloquear su expresión en organismos heterocigotos o su conversión a otra variante alélica.

En 2019, Rabinowitz y colaboradores reportaron un knockout específico del alelo APOE ϵ 4 empleando una variante sintética de Cas9 en astrocitos de ratones que expresaban los alelos APOE ϵ 3 y APOE ϵ 4 humanos, lo cual dio como resultado una disminución del 70 % en los niveles de expresión de ApoE4 sin cambios significativos en la expresión de ApoE3 (Tabla 3); el éxito de esta estrategia se fundamenta en la capacidad de la tecnología para distinguir polimorfismos de un solo nucleótido, considerando que APOE ϵ 3 y APOE ϵ 4 difieren en un solo nucleótido. El desarrollo de este enfoque podría implementarse como un tipo de terapia génica profiláctica en pacientes portadores del alelo APOE ϵ 4.

Con el objetivo de estudiar el efecto fenotípico de APOE ϵ 4 en diferentes tipos de células cerebrales, Lin y colaboradores (2018) desarrollaron células madre pluripotentes inducidas isogénicas APOE ϵ 4 homocigotas a partir de células parentales APOE ϵ 3 (Tabla 3); después de inducir la diferenciación de los cultivos isogénicos APOE ϵ 3 y APOE ϵ 4 en neuronas, astrocitos

y células similares a microglía, los resultados mostraron que el genotipo APOE ϵ 4 induce alteraciones fenotípicas características de la EA que involucran el aclaramiento del péptido A β y la fosforilación de tau. Siguiendo un enfoque similar, los investigadores generaron células madre pluripotentes inducidas isogénicas APOE ϵ 3 homocigotas a partir de células madre pluripotentes inducidas APOE ϵ 4 homocigotas provenientes de un paciente con EA, mostrando que este cambio genotípico consigue atenuar parte del fenotipo de las células cerebrales diferenciadas portadoras del alelo APOE ϵ 4. La implementación de cultivos de células madre pluripotentes inducidas en la investigación de enfermedades complejas resulta clave para generar modelos que aproximen los resultados obtenidos lo más posible a los mecanismos fisiopatológicos que ocurren en seres humanos, lo cual resulta útil también en el desarrollo de estrategias terapéuticas personalizadas (Wan et al, 2015).

Si bien la tecnología CRISPR/Cas9 ha mostrado ser altamente específica en la edición de diversos blancos moleculares, la aplicación del concepto clásico de esta plataforma podría introducir indels indeseables de forma aleatoria en regiones distantes al sitio de edición, lo que ha conllevado a la implementación de nuevos enfoques para la corrección de mutaciones puntuales basados en la edición programable de bases de ADN genómico sin la necesidad de escindir la doble cadena de ADN (Zhang et al., 2015). En 2016, Komor y colaboradores diseñaron quimeras del dominio CRISPR/Cas9 inactivo fusionado con una citidina desaminasa, las cuales conservan su programabilidad mediante ARN guía sin inducir escisiones bicatenarias de ADN, catalizando en su lugar la conversión de citidina en uridina, lo que se traduce a una sustitución de base única (C-G por T-A cuando U es reconocido como T durante la replicación del ADN). Uno de los ensayos de este estudio consistió en probar el potencial de estas quimeras para convertir la isoforma APOE4 (Arg112/Arg158) en APOE3r (Arg112/Cys158) en un cultivo de astrocitos de ratón inmortalizados, cuyo gen endógeno fue sustituido por el alelo APOE ϵ 4 humano; como resultado se obtuvo una conversión de Arg158 a Cys158 en hasta un 75 % de las lecturas de secuenciación de ADN total; si bien ocurrieron dos conversiones de C a T adicionales debido a su localización dentro de la ventana de edición, esto no modificó la secuencia de APOE3r, lo cual demuestra el potencial de los editores de bases para reemplazar la secuencia codificante de un solo aminoácido al interior de marcos abiertos de lectura, evitando así posibles ediciones indeseables fuera del sitio de edición (Tabla 3).

Contribuciones de la aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 sobre el alelo APOE ϵ 4					
Blanco molecular	Autores	Objetivo	Modelo empleado	Resultados	Contribución
APOE ϵ 4	Rabinowitz et al., 2019	Interrupción selectiva del alelo APOE ϵ 4	Astrocitos de ratón transgénico	Reducción de la expresión de ApoE4 sin cambios significativos en la expresión de ApoE3	Las estrategias de corrección alélica temprana de APOE ϵ 4 podrían disminuir el riesgo genético de padecer EA a largo plazo
	Lin et al., 2018	Desarrollo de cultivos isogénicos APOE ϵ 4 partir de células parentales APOE ϵ 3 y viceversa	Células madre pluripotentes inducidas	El genotipo APOE ϵ 4 induce alteraciones fenotípicas características de la EA	
	Komor et al., 2016	Corrección del genotipo APOE ϵ 4 mediante un enfoque de edición de bases	Astrocitos de ratón transgénico	Conversión de APOE ϵ 4 en APOE ϵ 3r	

Tabla 3. Contribuciones de la aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 sobre el alelo APOE ϵ 4.

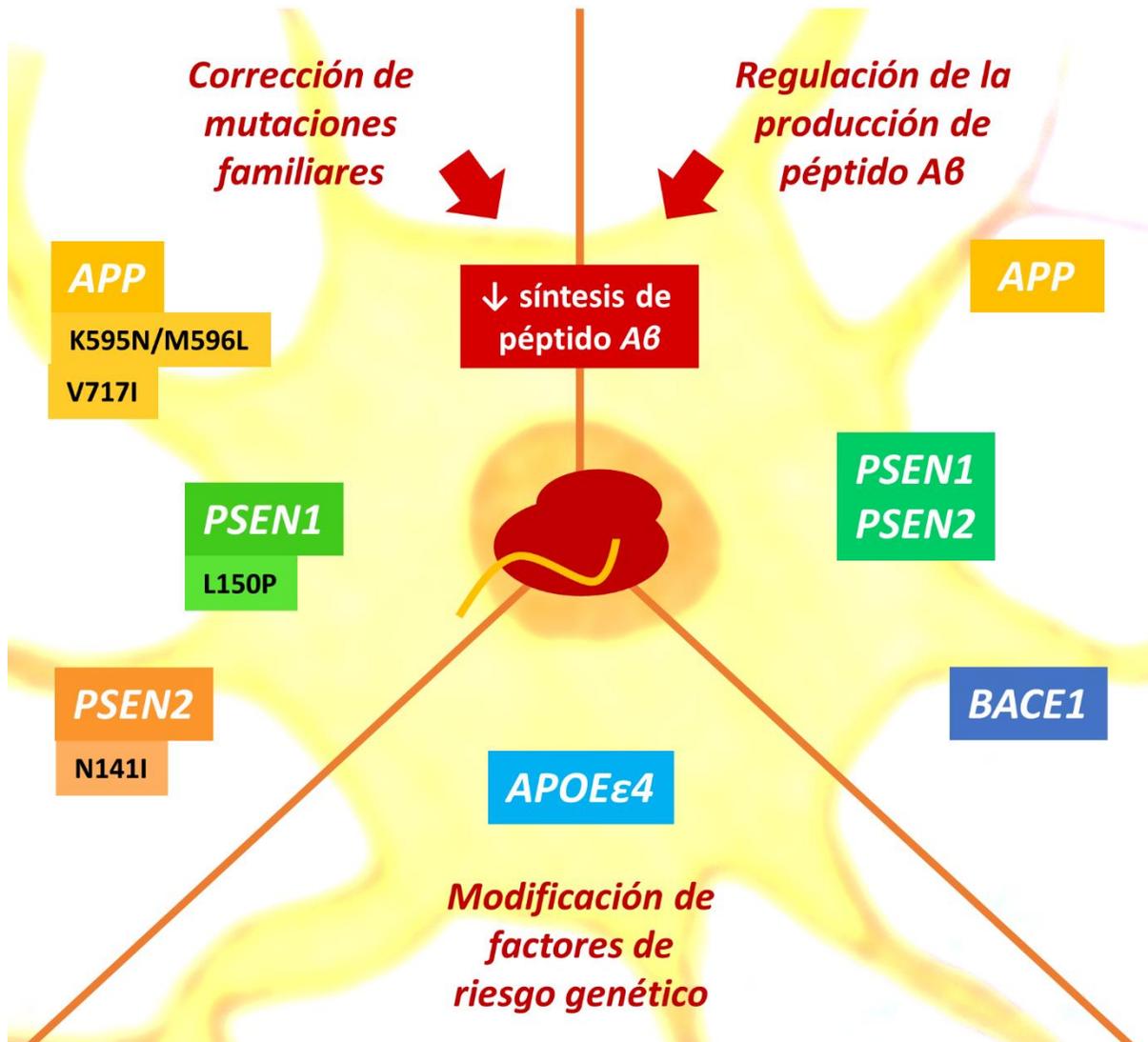


Figura 4. Áreas de aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 en la Enfermedad de Alzheimer. La corrección de mutaciones familiares en los genes APP, PSEN1 y PSEN2 disminuye de forma indirecta la secreción de péptido A β , mientras que la modificación de la expresión de estos genes lo hace de forma directa; por otro lado, la modificación de factores de riesgo genético, como la variante alélica APOE ϵ 4, podría disminuir el riesgo de desarrollar la patología a largo plazo.

APLICACIONES DEL SISTEMA CRISPR/CAS9 EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Formas familiares de la Enfermedad de Parkinson: mutaciones en el gen SNCA

El gen SNCA es un elemento crucial en la fisiopatología de la EP, ya que el producto codificado por este gen constituye el componente principal de los cuerpos de Lewy, no solo en la EP, sino también en otras α -sinucleopatías (Spillantini et al., 1998; Siddiqui et al., 2016).

La mutación A53T del gen SNCA ha sido una de las mutaciones más estudiadas asociada a formas familiares de la EP; la consecuencia fisiológica de esta sustitución conlleva a un inicio temprano de la EP al acelerar del proceso de formación de fibrillas de α -sinucleína (Conway et al., 1998).

En 2020, Yoon y colaboradores aplicaron la tecnología CRISPR/Cas9 para eliminar la mutación A53T de forma in vitro e in vivo (Tabla 4). El primer ensayo consistió en aplicar la tecnología en un cultivo de células HEK293T portadoras de esta mutación, reduciendo sus niveles de expresión sin modificar al alelo de tipo salvaje. El siguiente objetivo del estudio fue probar el potencial terapéutico de esta tecnología de forma in vivo en un modelo de rata portador de la mutación A53T; los resultados mostraron que la delección de esta mutación previno de forma importante la sobreexpresión de α -sinucleína, el proceso de neurodegeneración dopaminérgica y los síntomas motores asociados.

Otra mutación del gen SNCA asociada a formas familiares de la EP de inicio temprano heredadas con un patrón autosómico dominante es la mutación A30P (Perni et al., 2021). Al igual que A53T, esta mutación promueve la formación de oligómeros prefibrilares (Lashuel et al., 2002).

En 2020, Barbuti y colaboradores reportaron la corrección de la mutación A30P en células madres pluripotentes inducidas derivadas de un paciente con EP portador de dicha mutación (Tabla 4). Las líneas celulares isogénicas corregidas por CRISPR/Cas9 fueron diferenciadas en células precursoras neurales, en donde se observó que las células corregidas genéticamente presentaban una reducción en los niveles de expresión del gen SNCA. Posteriormente, su diferenciación en neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral permitió cuantificar la expresión de SNCA mediante RT-qPCR, confirmando una reducción en sus niveles de

expresión, hallazgo que se validó mediante western blot, obteniendo una reducción aproximada de 3 veces en los niveles de α -sinucleína en dos de los controles corregidos al compararlos con las neuronas del paciente portador de la mutación A30P. Finalmente, los investigadores compararon la expresión de SNCA en células madre pluripotentes inducidas, células precursoras neurales y neuronas, encontrando que las neuronas portadoras de la mutación A30P presentaban altos niveles de expresión de SNCA en comparación con los controles corregidos genéticamente. Estos trabajos contribuyen enormemente al desarrollo de la terapia génica de la EP causada por mutaciones heredadas de forma autosómica dominante.

