

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**CARRERA DE LABORATORIO CLINICO**



**ORIGEN GENETICO DE LA ANEMIA FALCIFORME Y SU  
TRATAMIENTO MEDIANTE EL USO DEL SISTEMA  
CRISPR/CAS9 EN SAN SALVADOR, DURANTE JULIO 2023.**

**Presentado por:**

**JOSE CRISTOBAL AVILA QUIJANO**

**Para optar el grado de:**

**LICENCIADO EN LABORATORIO CLINICO**

**Asesora**

**DRA. BEATRIZ ELENA ARCHILA DE FLORES**

**Ciudad universitaria “Dr. Fabio Castillo Figueroa”, El Salvador, agosto, 2023.**

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**Rector**

*Msc. Roger Armando Arias*

**Vicerrector Académico**

*PhD. Raúl Ernesto Azcúnaga López*

**Vicerrector Administrativo**

*Ing. Juan Rosa Quintanilla*

**Secretario/a General**

*Ing. Francisco Antonio Alarcón*

# **AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE MEDICINA**

**Decana**

*MsC. Josefina Sibrián de Rodríguez*

**Vicedecano**

*Dr. Saúl Díaz Peña*

**Secretaria**

*MsC. Aura Marina Miranda de Arce*

**Director de Escuela**

*MsC. José Eduardo Zepeda Avelino*

**Directora de Carrera**

*MSP. Mirian Cecilia Recinos de Barrera*

## CONTENIDOS

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR .....	ii
AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE MEDICINA .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	v
RESUMEN .....	vi
INTRODUCCION .....	viii
DESARROLLO .....	10
CONCLUSIONES .....	19
FUENTES DE INFORMACIÓN .....	20

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A mis padres,**

Por siempre estar a mi lado motivándome a seguir y a perseverar en mi proceso de formación académica.

### **A mis docentes,**

Que me enseñaron excelentes valores éticos y morales, gracias por su paciencia y gracias por compartir sus conocimientos conmigo

### **A mi amigo Daniel Santamaría**

Quien me apoyo financieramente y motivacionalmente desde el inicio en mi carrera universitaria, sentó las bases para que yo pudiera seguir adelante con mi carrera universitaria, sin su ayuda habría sido más difícil

## RESUMEN

La enfermedad de células falciformes, es una colección de trastornos caracterizados por la herencia de una sustitución de base única (reemplazo del ácido glutámico hidrofílico por valina hidrofóbica) en el gen de la globina  $\beta$ .

Esta distorsión da como resultado una disminución de la supervivencia de los eritrocitos y las manifestaciones clínicas posteriores del trastorno, que incluyen anemia crónica, eventos de dolor, accidente cerebrovascular, daño y falla multiorgánica y mortalidad prematura, desde el punto de vista terapéutico la edición del genoma es una técnica de biología molecular potencialmente curativa disponible para todas las personas con hemoglobinopatías  $\beta$ , incluida la enfermedad de células falciformes. Los avances recientes en las plataformas de edición del genoma, particularmente con el uso de CRISPR-Cas9, allanaron el camino para la inducción eficiente de hemoglobina fetal a través de la creación de mutaciones artificiales de persistencia hereditaria natural de hemoglobina fetal. Ya que la hemoglobina fetal inhibe la polimerización de la hemoglobina falciforme, y está bien descrito que la persistencia hereditaria natural de la hemoglobina, alivia los síntomas de la enfermedad; por lo tanto, la activación de la hemoglobina fetal silenciada por el desarrollo en los eritrocitos adultos ha sido durante mucho tiempo de interés como estrategia terapéutica.

**PALABRAS CLAVE:** Anemia, Hemoglobina, Eritrocitos, Fetal, Falciforme, Globina, Mutación, Tratamiento.

## **Abstract**

Sickle cell disease is a collection of disorders characterized by the inheritance of a single base substitution (replacement of hydrophilic glutamic acid with hydrophobic valine) in the  $\beta$ -globin gene. This distortion results in decreased erythrocyte survival and subsequent clinical manifestations of the disorder, including chronic anemia, pain events, stroke, multiple organ damage and failure, and premature mortality. Genome is a potentially curative molecular biology technique available to all people with  $\beta$  hemoglobinopathies, including sickle cell disease. Recent advances in genome editing platforms, particularly with the use of CRISPR-Cas9, have paved the way for efficient induction of fetal hemoglobin through the creation of artificial mutations of naturally heritable persistence of fetal hemoglobin. Since fetal hemoglobin inhibits the polymerization of sickle hemoglobin, and it is well described that the natural hereditary persistence of hemoglobin alleviates the symptoms of the disease; Therefore, activation of developmentally silenced fetal hemoglobin in adult erythrocytes has long been of interest as a therapeutic strategy.