Mutaciones en el gen LRRK2

LRRK2 es un gen que codifica la proteína dardarina, la cual parece desempeñar un rol importante en diferentes procesos que requieran interacciones proteína-proteína, como cascadas de señalización y formación de estructuras celulares, además de presentar actividad quinasa (Dächsel y Farrer, 2010). Debido a estas características, las mutaciones de LRRK2 han sido identificadas como el determinante genético más común de la EP de inicio temprano y tardío, presentes tanto en formas familiares como idiopáticas (Gómez-Garre et al., 2010; Drolet et al., 2011); de estas mutaciones, G2019S representa la variante más común, presentando una alta proporción dentro de las formas familiares, además de ser una de las mutaciones más comunes en la EP esporádica (Ren et al., 2019).

En 2020, Vermilyea y colaboradores aplicaron la tecnología CRISPR/Cas9 con reparación dirigida por homología en células madre pluripotentes inducidas y embrionarias de tití con el objetivo de introducir la mutación G2019S, así como establecer un truncamiento del dominio de quinasa de LRRK2 (Tabla 4). Como resultado encontraron que el efecto de esta mutación en titíes induce un incremento de la actividad quinasa, de forma similar a lo que ocurre en humanos; después de la diferenciación de las líneas celulares editadas genéticamente en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas se encontró un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno intracelulares como consecuencia de esta mutación, así como una disminución de la viabilidad neuronal y reducción de la complejidad de las proyecciones somáticas, en contraste con el fenotipo observado en las clonas con truncamiento de LRRK2. La caracterización de mutaciones como esta aporta evidencia científica importante para

evaluar las implicaciones fisiológicas que conllevaría portar mutaciones patogénicas en este gen, cuyo producto se encuentra enormemente involucrado en el mantenimiento de la homeostasis neuronal al controlar la producción de radicales libres citotóxicos que contribuyen de forma sustancial al proceso neurodegenerativo. Estos resultados muestran el potencial del sistema para replicar mutaciones humanas de la EP en modelos animales de títis, lo que permitiría crear modelos para la identificación de nuevos fármacos que contribuyan a contrarrestar el efecto patogénico de mutaciones que presentan ganancias de función.

Mutaciones en el gen VPS35

VPS35 es un gen que codifica uno de los componentes del retrómero, un elemento importante para la recuperación de proteínas endosomales (Seaman, 2012). Diferentes mutaciones del gen VPS35 han sido reconocidas como detonantes de formas familiares de la EP heredadas de forma autosómica dominante de aparición tardía (Williams et al., 2017), entre ellas la mutación sin sentido D620N (Rahman y Morrison, 2019).

En 2016, Ishizu y colaboradores aplicaron la tecnología CRISPR/Cas9 para generar un modelo knock-in de ratón portador de la mutación D620N, además de otro modelo de ratón portador de una delección de 1 pb dentro del exón 15 de VPS35, con el objetivo de estudiar el efecto patogénico in vivo asociado a este genotipo (Tabla 4). Para determinar la funcionalidad del alelo mutante $Vps35^{D620N}$, los investigadores realizaron cruces heterocigotos de los ratones mutantes $Vps35^{D620N/+}$ para generar ratones homocigotos $Vps35^{D620N/D620N}$, obteniendo una descendencia con proporciones similares a las esperadas según los patrones de herencia mendeliana; estos resultados demostraron la funcionalidad del alelo $Vps35^{D620N}$ al menos parcialmente, ya que la descendencia $Vps35^{D620N/+}$ y $Vps35^{D620N/D620N}$ mostró un desarrollo óptimo, además de presentar un complejo retrómero funcional, lo que sugiere que estas mutaciones no interfirieron en la actividad biológica del producto codificado. Por otro lado, el cruce de mutantes heterocigotos portadores del alelo $Vps35^{Del1}$ ($Vps35^{Del1/+}$) con la delección de VPS35 no generó descendencia homocigota, lo que sugiere que el genotipo $Vps35^{Del1/Del1}$ induce efectos letales en el desarrollo embrionario. Finalmente, para evaluar si el alelo $Vps35^{D620N}$ puede revertir la letalidad del genotipo $Vps35^{Del1/Del1}$, los investigadores realizaron

cruces heterocigotos de los genotipos $Vps35^{D620N/+}$ y $Vps35^{Del1/+}$ para obtener el genotipo $Vps35^{D620N/Del1}$, que mostró desventajas de supervivencia respecto al genotipo $Vps35^{Del1/+}$, lo que sugiere la posibilidad de que el alelo $Vps35^{D620N}$ sea un alelo que presente pérdida parcial de su función, lo que se traduce a un producto parcial o totalmente inactivado. La importancia estudios como este dirigidos a evaluar posibles pérdidas o ganancias de la función de alelos mutantes son sumamente valiosos en el estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la EP.

Contribuciones de la tecnología CRISPR/Cas9 en el tratamiento e investigación de mutaciones asociadas a la patogénesis de la Enfermedad de Parkinson					
Mutación	Autores	Objetivo	Modelo empleado	Resultados	Contribución
SNCA A53T	Yoon et al., 2020	Eliminar la mutación A53T de forma in vitro e in vivo	Células HEK293T y modelo transgénico de rata	Disminución de la expresión de α -sinucleína y reversión de la neurodegeneración dopaminérgica	Potencial terapéutico del sistema para el tratamiento de formas familiares de la EP causadas por mutaciones heredadas de forma autosómica dominante
SNCA A30P	Barbuti et al., 2020	Eliminar la mutación A30P de forma in vitro	Células madre pluripotentes inducidas	Disminución de la expresión de α -sinucleína en células corregidas diferenciadas	
LRRK2 G2019S	Vermilyea et al., 2020	Introducir la mutación G2019S en un modelo de células de primate	Células madre pluripotentes inducidas y embrionarias de tití	La mutación G2019S incrementa la actividad quinasa en células de tití	Potencial del sistema para la caracterización de mutaciones en células de primate
VPS35	Ishizu et	Estudiar la	Ratón	Ratones knock-in	Evaluación de

D620N	al., 2016	patogénesis de la mutación D620N de forma in vivo		portadores de la mutación D620N, ratones con delección en VPS35 y descendencia	pérdidas o ganancias en la función alélica y su efecto patogénico en modelos animales
-------	-----------	---	--	--	---

Tabla 4. Contribuciones de la tecnología CRISPR/Cas9 en el tratamiento e investigación de mutaciones asociadas a la patogénesis de la Enfermedad de Parkinson.

Genes reguladores de la patogénesis de la EP: PARK2 y PINK1

Se sabe que la disfunción mitocondrial constituye uno de los procesos celulares de mayor relevancia en la patogénesis de la EP (Winklhofer y Haass, 2010). El proceso de mitofagia, mecanismo celular mediante el cual las mitocondrias dañadas son degradadas y recicladas de forma selectiva, está regulado por los productos de varios genes, entre ellos PARK2 y PINK1 (Liu et al., 2019; Ma et al., 2021), los cuales podrían contribuir a la aceleración del proceso neurodegenerativo.

En 2015, Zhou y colaboradores aplicaron la tecnología CRISPR/Cas9 para la edición de fibroblastos fetales porcinos que servirían como donantes en la generación de cerdos transgénicos homocigotos mediante la técnica de transferencia nuclear de células somáticas (Tabla 5). En uno de los experimentos, los investigadores editaron de forma simultánea los genes PARK2 y PINK1 mediante la estrategia de doble knockout para generar el genotipo PARK2^{-/-}/PINK1^{-/-} en el cultivo donante de fibroblastos. Posteriormente, mediante el proceso de transferencia nuclear se obtuvieron embriones reconstruidos derivados de las células editadas PARK2^{-/-}/PINK1^{-/-}, siendo estos transferidos a 10 madres sustitutas; 4 desarrollaron el ciclo completo de gestación dando a luz 20 lechones con el genotipo PARK2^{-/-}/PINK1^{-/-}, de los cuales 6 sobrevivieron y se desarrollaron normalmente. La descendencia presentó niveles indetectables de parkina y PINK1, sin rasgos fenotípicos asociados a la EP, al menos durante sus primeros 7 meses de vida. Estos resultados demuestran el gran potencial de la tecnología

CRISPR/Cas9 en combinación con la técnica de transferencia nuclear de células somáticas para la generación de modelos animales que porten un genotipo estable sin la necesidad de realizar rondas de reproducción adicionales, proceso poco práctico para el desarrollo de modelos animales superiores.

Genes reguladores de la patogénesis de la EP: PARK7

El gen PARK7 codifica la proteína DJ-1, un elemento citoprotector de los procesos redox con gran actividad neuroprotectora gracias a sus características de molécula chaperona (Kahle et al., 2009). En 2019, Edson y colaboradores presentaron una línea knockout PARK7 de pez cebra con el objetivo de estudiar cambios tempranos dentro del proteoma cerebral que podrían estar involucrados en la patogénesis de la EP (Tabla 5). En este trabajo, el equipo de investigación aplicó el sistema CRISPR/Cas9 en una línea de pez cebra para introducir una delección de 5 pb dentro del exón 1 del gen PARK7, generando exitosamente la línea PARK7^{-/-} de pez cebra. Posteriormente, los animales con deficiencia en DJ-1 fueron evaluados en su etapa adulta tardía, encontrando una reducción en los niveles de la enzima tirosina hidroxilasa cerebral (marcador fenotípico característico de la EP), peso bajo y un decremento en la actividad mitocondrial en músculo esquelético. Finalmente, para analizar el posible efecto patológico del knockout de PARK7 en el proteoma de cerebros de adultos jóvenes PARK7^{-/-} vinculado al fenotipo observado en la etapa adulta tardía, los investigadores aplicaron un método de espectrometría de masas sin marcaje, detectando cambios prominentes en el proteoma cerebral de la línea knockout, aunque todavía no parecía haber cambios en los niveles de tirosina hidroxilasa; el análisis bioinformático de proteínas ortólogas reveló la posible influencia de esta mutación sobre proteínas implicadas en la función mitocondrial, proteínas asociadas a la respuesta al estrés y proteínas reguladoras de la respuesta inflamatoria, cuyo desbalance podría promover el fenotipo patológico de la EP.

Algunas mutaciones en el gen PARK7 han sido vinculadas al desarrollo de la EP de aparición temprana con un patrón de herencia autosómico recesivo (Valente et al., 2001; van Duijn et al., 2001). Un estudio reciente publicado por Mazza y colaboradores (2021) mostró la aplicación del sistema CRISPR/Cas9 para imitar una disomía uniparental de un paciente con EP de inicio temprano, la cual consiste en una delección homocigota de 1 pb en el gen PARK7

(Tabla 5). En este estudio, los investigadores aplicaron la tecnología CRISPR/Cas9 para insertar esta mutación en una línea control de células madre pluripotentes inducidas disponible comercialmente (A18945), imitando así la línea derivada del paciente portador de la mutación. La reproducción de mutaciones en modelos de células madre pluripotentes inducidas son clave en el desarrollo de estudios posteriores dirigidos a la investigación de su efecto patológico sobre el fenotipo gracias a su capacidad de diferenciación hacia diferentes linajes celulares.

Genes reguladores de la patogénesis de la EP: GBA

La beta-glucocerebrosidasa es una enzima lisosomal codificada por el gen GBA, una enzima clave en el metabolismo de esfingolípidos (Gegg y Schapira, 2018). Hoy se sabe que las mutaciones de este gen representan un factor de riesgo importante en la patogénesis de la EP por su posible contribución a los procesos de agregación de α -sinucleína, autofagia y estrés reticular (Neumann et al., 2009; Sidransky y Lopez, 2012; O'Regan et al., 2017).

En 2020, Jiang y colaboradores reportaron la caracterización de una variante patogénica de GBA en pacientes con EP con deterioro cognitivo leve (Tabla 5). En este estudio, los investigadores localizaron un eQTL (Expression Quantitative Trait Loci) con polimorfismo de nucleótido único del gen GBA (rs12411216) en uno de los DHSs (DNase I Hypersensitive Sites) que reaccionan al promotor de GBA. Los eQTL son loci genómicos que contribuyen a la variación de los niveles de expresión del producto que regulan, por lo que resultan ser elementos clave en los procesos de regulación de la expresión génica. Mediante estudios de genotipificación, los investigadores encontraron que este locus estaba distribuido en un grupo de pacientes con EP con deterioro cognitivo leve en su forma homocigota y heterocigota, encontrando además que los pacientes con mutaciones homocigotas de este SNP presentaban niveles disminuidos de ARNm de GBA respecto a los pacientes con el genotipo de tipo salvaje. Para estudiar si el SNP rs12411216 afecta la expresión in vivo de GBA, los investigadores reemplazaron este alelo y eliminaron la secuencia DHS 5' de GBA en un cultivo de células SH-SY5Y mediante el sistema CRISPR/Cas9, encontrando que la secuencia DHS 5' de GBA afecta de forma significativa la expresión de GBA, y que el locus rs12411216 es un SNP funcional del gen GBA; si bien no se encontraron diferencias en la expresión del gen SNCA, los resultados mostraron un incremento en los niveles de fosforilación de α -

sinucleína tanto en el modelo knockout como en el modelo de reemplazo alélico. Finalmente, los modelos celulares editados mostraron un decremento significativo de la actividad de la enzima glucocerebrosidasa, además de que la agregación patológica de α -sinucleína fue más severa en el modelo de reemplazo alélico con el SNP rs12411216, lo cual contribuiría al riesgo genético para desarrollar EP. El hecho de que este locus se superponga con el factor de transcripción E2F4 (elemento que regula la expresión de GBA) podría explicar su contribución a la disminución de la expresión de este gen y las consecuencias patológicas que esto implica, lo que demostraría el potencial de este alelo como posible biomarcador genético que ayude al pronóstico de la EP con deterioro cognitivo leve.

GBAP1, un pseudogen que comparte homología de secuencia con GBA (Martínez-Arias et al., 2001), podría interferir considerablemente en la eficacia de los procesos de edición genética dirigidos hacia mutaciones que impactan a GBA, desencadenando posibles efectos patológicos debido a que la edición inespecífica del pseudogen podría modificar su propia regulación. En 2020, Hanss y colaboradores aplicaron la tecnología CRISPR/Cas9 para la edición específica de mutaciones puntuales sin alterar la secuencia genética correspondiente al pseudogen GBAP1, aplicando un enfoque de corrección por CRISPR/Cas9 asistido por FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting), una técnica empleada en procesos de purificación de poblaciones celulares específicas basadas en el fenotipo detectado por citometría de flujo (Tabla 5). En este estudio, los investigadores corrigieron la mutación GBA N370S en un cultivo de células madres pluripotentes inducidas derivadas de fibroblastos de un paciente portador de dicha mutación, e insertaron esta misma mutación en células madre pluripotentes inducidas portadoras del alelo GBA de tipo salvaje; los resultados mostraron que la corrección de la mutación indujo un incremento tanto en los niveles proteicos del producto codificado como en su actividad enzimática, revirtiendo el fenotipo de la EP, mientras que la inserción de la mutación provocó un decremento tanto en los niveles proteicos del producto como en su actividad enzimática, reproduciendo así el fenotipo de las células derivadas del paciente portador de la mutación heterocigota. Este estudio muestra el potencial de esta tecnología para corregir mutaciones de genes incluso ante la presencia de pseudogenes homólogos, evitando ediciones fuera del blanco.

Contribuciones de la tecnología CRISPR/Cas9 en la caracterización de genes con potencial papel regulador de la patogénesis de la Enfermedad de Parkinson					
Blanco molecular	Autores	Objetivo	Modelo empleado	Resultados	Contribución
PARK2 y PINK1	Zhou et al., 2015	Generación de cerdos homocigotos doble knockout PARK2/PINK1	Fibroblastos porcinos	Anulación del fenotipo patológico de la EP en el modelo animal	La supresión in vivo de PARK2 y PINK1 demuestra su rol patogénico en la EP
PARK7	Edson et al., 2019	Estudiar el efecto de la supresión de PARK7 en el proteoma cerebral	Pez cebra	Cambios potencialmente patológicos en el proteoma cerebral de la línea knockout	Modificaciones de PARK7 podrían impactar disminuyendo su actividad citoprotectora neuronal
	Mazza et al., 2021	Reproducción in vitro de una disomía uniparental asociada la EP de inicio temprano	Células madre pluripotentes inducidas	Delección homocigota de 1 pb en el gen PARK7	Estudiar el fenotipo mutante en diferentes linajes de células diferenciadas
SNP rs12411216 y secuencia	Jiang et al., 2020	Reemplazo del SNP rs12411216 y	células SH-SY5Y	rs12411216 induce agregaciones	Identificación de nuevos biomarcadores

GBA DHS 5'		eliminación de la secuencia DHS 5' de GBA		patológicas severas de α - sinucleína	genéticos de la EP
GBA	Hanss et al., 2020	Corrección e inserción de la mutación N370S	Células madre pluripotentes inducidas	La corrección de N370S revierte el fenotipo de la EP	Potencial del sistema para la edición de genes ante la presencia de pseudogenes homólogos

Tabla 5. Contribuciones de la tecnología CRISPR/Cas9 en la caracterización de genes con potencial papel regulador de la patogénesis de la Enfermedad de Parkinson.

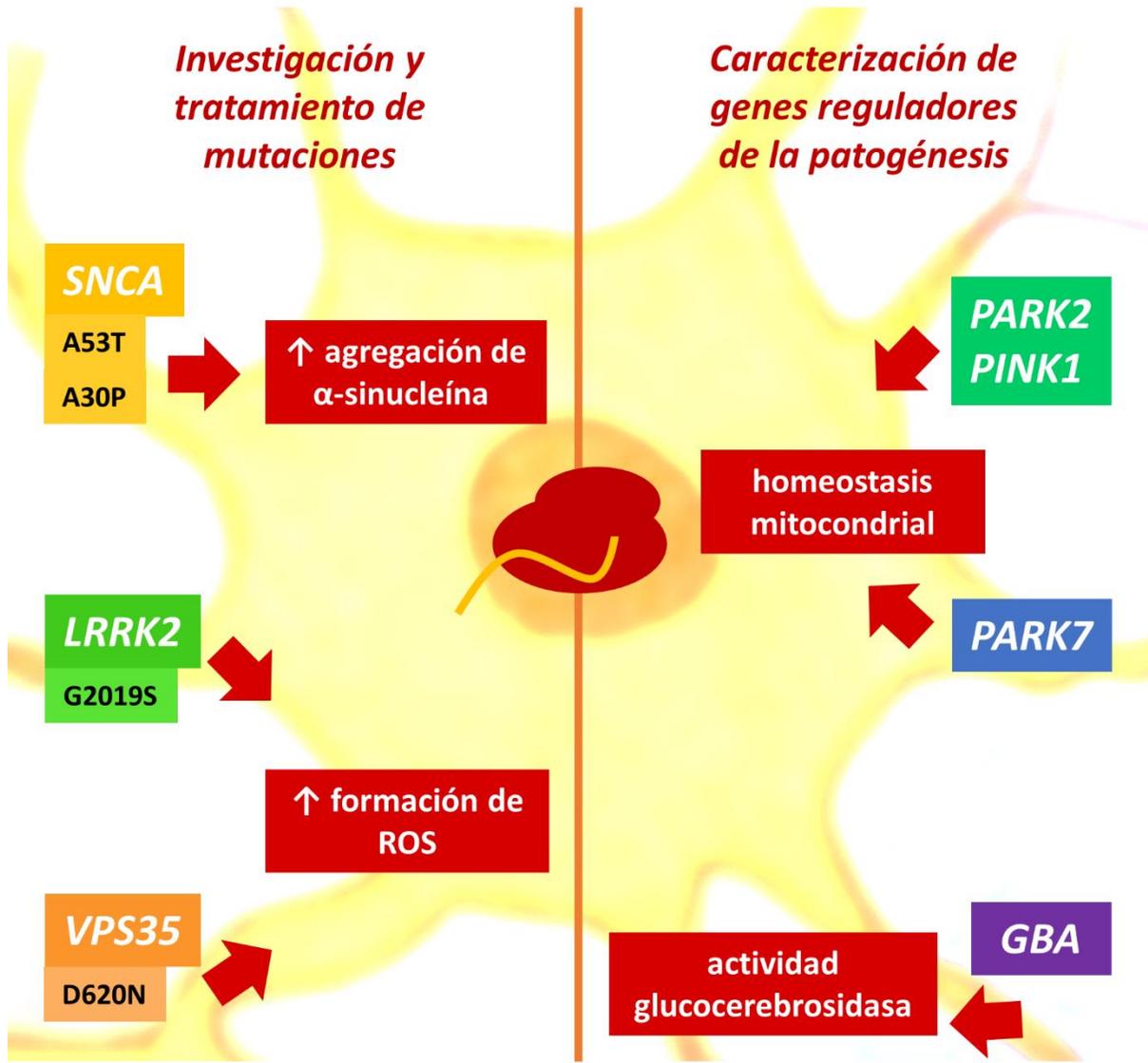


Figura 5. Áreas de aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 en la Enfermedad de Parkinson. Mutaciones en los genes SNCA, LRRK2 y VPS35 contribuyen al proceso fisiopatológico al promover la agregación de α -sinucleína y la formación de especies reactivas de oxígeno; por otro lado, la regulación de los genes PARK2, PINK1, PARK7 y GBA es crítica para prevenir el proceso neurodegenerativo.

APLICACIONES DEL SISTEMA CRISPR/CAS9 EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Estrategias terapéuticas

En 2016, Shin y colaboradores desarrollaron una estrategia para la edición del alelo mutante del gen HTT con el objetivo de introducir deleciones que resultaran en la inactivación específica de este alelo sin afectar al alelo de tipo salvaje (Tabla 6). En este estudio, los investigadores identificaron pares de sitios PAM presentes de forma exclusiva en el cromosoma mutante y ausentes en el cromosoma normal de un paciente con EH. Posteriormente se llevó a cabo el proceso de edición por CRISPR/Cas9 mediante la cotransfección de un cultivo de fibroblastos primarios derivados de este paciente con 2 vectores diseñados para editar el alelo mutante (cada uno expresando una molécula diferente de ARN guía considerando los dos sitios PAM preseleccionados); el proceso de edición produjo deleciones genómicas de gran tamaño flanqueadas por los sitios PAM reconocidos por cada uno de los ARN guía. El análisis posterior por PCR reveló que este enfoque indujo de forma exitosa deleciones específicas en el cromosoma mutante que eliminaban la región promotora, el sitio de inicio de la transcripción y la expansión CAG ante la presencia de pares de SNPs que alteraban los sitios PAM del alelo mutante, los cuales estaban ausentes en la secuencia del alelo de tipo salvaje. Al comparar el genotipo de los fibroblastos no tratados derivados del paciente con una de las clonas derivadas del proceso de edición observaron que los fibroblastos no tratados presentaban un genotipo heterocigoto para la mutación de HTT, mientras que la clona editada presentaba un genotipo homocigoto del alelo de tipo salvaje, el cual carecía de la repetición CAG tanto a nivel genómico como a nivel transcripcional, lo que se tradujo en una reducción significativa en los niveles de huntingtina debido a la supresión de la expresión del alelo mutante. Este enfoque de edición personalizada basado en la identificación de variantes genéticas que permitan la corrección selectiva de mutaciones monoalélicas resulta sumamente valioso para la inactivación permanente de mutaciones de ganancia de función, como la expansión del triplete CAG del gen HTT.