**KEYWORDS:** Anemia, Hemoglobin, Erythrocytes, Fetal, Sickle cell, Globin, Mutation, Treatment

## I. INTRODUCCION

La anemia falciforme es una enfermedad genética de la sangre caracterizada por la producción de eritrocitos con forma anómala, debido a mutaciones en el gen HBB (complejo globínico Beta).

Dando lugar a la producción hemoglobina S, diferente a la hemoglobina A, normal en el adulto, dicha mutación se lleva a cabo por un cambio de aminoácidos (adenina por timina en el gen de la cadena beta) originando así una sustitución del aminoácido ácido glutámico por valina en la posición número seis de la proteína.

Como consecuencia de esta mutación, se produce una hemoglobina inestable que se cristaliza fácilmente cuando la presión de oxígeno es baja, provocando que el eritrocito se deforme, se torne rígido y tome la forma de media luna provocando así su destrucción y la consecuente anemia hemolítica.

En países desarrollados la creación de una terapia para la anemia falciforme, al conseguir corregir la mutación responsable de la enfermedad, o incluso el logro de la reactivación en el suficiente número de células madre hematopoyéticas in vitro, o la reactivación de la hemoglobina fetal silenciada, mediante la tecnología CRISPR/CAS9 (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas) propone un novedoso tratamiento y una mejora significativa en la calidad de vida de las personas que padecen la enfermedad.

El sistema CRISPR/CAS9 forma parte de un sistema inmune que las bacterias desarrollan para defenderse de los virus (bacteriófago) este sistema de defensa está mediado por una nucleasa específica que degrada el material genético de los virus (bacteriófagos) para

posteriormente almacenar fragmentos o secuencias de dicho material genético y de esta manera lograr reconocer y eliminar en el futuro ADN que posea secuencias genéticas similares.

En la actualidad el sistema CRISPR/CAS9 ha tomado gran relevancia en el campo de la medicina y la biotecnología ya que gracias a la capacidad que posee dicho sistema para introducir cortes y correcciones específicas en la molécula de ADN ha sido posible aislarlo y emplearlo como una herramienta especial en biología molecular para la edición genética.

Siendo de esta forma la clave para el desarrollo potencial de múltiples terapias génicas para el tratamiento de enfermedades genéticas como lo es en este caso la anemia falciforme.

Cabe recalcar que de momento no se cuentan con avances o datos específicos sobre el uso o la implementación de la edición genética mediante CRISPR/cas9 en El Salvador

## II. DESARROLLO

Según la organización mundial de la salud (OMS) se considera a la anemia como un problema de interés en salud pública y plantea la meta de reducirla en 50% para el 2025, especialmente en niños y mujeres en edad reproductiva, población considerada como la más afectada.

Dentro de este tipo de patologías, la hemoglobinopatía anemia falciforme, ha generado gran interés dentro de la comunidad científica por su crecimiento vertiginoso en la población. El número de recién nacidos con anemia falciforme podría pasar de 305.800 en 2010 hasta alrededor de 404.200 en 2050 a nivel global.

Las hemoglobinopatías son enfermedades de origen genético, en la estructura o síntesis de la molécula de hemoglobina, la cual está constituida por dos cadenas alfa ( $\alpha$ ) y dos cadenas beta ( $\beta$ ) ensambladas con un átomo de hierro que constituye el grupo hemo.

Dichas cadenas son codificadas por genes independientes localizados en los cromosomas 11p13 y 11p15. (SciELO 2021 pag 1322)<sup>1</sup>

La hemoglobinopatía anemia falciforme, también conocida como anemia drepanocítica o drepanocitosis, de acuerdo con la Organización Nacional de Enfermedades Raras - NORD (USA), la frecuencia de anemia falciforme varía entre países.

Las mutaciones en el gen HBB (complejo globínico Beta) son comunes en personas de África, el Mediterráneo, Medio Oriente, India, en personas del Caribe, regiones de Centro y Suramérica, aunque pueden ser encontradas en individuos de cualquier origen étnico.