Siguiendo un enfoque similar al aplicado en el estudio anterior, Monteys y colaboradores (2017) propusieron una estrategia de edición específica del alelo HTT mutante aprovechando la localización heterocigota de SNPs en la región promotora del gen, variantes que promovían la generación y destrucción de sitios PAM en los alelos del gen (Tabla 6). El hecho de que las

regiones reguladoras de la expresión de HTT residen dentro de un marco relativamente amplio localizado hacia el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción promueve la disponibilidad natural de diferentes sitios PAM dependientes de SNPs que se encuentran en heterocigosidad con la mutación de HTT, por lo que los investigadores se centraron en el análisis de las regiones adyacentes al exón 1 de HTT para identificar SNPs heterocigotos que pudieran ser aprovechados en el diseño de las moléculas de ARN guía para el protocolo de edición monoalélica. Después de poner a prueba diferentes ARN guía en células HEK293 diseñados en función de los sitios PAM preseleccionados, los investigadores seleccionaron la dupla más eficaz para el proceso de edición, poniéndola a prueba ahora en dos líneas de fibroblastos mutantes (las cuales presentaron heterocigosidad en alelos opuestos para uno de los SNPs considerados en la dupla de ARN guías), obteniendo una supresión de la expresión del producto (que para una línea era el alelo normal y para la otra el alelo mutante) al analizar los extractos mediante western blot. Finalmente, para evaluar la eficacia del proceso de edición en un modelo in vivo, los investigadores empaquetaron los elementos de edición en vectores recombinantes de virus adenoasociados, los cuales fueron inyectados en el hemisferio derecho de un modelo de ratón transgénico BacHD portador del alelo mutante humano HTT, dejando el hemisferio izquierdo sin inyectar para emplearlo como control negativo; después de 3 semanas los resultados de PCR mostraron la escisión del alelo mutante, lo que indujo una reducción de los niveles de ARNm de HTT en el hemisferio derecho. Estos resultados demuestran el potencial del sistema para la corrección alelo-específica del alelo mutante HTT de forma in vivo.

En 2019, Ekman y colaboradores aplicaron la tecnología CRISPR/Cas9 sustituyendo la nucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes* por la ortóloga Cas9 de *Staphylococcus aureus*, que al tener una secuencia más pequeña puede ser empaquetada junto a una secuencia de ARN guía único en un vector individual de virus adenoasociados (Tabla 6). En este estudio, los investigadores aplicaron el sistema de edición en un modelo de ratón R6/2 (el cual contiene el extremo 5' del gen HTT humano con una expansión patológica de CAG) mediante la inyección de vectores virales en el cuerpo estriado del ratón, los cuales transdujeron exitosamente las neuronas de este tejido. Los resultados de inmunohistoquímica mostraron que la interrupción in vivo del alelo mutante disminuyó las inclusiones neurotóxicas de huntingtina mutante; adicionalmente, el análisis del lisado del estriado completo mediante western blot

mostró que los ratones tratados con CRISPR/Cas9 redujeron casi a la mitad los niveles de huntingtina mutante en comparación con los animales control. Finalmente, al analizar los beneficios terapéuticos del proceso de edición, los investigadores encontraron que la disrupción in vivo del alelo mutante aumentaba de forma considerable la esperanza de vida de los ratones editados genéticamente, además de observar una mejora en ciertos déficits motores. Estos resultados demuestran el gran potencial del sistema para el desarrollo de nuevas intervenciones terapéuticas mediadas por la aplicación de esta tecnología.

Aplicaciones de la tecnología CRISPR/Cas9 con potencial terapéutico en la Enfermedad de Huntington					
Blanco molecular	Autores	Objetivo	Modelo empleado	Resultados	Contribución
Alelo mutante HTT	Shin et al., 2016	Inactivación específica del alelo mutante de forma in vitro	Fibroblastos	Reducción significativa de la expresión de huntingtina mutante	Potencial del sistema para corregir el genotipo patológico de la EH mediante un enfoque de edición alelo específico
	Monteys et al., 2017	Inactivación específica del alelo mutante de forma in vitro e in vivo	Fibroblastos y ratón transgénico BacHD		
	Ekman et al., 2019	Inactivación específica del alelo mutante de forma in vivo	Ratón R6/2		

Tabla 6. Aplicaciones de la tecnología CRISPR/Cas9 con potencial terapéutico en la Enfermedad de Huntington.

Líneas de investigación

En 2017, Xu y colaboradores reportaron la corrección del alelo mutante HTT en células madre pluripotentes inducidas derivadas de un paciente con EH mediante la aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9, modelo al que posteriormente se le eliminó el caset de selección del locus HTT editado aplicando la estrategia del transposón piggyBac, un elemento genético móvil capaz de transponerse entre vectores y cromosomas por medio de mecanismos de corte y pega (Zhao et al., 2016), generando así un control isogénico estable para aplicarse en estudios posteriores (Tabla 7). Al evaluar las neuronas del prosencéfalo diferenciadas a partir del modelo corregido, que resultaron ser excitables y sinápticamente activas, los investigadores observaron una reversión de diferentes anormalidades fenotípicas presentes en las neuronas diferenciadas de la línea no corregida derivada del paciente con EH, entre ellas el déficit en la respiración mitocondrial. Finalmente, al analizar la expresión general de todo el genoma, los investigadores encontraron una serie de posibles diferencias entre los niveles de expresión de las células derivadas del paciente con EH y las líneas celulares control sanas con las células derivadas del paciente y la línea corregida por CRISPR/Cas9, lo que sugiere que estas diferencias podrían deberse a los antecedentes genéticos propios del paciente, y no tanto al efecto patológico de la EH.

En 2020, Lopes y colaboradores presentaron los resultados de un trabajo de investigación orientado al estudio de anormalidades presentes a nivel mitocondrial y alteraciones en las vías metabólicas que contribuyen al proceso patológico de la EH, así como la influencia de la deleción de las repeticiones del triplete CAG del exón 1 de HTT en células madre pluripotentes inducidas derivadas de un paciente con EH corregidas por CRISPR/Cas9, aplicando un enfoque dual de ARN guía (Tabla 7). Al evaluar la morfología mitocondrial de las células del paciente con EH mediante microscopía electrónica de transmisión, los investigadores encontraron deficiencias estructurales marcadas al compararlas con las células control, entre ellas una disminución considerable del tamaño y una menor distribución; funcionalmente, tanto las células madre pluripotentes inducidas derivadas del paciente con EH como las células madre neurales diferenciadas presentaron desbalances importantes en la respiración mitocondrial y la presencia de especies reactivas de oxígeno mitocondriales en comparación con el fenotipo observado en las células madre pluripotentes inducidas derivadas del paciente con EH y las células madre neurales diferenciadas corregidas por CRISPR/Cas9.

En conjunto, estos resultados muestran la capacidad del sistema CRISPR/Cas9 para mejorar el fenotipo patológico de la EH que se manifiesta a nivel mitocondrial cuando se corrige la expansión patológica de CAG en el gen HTT.

Si bien los modelos de ratones han sido uno de los más explotados en el modelado de enfermedades humanas complejas gracias a ciertas ventajas técnicas, contribuyendo enormemente a la investigación de estas enfermedades, los modelos knock-in de ratón que expresan mutantes de forma endógena son incapaces de reproducir un proceso neurodegenerativo lo suficientemente marcado como para simular el fenotipo patológico característico de los pacientes con EH. En 2018, Yan y colaboradores (Yan et al., 2018b) establecieron el primer modelo knock-in de EH en animales superiores capaz de recapitular el fenotipo patológico característico de la EH mediante la expresión endógena de proteínas mutantes (Tabla 7). En este trabajo, los investigadores reemplazaron el exón 1 del gen HTT endógeno por el exón 1 del gen HTT humano portador de 150 repeticiones del triplete CAG mediante recombinación homóloga mediada por CRISPR/Cas9 en células de fibroblasto de cerdo fetal, haciendo uso del enfoque dual de ARN guía; posteriormente, los investigadores seleccionaron una de las clonas que albergaba el exón editado de forma heterocigota en el locus derecho del gen HTT de cerdo para realizar el proceso de transferencia nuclear somática que generaría finalmente el modelo knock-in de cerdo portador del exón 1 del alelo HTT humano con la expansión patológica de CAG. Una vez establecido el modelo, las hembras de la generación F0 fueron apareadas con machos portadores del genotipo salvaje para generar la descendencia F1, de la cual los machos fueron cruzados con hembras portadoras del genotipo salvaje para producir la generación F2; ambas descendencias fueron positivas al mutante de HTT, demostrando que el fenotipo asociado a esta mutación puede transmitirse a diferentes generaciones por la línea germinal. La secuenciación del genoma completo reveló la ausencia de ediciones fuera del sitio objetivo en la corteza cerebral de la generación F1, por lo que la investigación posterior se centró en la caracterización de las generaciones F0 y F1, encontrando que ambas generaciones compartían algunos rasgos fenotípicos, como problemas en la ganancia de peso corporal, una muerte temprana y dificultades tanto en el movimiento corporal como en los procesos de respiración; el hallazgo más importante de esta investigación fue que los cerebros de los cerdos knock-in mostraron una degeneración sumamente marcada y selectiva de las neuronas espinosas del medio estriado, imitando la neurodegeneración grave

y preferencial de las neuronas espinosas medianas característica de los pacientes con EH. El hecho de que los animales superiores como los cerdos presenten mayor cercanía filogenética con los seres humanos en comparación con otras especies de mamíferos pequeños fundamenta su aplicación en el modelado de enfermedades humanas, además de ciertas ventajas técnicas adicionales, como son la rápida maduración sexual de la descendencia y la generación de grandes camadas, características que en conjunto convierten a los cerdos como una de las especies de mayor utilidad para el establecimiento de modelos animales en la investigación de enfermedades humanas complejas, como son las enfermedades neurodegenerativas.

Contribuciones de la tecnología CRISPR/Cas9 en el desarrollo de líneas de investigación de la Enfermedad de Huntington					
Blanco molecular	Autores	Objetivo	Modelo empleado	Resultados	Contribución
Alelo mutante HTT	Xu et al., 2017	Generación de un control isogénico negativo del alelo mutante HTT	Células madre pluripotentes inducidas	Reversión del fenotipo patológico de la línea control al mejorar los procesos de respiración celular	Potencial del sistema para la generación de modelos que permitan abordar nuevas investigaciones de la EH
	Lopes et al., 2020	Corrección in vitro del alelo mutante HTT		Incremento del número, distribución y funcionamiento de las mitocondrias en el modelo corregido	
	Yan et al.,	Reproducción	Fibroblastos	Modelo knock-	

	2018	del fenotipo patológico de la EH en un modelo animal superior	porcinos	in de cerdo portador del exón 1 de HTT humano	
--	------	---	----------	---	--

Tabla 7. Contribuciones de la tecnología CRISPR/Cas9 en el desarrollo de líneas de investigación de la Enfermedad de Huntington.

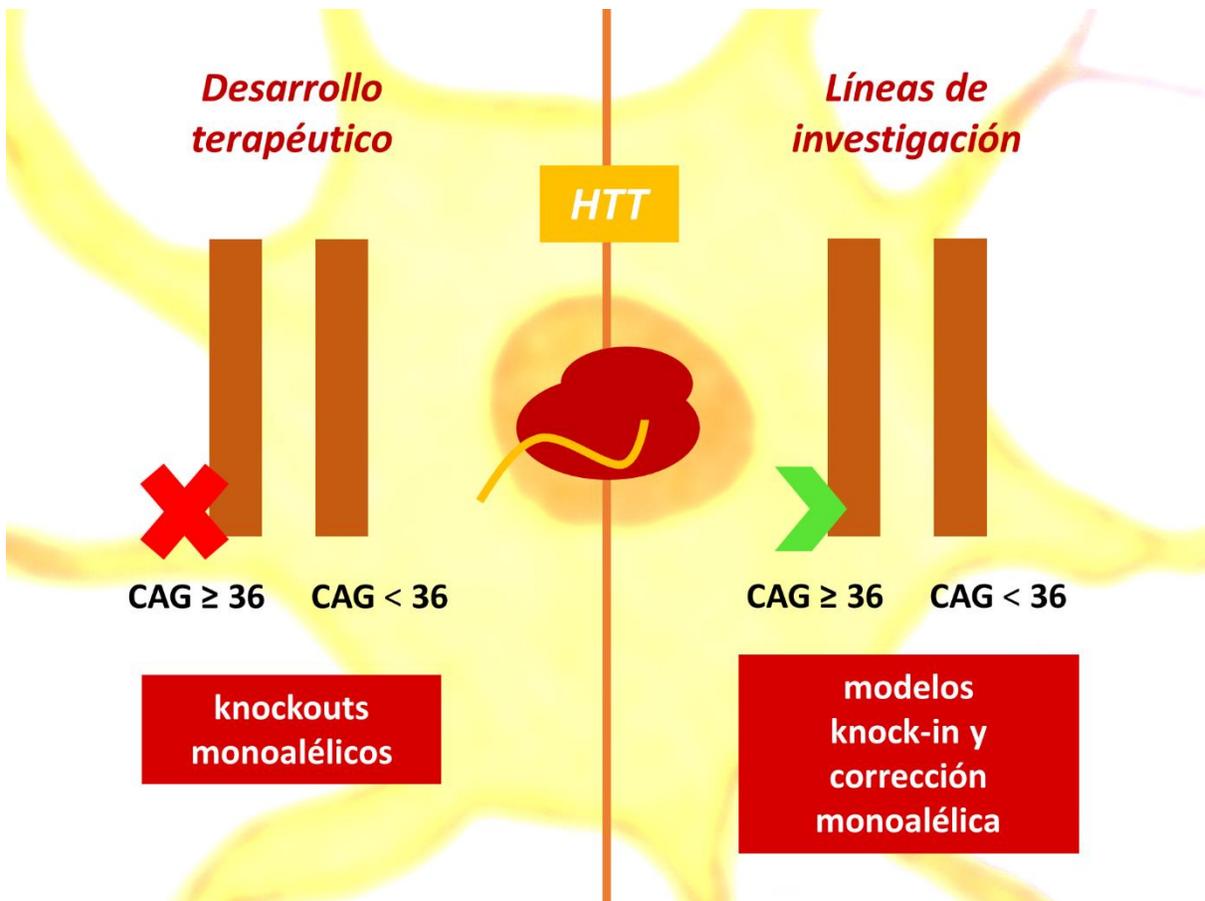


Figura 6. Áreas de aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 en la Enfermedad de Huntington. La terapia génica de la EH está orientada al establecimiento de knockouts monoalélicos en donde el número de repeticiones del triplete CAG sea mayor o igual a 36; por otro lado, los modelos actuales de investigación están dirigidos a generar líneas de corrección alélica y animales knock-in portadores del alelo mutante humano para estudiar el proceso fisiopatológico de esta enfermedad.

CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación muestra una serie de aplicaciones exitosas del sistema CRISPR/Cas9 en el campo de las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, tanto en materia de investigación como en desarrollo terapéutico no farmacológico. Los resultados analizados muestran la capacidad del sistema para la corrección de mutaciones implicadas en la patogénesis de estas enfermedades, lo que fundamentaría su potencial aplicación como terapia génica personalizada en un futuro no muy lejano; asimismo, la tecnología CRISPR/Cas9 resulta sumamente atractiva para la caracterización de genes potencialmente patogénicos o citoprotectores asociados a estas enfermedades, lo que enriquece el conocimiento que se tiene sobre la fisiopatología de estas enfermedades, además de contribuir al desarrollo de estrategias profilácticas de corrección de genotipos de riesgo genético, al desarrollo de modelos que permitan evaluar nuevos fármacos para el tratamiento sintomático, y a la caracterización de posibles biomarcadores tempranos que permitan un diagnóstico oportuno. En conjunto, todas las aplicaciones analizadas en el presente trabajo de investigación contribuyen al estudio de las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, y sus resultados muestran el potencial de esta tecnología para hacer frente a este importante problema de salud mundial.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, A. D. C., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (1996). Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nature medicine*, 2(7), 783-787.
- Alonso, A. D., Cohen, L. S., Corbo, C., Morozova, V., ElIdrissi, A., Phillips, G., & Kleiman, F. E. (2018). Hyperphosphorylation of tau associates with changes in its function beyond microtubule stability. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 338.
- Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., & Jinek, M. (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 513(7519), 569-573.
- Andreadis, A., Broderick, J. A., & Kosik, K. S. (1995). Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic acids research*, 23(17), 3585-3593.
- Ayodele, T., Rogaeva, E., Kurup, J. T., Beecham, G., & Reitz, C. (2021). Early-Onset Alzheimer's Disease: What Is Missing in Research? *Current neurology and neuroscience reports*, 21(2), 1-10.
- Bandres-Ciga, S., Diez-Fairen, M., Kim, J. J., & Singleton, A. B. (2020). Genetics of Parkinson's disease: an introspection of its journey towards precision medicine. *Neurobiology of disease*, 137, 104782.
- Barbuti, P., Antony, P., Santos, B., Massart, F., Cruciani, G., Dording, C., Arias, J., Schwamborn, J., & Krüger, R. (2020). Using High-Content Screening to Generate Single-Cell Gene-Corrected Patient-Derived iPS Clones Reveals Excess Alpha-Synuclein with Familial Parkinson's Disease Point Mutation A30P. *Cells*, 9(9), 2065. <https://doi.org/10.3390/cells9092065>.
- Bateman, R. J., West, T., Yarasheski, K., Patterson, B. W., Lucey, B., Cirrito, J. R., ... & Paumier, K. (2019). Stable Isotope Labeling Kinetics in CNS Translational Medicine: Introduction to SILK Technology. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 29, 173-190.

Bates G. (2003). Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *Lancet (London, England)*, 361(9369), 1642–1644. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13304-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13304-1).

Bates, G. P., Dorsey, R., Gusella, J. F., Hayden, M. R., Kay, C., Leavitt, B. R., ... & Tabrizi, S. J. (2015). Huntington disease. *Nature reviews Disease primers*, 1(1), 1-21.

Bayer, T. A., Cappai, R., Masters, C. L., Beyreuther, K., & Multhaup, G. (1999). It all sticks together—the APP-related family of proteins and Alzheimer's disease. *Molecular psychiatry*, 4(6), 524-528.

Beckett, C., Nalivaeva, N. N., Belyaev, N. D., & Turner, A. J. (2012). Nuclear signalling by membrane protein intracellular domains: the AICD enigma. *Cellular signalling*, 24(2), 402-409.

Bekris, L. M., Yu, C. E., Bird, T. D., & Tsuang, D. (2011). The Genetics of Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Neurochemical Mechanisms in Disease*, 695-755.

Bergström, P., Agholme, L., Nazir, F. H., Satir, T. M., Toombs, J., Wellington, H., ... & Zetterberg, H. (2016). Amyloid precursor protein expression and processing are differentially regulated during cortical neuron differentiation. *Scientific reports*, 6(1), 1-14.

Bernal-Conde, L. D., Ramos-Acevedo, R., Reyes-Hernández, M. A., Balbuena-Olvera, A. J., Morales-Moreno, I. D., Argüero-Sánchez, R., ... & Guerra-Crespo, M. (2020). Alpha-synuclein physiology and pathology: A perspective on cellular structures and organelles. *Frontiers in neuroscience*, 13, 1399.

Bertram, L., & Tanzi, R. E. (2005). The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *The Journal of clinical investigation*, 115(6), 1449-1457.

Bharadwaj, P. R., Dubey, A. K., Masters, C. L., Martins, R. N., & Macreadie, I. G. (2009). Aβ aggregation and possible implications in Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(3), 412–421. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00609.x>.

Billingsley, K. J., Bandres-Ciga, S., Saez-Atienzar, S., & Singleton, A. B. (2018). Genetic risk factors in Parkinson's disease. *Cell and tissue research*, 373(1), 9-20.

Bitinaite, J., Wah, D. A., Aggarwal, A. K., & Schildkraut, I. (1998). FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proceedings of the national academy of sciences*, 95(18), 10570-10575.

Bloom, G. S. (2014). Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA neurology*, 71(4), 505-508.

Bondy-Denomy, J., & Davidson, A. R. (2014). To acquire or resist: the complex biological effects of CRISPR–Cas systems. *Trends in microbiology*, 22(4), 218-225.

Brazelton, V. A., Jr, Zarecor, S., Wright, D. A., Wang, Y., Liu, J., Chen, K., Yang, B., & Lawrence-Dill, C. J. (2015). A quick guide to CRISPR sgRNA design tools. *GM crops & food*, 6(4), 266–276. <https://doi.org/10.1080/21645698.2015.1137690>.

Brejyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(24), 5789. <https://doi.org/10.3390/molecules25245789>.

Brouns, S. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J., Snijders, A. P., ... & Van Der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 321(5891), 960-964.

Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L., & Wong, P. C. (2001). BACE1 is the major β -secretase for generation of A β peptides by neurons. *Nature neuroscience*, 4(3), 233-234.

Cai, Y., An, S. S., & Kim, S. (2015). Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders. *Clinical interventions in aging*, 10, 1163–1172. <https://doi.org/10.2147/CIA.S85808>.

Campdelacreu, J. (2014). Parkinson's disease and Alzheimer disease: environmental risk factors. *Neurología (English Edition)*, 29(9), 541-549.

Cano-Gamez, E., & Trynka, G. (2020). From GWAS to function: using functional genomics to identify the mechanisms underlying complex diseases. *Frontiers in Genetics*, 11, 424.

Cao, Q., Tan, C. C., Xu, W., Hu, H., Cao, X. P., Dong, Q., ... & Yu, J. T. (2020). The prevalence of dementia: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Alzheimer's Disease*, 73(3), 1157-1166.

Capouch, S. D., Farlow, M. R., & Brosch, J. R. (2018). A Review of Dementia with Lewy Bodies' Impact, Diagnostic Criteria and Treatment. *Neurology and therapy*, 7(2), 249–263. <https://doi.org/10.1007/s40120-018-0104-1>.

Chaudhuri, K. R., & Schapira, A. H. (2009). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *The Lancet Neurology*, 8(5), 464-474.

Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., & Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox biology*, 14, 450-464.

Chen, M., & Wolynes, P. G. (2017). Aggregation landscapes of Huntingtin exon 1 protein fragments and the critical repeat length for the onset of Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(17), 4406–4411. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702237114>.

Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., ... Selkoe, D. J. (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nature medicine*, 3(1), 67–72. <https://doi.org/10.1038/nm0197-67>.

Clarke C. E. (2007). Parkinson's disease. *BMJ (Clinical research ed.)*, 335(7617), 441–445. <https://doi.org/10.1136/bmj.39289.437454.AD>.

Conway, K. A., Harper, J. D., & Lansbury, P. T. (1998). Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nature medicine*, 4(11), 1318–1320. <https://doi.org/10.1038/3311>.

Corder, E. H., Saunders, A. M., Risch, N. J., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Jr, Rimmler, J. B., Locke, P. A., Conneally, P. M., & Schmechel, K. E. (1994). Protective

effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature genetics*, 7(2), 180–184. <https://doi.org/10.1038/ng0694-180>.

Cota-Coronado, A., Díaz-Martínez, N. F., Padilla-Camberos, E., & Díaz-Martínez, N. E. (2019). Editing the Central Nervous System Through CRISPR/Cas9 Systems. *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, 110. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00110>.

Cuny, G. D. (2012). Neurodegenerative diseases: challenges and opportunities. *Future Medicinal Chemistry*, 4(13), 1647-1649.

Dächsel, J. C., & Farrer, M. J. (2010). LRRK2 and Parkinson disease. *Archives of neurology*, 67(5), 542-547.

Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., Lane, S., Finn, M. B., ... & Zlokovic, B. V. (2008). apoE isoform-specific disruption of amyloid β peptide clearance from mouse brain. *The Journal of clinical investigation*, 118(12), 4002-4013.

Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., ... & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602-607.

DeTure, M. A., & Dickson, D. W. (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*, 14(1), 1-18.