La herencia de la anemia falciforme es de tipo autosómica recesiva, caracterizada por la producción de la hemoglobina S, que difiere de la hemoglobina A, normal del adulto, por un cambio de adenina por timina en el gen de la cadena  $\beta$ , debido a esta mutación, se

produce una hemoglobina inestable que se cristaliza fácilmente cuando la presión de oxígeno es baja lo cual hace que el hematíe se deforme y se torne rígido adoptando la forma de media luna, provocando su destrucción y la consecuente anemia hemolítica. Todos los individuos con hemoglobina S presentan la misma mutación, la cual va acompañada por otras mutaciones en la región del cromosoma 11, conocidas como grupo de la globina beta lo que origina distintos polimorfismos. Las 2 formas más importantes en las que se presenta la anemia falciforme son: 1) forma homocigota, o pacientes afectados es decir que manifiestan la enfermedad, 2) forma heterocigoto, o rasgo drepanocítico, es el paciente asintomático considerado portador sano.

Un dato importante es que normalmente, el recién nacido presenta gran cantidad de hemoglobina fetal, la cual empieza a disminuir hacia los 4 a 6 meses de vida; esta hemoglobina presenta alta afinidad por el oxígeno lo que hace que los pacientes con anemia falciforme sean asintomáticos al momento del nacimiento.

En los pacientes afectados, las manifestaciones clínicas son: la hemólisis marcada, y aquellas que son consecuencia de la vaso-oclusión, generada a partir de la obstrucción de los vasos sanguíneos por la forma de hoz del hematíe; estos episodios terminan por ocasionar daño sistémico en diferentes órganos producto de la isquemia e infartos tisulares, los síntomas y complicaciones de la enfermedad pueden variar de leves a graves, la anemia puede ser de tipo normocítica-normocrómica cuando son homocigotos, o de tipo microcítica mediante el análisis de hemoglobina reticulocitaria. (SciELO,2021pag1325)<sup>1</sup>

Recientemente, ha crecido el interés por emplear la técnica en biología molecular CRISPR/cas9 como procedimiento terapéutico en la corrección del gen de la beta globina mutado, mediante la edición de la mutación del gen de la beta globina por reparación de

ADN dirigida por homología, para cortar o desintegrar el locus de la hemoglobina falciforme siendo este la causa más común de anemia falciforme, básicamente la reparación de ADN dirigida por homología utilizando el sistema CRISPR/cas9 se encarga de reparar una ruptura en el ADN con un fragmento de ADN el cual debe contener secuencias similares u homología en los extremos del ADN roto para que este sea incorporado.

La plataforma CRISPR/Cas9 utiliza una única endonucleasa y un solo ARN guía (ARNg) para inducir la ruptura de ADN (doble cadena) de secuencia específica. Cuando esto acompaña a un molde de reparación, permite reparar el gen mutado.

El acrónimo CRISPR proviene de las siglas Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats que en español significa: Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas.

La segunda parte del nombre, Cas, se refiere a un grupo de proteínas del núcleo celular (nucleasas), que fueron nombradas así al descubrirse que estaban asociadas a CRISPR.

El origen de CRISPR/Cas9 está en el sistema de defensa inmunitario de las bacterias ante los virus. Muchas bacterias tienen un sistema de defensa llamado CRISPR, que les permite detectar ADN viral y destruirlo. Para ello, estas bacterias cuentan con una proteína llamada Cas9 que, junto con un ARN guía (gARN), permite identificar, cortar y destruir la secuencia del ADN vírico.

El mecanismo de defensa inmune de las bacterias ya había sido descrito por Francisco Mojica, microbiólogo de la Universidad de Alicante. En el año 2003, Mojica descubrió que había fragmentos del genoma del virus en bacterias que llevaban a la bacteria a ser resistente a la infección, sentando las bases para el desarrollo de la herramienta CRISPR-Cas9 en biología molecular.

En 2012, Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier publicaron en Science un trabajo que mostraba cómo Cas9 podría utilizarse a modo de herramienta de ingeniería genética en biología molecular.