Doetschman, T., Gregg, R. G., Maeda, N., Hooper, M. L., Melton, D. W., Thompson, S., & Smithies, O. (1987). Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 330(6148), 576–578. <https://doi.org/10.1038/330576a0>.

dos Santos, P., Leide, C., Ozela, P. F., de Fatima de Brito Brito, M., Pinheiro, A. A., Padilha, E. C., ... & Rosa, J. (2018). Alzheimer's disease: a review from the pathophysiology to diagnosis, new perspectives for pharmacological treatment. *Current medicinal chemistry*, 25(26), 3141-3159.

Drolet, R. E., Sanders, J. M., & Kern, J. T. (2011). Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) cellular biology: a review of recent advances in identifying physiological substrates and cellular functions. *Journal of neurogenetics*, 25(4), 140-151.

Dugger, B. N., & Dickson, D. W. (2017). Pathology of Neurodegenerative Diseases. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 9(7), a028035. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028035>.

Edson, A. J., Hushagen, H. A., Frøyset, A. K., Elda, I., Khan, E. A., Di Stefano, A., & Fladmark, K. E. (2019). Dysregulation in the Brain Protein Profile of Zebrafish Lacking the Parkinson's Disease-Related Protein DJ-1. *Molecular neurobiology*, 56(12), 8306–8322. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01667-w>.

Ekman, F. K., Ojala, D. S., Adil, M. M., Lopez, P. A., Schaffer, D. V., & Gaj, T. (2019). CRISPR-Cas9-mediated genome editing increases lifespan and improves motor deficits in a Huntington's disease mouse model. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 17, 829-839.

Emamzadeh F. N. (2016). Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 21, 29. <https://doi.org/10.4103/1735-1995.181989>.

Erkinen, M. G., Kim, M. O., & Geschwind, M. D. (2018). Clinical neurology and epidemiology of the major neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(4), a033118.

Felson, S. (31 de julio de 2020). Types of Alzheimer's Disease. WebMD. Recuperado el 16 de agosto de 2021 de <https://www.webmd.com/alzheimers/guide/alzheimers-types>.

Ferreiro, E., Oliveira, C. R., & Pereira, C. M. (2008). The release of calcium from the endoplasmic reticulum induced by amyloid-beta and prion peptides activates the mitochondrial apoptotic pathway. *Neurobiology of disease*, 30(3), 331-342.

Gaj, T., Sirk, S. J., Shui, S. L., & Liu, J. (2016). Genome-Editing Technologies: Principles and Applications. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(12), a023754. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023754>.

Gandy, S. (2005). The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer disease. *The Journal of clinical investigation*, 115(5), 1121-1129.

Garneau, J. E., Dupuis, M. È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., ... & Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320), 67-71.

Gegg, M. E., & Schapira, A. H. (2018). The role of glucocerebrosidase in Parkinson disease pathogenesis. *The FEBS journal*, 285(19), 3591-3603.

Gitler, A. D., Dhillon, P., & Shorter, J. (2017). Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. *Disease models & mechanisms*, 10(5), 499–502. <https://doi.org/10.1242/dmm.030205>.

Gleditzsch, D., Pausch, P., Müller-Esparza, H., Özcan, A., Guo, X., Bange, G., & Randau, L. (2019). PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes: diversified mechanisms and structures. *RNA biology*, 16(4), 504-517.

Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., & James, L. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349(6311), 704–706. <https://doi.org/10.1038/349704a0>.

Gómez-Garre, P., Carrillo, F., & Mir, P. (2010). Prevalence and clinical features of LRRK2 mutations in patients with Parkinson disease. *The European Neurological Journal*, 2(2), 1.

Gupta, A., & Dawson, T. M. (2010). Pathogenesis of Parkinson's Disease. In *Blue Books of Neurology* (Vol. 34, pp. 155-169). Butterworth-Heinemann.

Gupta, R. M., & Musunuru, K. (2014). Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *The Journal of clinical investigation*, 124(10), 4154-4161.

Gyorgy, B., Ingelsson, M., Loov, C., Takeda, S., Lannfelt, L., Hyman, B. T., & Breakefield, X. O. (2016). 567. CRISPR-Cas9 Mediated Gene Editing in a Monogenic Form of Alzheimer's Disease. *Molecular Therapy*, 24, S226-S227.

György, B., Lööv, C., Zaborowski, M. P., Takeda, S., Kleinstiver, B. P., Commins, C., Kastanenka, K., Mu, D., Volak, A., Giedraitis, V., Lannfelt, L., Maguire, C. A., Joung, J. K., Hyman, B. T., Breakefield, X. O., & Ingelsson, M. (2018). CRISPR/Cas9 Mediated Disruption of the Swedish APP Allele as a Therapeutic Approach for Early-Onset Alzheimer's

Disease. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 11, 429–440. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.03.007>.

Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F., & Nelson, K. E. (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol*, 1(6), e60.

Han, W., Ji, T., Mei, B., & Su, J. (2011). Peptide p3 may play a neuroprotective role in the brain. *Medical hypotheses*, 76(4), 543–546. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2010.12.013>.

Hanss, Z., Boussaad, I., Jarazo, J., Schwamborn, J. C., & Krüger, R. (2020). Quality Control Strategy for CRISPR-Cas9-Based Gene Editing Complicated by a Pseudogene. *Frontiers in genetics*, 10, 1297.

Hashimoto, M., Takenouchi, T., Mallory, M., Masliah, E., & Takeda, A. (2000). The role of NAC in amyloidogenesis in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*, 156(2), 734–736. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64777-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64777-3).

He, Y., Wang, M., Liu, M., Huang, L., Liu, C., Zhang, X., Yi, H., Cheng, A., Zhu, D., Yang, Q., Wu, Y., Zhao, X., Chen, S., Jia, R., Zhang, S., Liu, Y., Yu, Y., & Zhang, L. (2018). Cas1 and Cas2 From the Type II-C CRISPR-Cas System of *Riemerella anatipestifer* Are Required for Spacer Acquisition. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 195. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00195>.

Hermans, P. W., Van Soolingen, D., Bik, E. M., De Haas, P. E., Dale, J. W., & Van Embden, J. D. (1991). Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infection and immunity*, 59(8), 2695-2705.

Hernández, D., Schlicht, S. M., Daniszewski, M., Karch, C. M., Goate, A. M., Pébay, A., & Dominantly Inherited Alzheimer Network. (2021). Generation of a gene-corrected human isogenic iPSC line from an Alzheimer's disease iPSC line carrying the London mutation in APP (V717I). *Stem Cell Research*, 53, 102373.

Hernandez, F., & Avila, J. (2007). Tauopathies. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(17), 2219-2233.

- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S. G., Croteau, D. L., & Bohr, V. A. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*, 15(10), 565-581.
- Hsu, M. J., Sheu, J. R., Lin, C. H., Shen, M. Y., & Hsu, C. Y. (2010). Mitochondrial mechanisms in amyloid beta peptide-induced cerebrovascular degeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1800(3), 290-296.
- Huang, W. J., Chen, W. W., & Zhang, X. (2016). Huntington's disease: Molecular basis of pathology and status of current therapeutic approaches. *Experimental and therapeutic medicine*, 12(4), 1951-1956.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, 169(12), 5429-5433.
- Ishizu, N., Yui, D., Hebisawa, A., Aizawa, H., Cui, W., Fujita, Y., ... & Watase, K. (2016). Impaired striatal dopamine release in homozygous *Vps35* D620N knock-in mice. *Human molecular genetics*, 25(20), 4507-4517.
- Iwai, A., Yoshimoto, M., Masliah, E., & Saitoh, T. (1995). Non-A. beta. Component of Alzheimer's disease amyloid (NAC) is amyloidogenic. *Biochemistry*, 34(32), 10139-10145.
- Jansen, R., Embden, J. D. V., Gastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 43(6), 1565-1575.
- Jiang, T., Yu, J. T., Tian, Y., & Tan, L. (2013). Epidemiology and etiology of Alzheimer's disease: from genetic to non-genetic factors. *Current Alzheimer Research*, 10(8), 852-867.
- Jiang, Z., Huang, Y., Zhang, P., Han, C., Lu, Y., Mo, Z., ... & Ling, F. (2020). Characterization of a pathogenic variant in *GBA* for Parkinson's disease with mild cognitive impairment patients. *Molecular brain*, 13(1), 1-10.

- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science*, 337(6096), 816-821.
- Kahle, P. J., Waak, J., & Gasser, T. (2009). DJ-1 and prevention of oxidative stress in Parkinson's disease and other age-related disorders. *Free radical biology & medicine*, 47(10), 1354–1361. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.003>.
- Kandavelou, K., Ramalingam, S., London, V., Mani, M., Wu, J., Alexeev, V., ... & Chandrasegaran, S. (2009). Targeted manipulation of mammalian genomes using designed zinc finger nucleases. *Biochemical and biophysical research communications*, 388(1), 56-61.
- Karch, C. M., Hernández, D., Wang, J. C., Marsh, J., Hewitt, A. W., Hsu, S., ... & Goate, A. M. (2018). Human fibroblast and stem cell resource from the Dominantly Inherited Alzheimer Network. *Alzheimer's research & therapy*, 10(1), 1-11.
- Kiaei M. (2013). New hopes and challenges for treatment of neurodegenerative disorders: great opportunities for young neuroscientists. *Basic and clinical neuroscience*, 4(1), 3–4.
- Kim, H., & Kim, J. S. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 15(5), 321-334.
- Kim, J., Basak, J. M., & Holtzman, D. M. (2009). The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, 63(3), 287-303.
- Kirkwood, S. C., Su, J. L., Conneally, P. M., & Foroud, T. (2001). Progression of symptoms in the early and middle stages of Huntington disease. *Archives of neurology*, 58(2), 273-278.
- Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G. (2019). Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and molecular neurobiology*, 39(1), 31–59. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3>.
- Knopman, D. S., Amieva, H., Petersen, R. C., Chételat, G., Holtzman, D. M., Hyman, B. T., ... & Jones, D. T. (2021). Alzheimer disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 1-21.

Koedam, E. L., Lauffer, V., van der Vlies, A. E., van der Flier, W. M., Scheltens, P., & Pijnenburg, Y. A. (2010). Early-versus late-onset Alzheimer's disease: more than age alone. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19(4), 1401-1408.

Kolay, S., & Diamond, M. I. (2020). Alzheimer's disease risk modifier genes do not affect tau aggregate uptake, seeding or maintenance in cell models. *FEBS Open bio*, 10(9), 1912-1920.

Kolli, N., Lu, M., Maiti, P., Rossignol, J., & Dunbar, G. L. (2018). Application of the gene editing tool, CRISPR-Cas9, for treating neurodegenerative diseases. *Neurochemistry International*, 112, 187-196.

Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A., & Liu, D. R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533(7603), 420–424. <https://doi.org/10.1038/nature17946>.

Kosicki, M., Tomberg, K., & Bradley, A. (2018). Repair of double-strand breaks induced by CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nature biotechnology*, 36(8), 765-771.

Kovacs G. G. (2016). Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning towards Precision Medicine. *International journal of molecular sciences*, 17(2), 189. <https://doi.org/10.3390/ijms17020189>.

Krishnaswamy, S., Verdile, G., Groth, D., Kanyenda, L., & Martins, R. N. (2009). The structure and function of Alzheimer's gamma secretase enzyme complex. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 46(5-6), 282–301. <https://doi.org/10.3109/10408360903335821>.

Lalonde, S., Stone, O. A., Lessard, S., Lavertu, A., Desjardins, J., Beaudoin, M., ... & Lettre, G. (2017). Frameshift indels introduced by genome editing can lead to in-frame exon skipping. *PloS one*, 12(6), e0178700.

Lannfelt, L., Viitanen, M., Johansson, K., Axelman, K., Lilius, L., Almqvist, E., & Winblad, B. (1993). Low frequency of the APP 670/671 mutation in familial Alzheimer's disease in Sweden. *Neuroscience letters*, 153(1), 85–87. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90083-w](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90083-w).

Lanoiselée, H. M., Nicolas, G., Wallon, D., Rovelet-Lecrux, A., Lacour, M., Rousseau, S., Richard, A. C., Pasquier, F., Rollin-Sillaire, A., Martinaud, O., Quillard-Muraine, M., de la

Sayette, V., Boutoleau-Brettonniere, C., Etcharry-Bouyx, F., Chauviré, V., Sarazin, M., le Ber, I., Epelbaum, S., Jonveaux, T., Rouaud, O., ... collaborators of the CNR-MAJ project (2017). APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS medicine*, 14(3), e1002270. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002270>.

Lashuel, H. A., Petre, B. M., Wall, J., Simon, M., Nowak, R. J., Walz, T., & Lansbury, P. T., Jr (2002). Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *Journal of molecular biology*, 322(5), 1089–1102. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)00735-0](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)00735-0).

Lesage, S., & Brice, A. (2009). Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Human molecular genetics*, 18(R1), R48-R59.

Lessard, C. B., Rodriguez, E., Ladd, T. B., Minter, L. M., Osborne, B. A., Miele, L., ... & Ran, Y. (2019). Individual and combined presenilin 1 and 2 knockouts reveal that both have highly overlapping functions in HEK293T cells. *Journal of Biological Chemistry*, 294(29), 11276-11285.

Li, S. H., & Li, X. J. (2004). Huntingtin–protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *TRENDS in Genetics*, 20(3), 146-154.

Li, W. W., Cai, D. F., & Ren, H. M. (2006). Sheng li ke xue jin zhan [Progress in physiology], 37(2), 97–102.

Lin, Y. T., Seo, J., Gao, F., Feldman, H. M., Wen, H. L., Penney, J., ... & Tsai, L. H. (2018). APOE4 causes widespread molecular and cellular alterations associated with Alzheimer's disease phenotypes in human iPSC-derived brain cell types. *Neuron*, 98(6), 1141-1154.

Liu, J., Liu, W., Li, R., & Yang, H. (2019). Mitophagy in Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Treatment. *Cells*, 8(7), 712. <https://doi.org/10.3390/cells8070712>.

Liu, Z., Dong, H., Cui, Y., Cong, L., & Zhang, D. (2020). Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1-14.

Lopes, C., Tang, Y., Anjo, S. I., Manadas, B., Onofre, I., De Almeida, L. P., ... & Rego, A. C. C. (2020). Mitochondrial and redox modifications in huntington disease induced pluripotent

stem cells rescued by CRISPR/Cas9 CAGs targeting. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 967.

Lozano, A. M., Lipsman, N., Bergman, H., Brown, P., Chabardes, S., Chang, J. W., ... & Temel, Y. (2019). Deep brain stimulation: current challenges and future directions. *Nature Reviews Neurology*, 15(3), 148-160.

Ma, K. Y., Fokkens, M. R., Reggiori, F., Mari, M., & Verbeek, D. S. (2021). Parkinson's disease-associated VPS35 mutant reduces mitochondrial membrane potential and impairs PINK1/Parkin-mediated mitophagy. *Translational neurodegeneration*, 10(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s40035-021-00243-4>.

MacDonald, M. E., Ambrose, C. M., Duyao, M. P., Myers, R. H., Lin, C., Srinidhi, L., ... & MacFarlane, H. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72(6), 971-983.

Mahley R. W. (2016). Central Nervous System Lipoproteins: ApoE and Regulation of Cholesterol Metabolism. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 36(7), 1305–1315. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307023>

Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., ... & Horvath, P. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 13(11), 722-736.

Marino, B., de Souza, L. R., Sousa, K., Ferreira, J. V., Padilha, E. C., da Silva, C., Taft, C. A., & Hage-Melim, L. (2020). Parkinson's Disease: A Review from Pathophysiology to Treatment. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 20(9), 754–767. <https://doi.org/10.2174/1389557519666191104110908>.

Martin, L., Latypova, X., & Terro, F. (2011). Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*, 58(4), 458-471.

Martínez-Arias, R., Comas, D., Mateu, E., & Bertranpetit, J. (2001). Glucocerebrosidase pseudogene variation and Gaucher disease: recognizing pseudogene tracts in GBA alleles. *Human mutation*, 17(3), 191-198.

- Mazza, M. C., Beilina, A., Roosen, D. A., Hauser, D., & Cookson, M. R. (2021). Generation of iPSC line from a Parkinson patient with PARK7 mutation and CRISPR-edited Gibco Human Episomal iPSC line to mimic PARK7 mutation. *Stem Cell Research*, 102506.
- McColgan, P., & Tabrizi, S. J. (2018). Huntington's disease: a clinical review. *European journal of neurology*, 25(1), 24-34.
- McKeith, I. G., & Mosimann, U. P. (2004). Dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, 10, S15-S18.
- Mendez, M. F. (2017). Early-onset Alzheimer disease. *Neurologic clinics*, 35(2), 263-281.
- Mir, A., Edraki, A., Lee, J., & Sontheimer, E. J. (2018). Type II-C CRISPR-Cas9 biology, mechanism, and application. *ACS chemical biology*, 13(2), 357-365.
- Mojica, F. J., Juez, G., & Rodriguez-Valera, F. (1993). Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular microbiology*, 9(3), 613-621.
- Monteys, A. M., Ebanks, S. A., Keiser, M. S., & Davidson, B. L. (2017). CRISPR/Cas9 editing of the mutant huntingtin allele in vitro and in vivo. *Molecular Therapy*, 25(1), 12-23.
- Müller, U. C., & Zheng, H. (2012). Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(2), a006288. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006288>.
- Murphy, M. P., & LeVine, H., 3rd (2010). Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 19(1), 311–323. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1221>.
- Murray, S. J., Black, B. L., Reid, S. J., Rudiger, S. R., Bawden, C. S., Snell, R. G., ... & Faull, R. L. (2019). Chemical neuroanatomy of the substantia nigra in the ovine brain. *Journal of chemical neuroanatomy*, 97, 43-56.
- Nakata, A. T. S. U. O., Amemura, M. I. T. S. U. K. O., & Makino, K. O. Z. O. (1989). Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Journal of bacteriology*, 171(6), 3553-3556.

Neumann, J., Bras, J., Deas, E., O'Sullivan, S. S., Parkkinen, L., Lachmann, R. H., Li, A., Holton, J., Guerreiro, R., Paudel, R., Segarane, B., Singleton, A., Lees, A., Hardy, J., Houlden, H., Revesz, T., & Wood, N. W. (2009). Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain: a journal of neurology*, 132(Pt 7), 1783–1794. <https://doi.org/10.1093/brain/awp044>.

Neve, R. L., Harris, P., Kosik, K. S., Kurnit, D. M., & Donlon, T. A. (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain research*, 387(3), 271–280. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(86\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0169-328x(86)90033-1),

Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., ... & Nureki, O. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156(5), 935-949.

Núñez, J. K., Kranzusch, P. J., Noeske, J., Wright, A. V., Davies, C. W., & Doudna, J. A. (2014). Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature structural & molecular biology*, 21(6), 528–534. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2820>.

O'Regan, G., deSouza, R. M., Balestrino, R., & Schapira, A. H. (2017). Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson Disease. *Journal of Parkinson's disease*, 7(3), 411–422. <https://doi.org/10.3233/JPD-171092>.

Ortiz-Virumbrales, M., Moreno, C. L., Kruglikov, I., Marazuela, P., Sproul, A., Jacob, S., ... & Gandy, S. (2017). CRISPR/Cas9-Correctable mutation-related molecular and physiological phenotypes in iPSC-derived Alzheimer's PSEN2 N141I neurons. *Acta neuropathologica communications*, 5(1), 1-20.

Outeiro, T. F., Koss, D. J., Erskine, D., Walker, L., Kurzawa-Akanbi, M., Burn, D., ... & McKeith, I. (2019). Dementia with Lewy bodies: an update and outlook. *Molecular neurodegeneration*, 14(1), 1-18.

Park, H., Oh, J., Shim, G., Cho, B., Chang, Y., Kim, S., ... & Kim, J. (2019). In vivo neuronal gene editing via CRISPR–Cas9 amphiphilic nanocomplexes alleviates deficits in mouse models of Alzheimer's disease. *Nature neuroscience*, 22(4), 524-528.

Pérez, M. E. T. (2017). Efectos diferenciales de las isoformas de la apolipoproteína E en la funcionalidad del adipocito, en la homeostasis energética y en las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad (Doctoral dissertation, Universidad de Zaragoza).

Perni, M., van der Goot, A., Limbocker, R., van Ham, T. J., Aprile, F. A., Xu, C. K., ... & Dobson, C. M. (2021). Comparative Studies in the A30P and A53T α -Synuclein *C. elegans* Strains to Investigate the Molecular Origins of Parkinson's Disease. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 492.

Pimenova, A. A., & Goate, A. M. (2020). Novel presenilin 1 and 2 double knock-out cell line for in vitro validation of PSEN1 and PSEN2 mutations. *Neurobiology of disease*, 138, 104785.

Poon, A., Schmid, B., Pires, C., Nielsen, T. T., Hjermind, L. E., Nielsen, J. E., ... & Freude, K. K. (2016). Generation of a gene-corrected isogenic control hiPSC line derived from a familial Alzheimer's disease patient carrying a L150P mutation in presenilin 1. *Stem cell research*, 17(3), 466-469.

Portelius, E., Gustavsson, M. K., Zetterberg, H., Andreasson, U., & Blennow, K. (2012). Evaluation of the performance of novel A β isoforms as theragnostic markers in Alzheimer's disease: from the cell to the patient. *Neurodegenerative Diseases*, 10(1-4), 138-140.

Pourcel, C., Salvignol, G., & Vergnaud, G. (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 151(3), 653-663.

Pringsheim, T., Wiltshire, K., Day, L., Dykeman, J., Steeves, T., & Jette, N. (2012). The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders*, 27(9), 1083-1091.

Rabinowitz, R., Kadair, A., Ben-Zur, T., Michaelson, D., & Offen, D. (2019). ApoE4 allele specific knockout using a synthetic Cas9 variant as a potential gene therapy approach for Alzheimer's disease. *Cytherapy*, 21(5), e7.

Rahman, A. A., & Morrison, B. E. (2019). Contributions of VPS35 mutations to Parkinson's disease. *Neuroscience*, 401, 1-10.

Rahman, S., Datta, M., Kim, J., & Jan, A. T. (2019, December). CRISPR/Cas: An intriguing genomic editing tool with prospects in treating neurodegenerative diseases. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 96, pp. 22-31). Academic Press.

Ramalingam, S., Annaluru, N., Kandavelou, K., & Chandrasegaran, S. (2014). TALEN-mediated generation and genetic correction of disease-specific human induced pluripotent stem cells. *Current gene therapy*, 14(6), 461-472.

Ramalingam, S., London, V., Kandavelou, K., Cebotaru, L., Guggino, W., Civin, C., & Chandrasegaran, S. (2013). Generation and genetic engineering of human induced pluripotent stem cells using designed zinc finger nucleases. *Stem cells and development*, 22(4), 595-610.

Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., & Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117, 119-128.

Reed, X., Bandrés-Ciga, S., Blauwendraat, C., & Cookson, M. R. (2019). The role of monogenic genes in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 124, 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.11.012>.

Ren, C., Ding, Y., Wei, S., Guan, L., Zhang, C., Ji, Y., ... & Yin, P. (2019). G2019S Variation in LRRK2: An Ideal Model for the Study of Parkinson's Disease? *Frontiers in human neuroscience*, 13, 306.

Sakuma, T., & Yamamoto, T. (2017). Magic wands of CRISPR—Lots of choices for gene knock-in. *Cell biology and toxicology*, 33(6), 501-505.

Sansbury, B. M., Hewes, A. M., & Kmiec, E. B. (2019). Understanding the diversity of genetic outcomes from CRISPR-Cas generated homology-directed repair. *Communications biology*, 2(1), 1-10.

Satake, W., Nakabayashi, Y., Mizuta, I., Hirota, Y., Ito, C., Kubo, M., Kawaguchi, T., Tsunoda, T., Watanabe, M., Takeda, A., Tomiyama, H., Nakashima, K., Hasegawa, K., Obata, F., Yoshikawa, T., Kawakami, H., Sakoda, S., Yamamoto, M., Hattori, N., Murata, M., ... Toda, T. (2009). Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nature genetics*, 41(12), 1303–1307. <https://doi.org/10.1038/ng.485>.

- Saudou, F., & Humbert, S. (2016). The biology of huntingtin. *Neuron*, 89(5), 910-926.
- Scherer, S., & Davis, R. W. (1979). Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 4951-4955.
- Seaman M. N. (2012). The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond. *Journal of cell science*, 125(Pt 20), 4693–4702. <https://doi.org/10.1242/jcs.103440>.
- Selkoe D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological reviews*, 81(2), 741–766. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.741>.
- Sergeant, N., Delacourte, A., & Buée, L. (2005). Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1739(2-3), 179-197.
- Sharma, K. (2019). Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics. *Molecular medicine reports*, 20(2), 1479-1487.
- Shen, L., & Jia, J. (2016). An Overview of Genome-Wide Association Studies in Alzheimer's Disease. *Neuroscience bulletin*, 32(2), 183–190. <https://doi.org/10.1007/s12264-016-0011-3>.
- Sheng, B., Gong, K., Niu, Y., Liu, L., Yan, Y., Lu, G., Zhang, L., Hu, M., Zhao, N., Zhang, X., Tang, P., & Gong, Y. (2009). Inhibition of gamma-secretase activity reduces Abeta production, reduces oxidative stress, increases mitochondrial activity and leads to reduced vulnerability to apoptosis: Implications for the treatment of Alzheimer's disease. *Free radical biology & medicine*, 46(10), 1362–1375. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.018>.
- Shibata, A., & Jeggo, P. A. (2020). Roles for 53BP1 in the repair of radiation-induced DNA double strand breaks. *DNA repair*, 93, 102915. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102915>.
- Shin, J. W., & Lee, J. M. (2018). The prospects of CRISPR-based genome engineering in the treatment of neurodegenerative disorders. *Therapeutic advances in neurological disorders*, 11, 1756285617741837.

- Shin, J. W., Kim, K. H., Chao, M. J., Atwal, R. S., Gillis, T., MacDonald, M. E., ... & Lee, J. M. (2016). Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. *Human molecular genetics*, 25(20), 4566-4576.
- Shmakov, S., Abudayyeh, O. O., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Gootenberg, J. S., Semenova, E., ... & Zhang, F. (2015). Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. *Molecular cell*, 60(3), 385-397.
- Shmakov, S., Smargon, A., Scott, D., Cox, D., Pyzocha, N., Yan, W., ... & Koonin, E. V. (2017). Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nature reviews microbiology*, 15(3), 169-182.
- Siddiqui, I. J., Pervaiz, N., & Abbasi, A. A. (2016). The Parkinson Disease gene SNCA: Evolutionary and structural insights with pathological implication. *Scientific reports*, 6, 24475. <https://doi.org/10.1038/srep24475>.
- Sidransky, E., & Lopez, G. (2012). The link between the GBA gene and parkinsonism. *The Lancet. Neurology*, 11(11), 986-998. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70190-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70190-4).
- Simon, D. K., Tanner, C. M., & Brundin, P. (2020). Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics, and pathophysiology. *Clinics in geriatric medicine*, 36(1), 1-12.
- Simon-Sanchez, J., Schulte, C., Bras, J. M., Sharma, M., Gibbs, J. R., Berg, D., ... & Gasser, T. (2009). Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nature genetics*, 41(12), 1308-1312.
- Skrabana, R., Skrabanova, M., Csokova, N., Sevcik, J., & Novak, M. (2006). Intrinsically disordered tau protein in Alzheimer's tangles: a coincidence or a rule? *Bratislavske lekarske listy*, 107(9-10), 354-358.
- Smith, H. O., & Wilcox, K. W. (1970). A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*: I. Purification and general properties. *Journal of molecular biology*, 51(2), 379-391.
- Soto, C., & Pritzkow, S. (2018). Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nature neuroscience*, 21(10), 1332-1340.

Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M., & Goedert, M. (1998). α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 6469-6473.

Stefanis L. (2012). α -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(2), a009399. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>.

Strittmatter, W. J., & Roses, A. D. (1996). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Annual review of neuroscience*, 19(1), 53-77.

Tampi, R. R., Tampi, D. J., Balachandran, S., & Srinivasan, S. (2016). Antipsychotic use in dementia: a systematic review of benefits and risks from meta-analyses. *Therapeutic advances in chronic disease*, 7(5), 229-245.

Thomas, K. R., & Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 51(3), 503–512. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90646-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90646-5).

Traynor, B. J., Bruijn, L., Conwit, R., Beal, F., O'Neill, G., Fagan, S. C., & Cudkovicz, M. E. (2006). Neuroprotective agents for clinical trials in ALS: a systematic assessment. *Neurology*, 67(1), 20-27.

Tsartsalis, S., Xekardaki, A., Hof, P. R., Kövari, E., & Bouras, C. (2018). Early Alzheimer-type lesions in cognitively normal subjects. *Neurobiology of aging*, 62, 34-44.

Tu, Z., Yang, W., Yan, S., Guo, X., & Li, X. J. (2015). CRISPR/Cas9: a powerful genetic engineering tool for establishing large animal models of neurodegenerative diseases. *Molecular neurodegeneration*, 10(1), 1-8.

Tubsuwan, A., Pires, C., Rasmussen, M. A., Schmid, B., Nielsen, J. E., Hjermland, L. E., Hall, V., Nielsen, T. T., Waldemar, G., Hyttel, P., Clausen, C., Kitiyanant, N., Freude, K. K., & Holst, B. (2016). Generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from an Alzheimer's disease patient carrying a L150P mutation in PSEN-1. *Stem cell research*, 16(1), 110–112. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.12.015>.

Tysnes, O. B., & Storstein, A. (2017). Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of neural transmission* (Vienna, Austria: 1996), 124(8), 901–905. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1686-y>.

Valadez-Barba, V., Cota-Coronado, A., Hernández-Pérez, O. R., Lugo-Fabres, P. H., Padilla-Camberos, E., Díaz, N. F., & Díaz-Martínez, N. E. (2020). iPSC for modeling neurodegenerative disorders. *Regenerative Therapy*, 15, 332-339.

Valente, E. M., Bentivoglio, A. R., Dixon, P. H., Ferraris, A., Ialongo, T., Frontali, M., Albanese, A., & Wood, N. W. (2001). Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *American journal of human genetics*, 68(4), 895–900. <https://doi.org/10.1086/319522>.

van Duijn, C. M., Dekker, M. C., Bonifati, V., Galjaard, R. J., Houwing-Duistermaat, J. J., Snijders, P. J., Testers, L., Breedveld, G. J., Horstink, M., Sandkuijl, L. A., van Swieten, J. C., Oostra, B. A., & Heutink, P. (2001). Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *American journal of human genetics*, 69(3), 629–634. <https://doi.org/10.1086/322996>.

Vanni, S., Colini Baldeschi, A., Zattoni, M., & Legname, G. (2020). Brain aging: A Janus-faced player between health and neurodegeneration. *Journal of neuroscience research*, 98(2), 299–311. <https://doi.org/10.1002/jnr.24379>.

Vermilyea, S. C., Babinski, A., Tran, N., To, S., Guthrie, S., Kluss, J. H., ... & Golos, T. G. (2020). In vitro CRISPR/Cas9-directed gene editing to model LRRK2 G2019S Parkinson's disease in common marmosets. *Scientific reports*, 10(1), 1-15.

Wakabayashi, K., Tanji, K., Mori, F., & Takahashi, H. (2007). The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathology: official journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 27(5), 494–506. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2007.00803.x>.

Wallon, D., Rousseau, S., Rovelet-Lecrux, A., Quillard-Muraine, M., Guyant-Maréchal, L., Martinaud, O., Pariente, J., Puel, M., Rollin-Sillaire, A., Pasquier, F., Le Ber, I., Sarazin, M., Croisile, B., Boutoleau-Bretonnière, C., Thomas-Antérion, C., Paquet, C., Moreaud, O., Gabelle, A., Sellal, F., Sauvée, M., ... collaborators of GMAJ project (2012). The French

series of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease cases: mutation spectrum and cerebrospinal fluid biomarkers. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 30(4), 847–856. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120172>.

Wan, W., Cao, L., Kalionis, B., Xia, S., & Tai, X. (2015). Applications of induced pluripotent stem cells in studying the neurodegenerative diseases. *Stem cells international*, 2015.

Wang, G., & Li, J. (2021). Review, analysis, and optimization of the CRISPR *Streptococcus pyogenes* Cas9 system. *Medicine in Drug Discovery*, 9, 100080.

Wang, H., La Russa, M., & Qi, L. S. (2016). CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond. *Annual review of biochemistry*, 85, 227-264.

Wexler, N. S. (2004). Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(10), 3498-3503.

Williams, E. T., Chen, X., & Moore, D. J. (2017). VPS35, the Retromer Complex and Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's disease*, 7(2), 219–233. <https://doi.org/10.3233/JPD-161020>.

Winklhofer, K. F., & Haass, C. (2010). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1802(1), 29-44.

Xu, W., Tan, L., & Yu, J. T. (2015). The link between the SNCA gene and parkinsonism. *Neurobiology of aging*, 36(3), 1505-1518.

Xu, X., Tay, Y., Sim, B., Yoon, S. I., Huang, Y., Ooi, J., ... & Pouladi, M. A. (2017). Reversal of phenotypic abnormalities by CRISPR/Cas9-mediated gene correction in Huntington disease patient-derived induced pluripotent stem cells. *Stem cell reports*, 8(3), 619-633.

Yan, S., Tu, Z., Li, S., & Li, X. J. (2018a). Use of CRISPR/Cas9 to model brain diseases. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 81, 488-492.

Yan, S., Tu, Z., Liu, Z., Fan, N., Yang, H., Yang, S., ... & Li, X. J. (2018b). A huntingtin knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in Huntington's disease. *Cell*, 173(4), 989-1002.

- Yan, W., Smith, C., & Cheng, L. (2013). Expanded activity of dimer nucleases by combining ZFN and TALEN for genome editing. *Scientific reports*, 3, 2376.
- Ye, T., Duan, Y., Tsang, H. W., Xu, H., Chen, Y., Cao, H., ... & Ip, N. Y. (2021). Efficient manipulation of gene dosage in human iPSCs using CRISPR/Cas9 nickases. *Communications biology*, 4(1), 1-10.
- Yoon, H. H., Ye, S., Lim, S., Lee, S. E., Oh, S. J., Jo, A., ... & Jeon, S. R. (2020). CRISPR/Cas9-mediated gene editing induces neurological recovery in an A53T-SNCA overexpression rat model of Parkinson's disease. *bioRxiv*.
- Zaboikin, M., Zaboikina, T., Freter, C., & Srinivasakumar, N. (2017). Non-Homologous End Joining and Homology Directed DNA Repair Frequency of Double-Stranded Breaks Introduced by Genome Editing Reagents. *PloS one*, 12(1), e0169931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169931>.
- Zahoor, I., Shafi, A., & Haq, E. (2018). Pharmacological treatment of Parkinson's disease. *Exon Publications*, 129-144.
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., ... & Koonin, E. V. (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 163(3), 759-771.
- Zhang, X. H., Tee, L. Y., Wang, X. G., Huang, Q. S., & Yang, S. H. (2015). Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 4, e264.
- Zhang, X., Li, Y., Xu, H., & Zhang, Y. W. (2014). The γ -secretase complex: from structure to function. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 427. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00427>.
- Zhang, Y. W., Thompson, R., Zhang, H., & Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular brain*, 4(1), 1-13.
- Zhao, S., Jiang, E., Chen, S., Gu, Y., Shanguan, A. J., Lv, T., Luo, L., & Yu, Z. (2016). PiggyBac transposon vectors: the tools of the human gene encoding. *Translational lung cancer research*, 5(1), 120–125. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2016.01.05>.

Zhou, X., Xin, J., Fan, N., Zou, Q., Huang, J., Ouyang, Z., ... & Lai, L. (2015). Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *Cellular and molecular life sciences*, 72(6), 1175-1184.