Usando esta proteína, científicos de todo el mundo podrían eliminar o insertar secuencias de ADN en células de una manera precisa. Desde entonces, algunos laboratorios de todo el mundo se ha editado ADN en células de diversas especies, incluidos ratones y monos, así como en embriones humanos, CRISPR-Cas9 puede ofrecer un enfoque poderoso para tratar muchas enfermedades humanas, de origen genético como lo es en este caso la anemia falciforme (BioThech,2019pag5)<sup>2</sup> la edición clásica de crispr-cas9 en la corrección de la mutación del gen que causa la anemia falciforme se basa en roturas de doble cadena, seguidas de una reparación celular posterior de roturas cromosómicas, ya sea mediante unión de extremos no homólogos o reparación dirigida por homología.

La reparación dirigida por homología es un mecanismo de reparación preciso dado que se proporciona una plantilla de donde se pueden introducir/corregir las mutaciones deseadas.

Los ensayos clínicos actuales (ClinicalTrials.gov: NCT03653247, NCT03432364, NCT03745287 y NCT03655678) están utilizando herramientas de edición del genoma para crear roturas de doble cadena en el potenciador BCL11A específico de células eritroides para inducir los niveles de hemoglobina fetal como una opción de tratamiento potencial para la anemia falciforme y beta talasemia.

Y como enfoque alternativo, los editores de base pueden modificar el genoma sin necesidad de roturas de doble cadena, como ocurre con el sistema CRISPR-cas9 en un intento por corregir la mutación den el gen de la beta globina.

Dos de estos editores de bases son, editores de bases de citosina y editores de bases de adenina. (CellPress,2021pag6)<sup>3</sup>

La aplicabilidad de los editores de base para inducir hemoglobina fetal se demostró utilizando un editor de base evolucionado de adenina llamado ABE7.10 (ABE8e) para modificar el gen BCL11A en las células de riñón embrionario humano inmortalizadas, lo que lleva a niveles de edición significativos (54 %) en el sitio de unión del gen GATA1 ubicado en el cromosoma X que codifica el factor de transcripción hematopoyético GATA1 cuya función es codificar un factor de transcripción hematopoyético lo cual resulta esencial para la maduración de los precursores eritroides y megacariocíticos. (Nat.Biotechno, 2020 pag 883)<sup>4</sup> Por otra parte, como dato extra de una investigación que aun esta en desarrollo, en un intento de estrechar la ventana de edición y evitar ediciones fuera del objetivo en la ventana de actividad del editor base, se editó una variante de la línea celular eritrocítica humana HUDEP-2, que constan de un solo gen de gamma globina en la posición de -117G>A por un editor de base transferido por plásmido (hyA3A-BE4) que da como resultado una expresión de gamma globina sustancialmente elevada, ya que el estudio de los procesos celulares y la regulación genética en el desarrollo eritrocítico terminal se ha visto enormemente facilitado por la generación de esta línea celular inmortalizada derivada de precursores eritroides que a las ves son derivados del cordón umbilical humano, denominadas células HUDEP-2 o Línea celular derivada del cordón umbilicada humano. La capacidad de editar el genoma de manera eficiente de las células HUDEP-2 utilizando el sistema combinado de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas CRISPR/cas9 y crear líneas clónales amplía enormemente su utilidad, ya que la inserción de mutaciones clínicamente relevantes permite el estudio de

potencialmente todas las enfermedades genéticas que afectan el desarrollo de los glóbulos rojos, en este caso la anemia falciforme.

Cabe recalcar que uno de los enfoques actuales con un gran potencial en el tratamiento de la anemia falciforme es imitar las mutaciones de la persistencia natural de hemoglobina fetal que ocurren naturalmente, en si la edición del genoma es una técnica en biología molecular que pretende tratar múltiples enfermedades genética en este caso la anemia falciforme pudiendo estar disponible para todas las personas con hemoglobinopatías  $\beta$ , gracias a estudios recientes se sabe que la hemoglobina fetal inhibe la polimerización de la hemoglobina falciforme, y está bien descrito que la persistencia hereditaria natural de la hemoglobina fetal, alivia los síntomas de la enfermedad.

Por lo cual, la activación o síntesis de la hemoglobina fetal, la cual se encuentra inhibida por el desarrollo en los glóbulos rojos adultos ha sido durante mucho tiempo de interés como estrategia terapéutica en edición genética, los avances recientes en las plataformas de edición del genoma, particularmente con el uso de CRISPR-Cas9, facilitaron el camino para la inducción eficiente de hemoglobina fetal a través de la creación de mutaciones artificiales de persistencia hereditaria natural de la hemoglobina fetal.

Se han probado numerosos enfoques para reactivar la hemoglobina fetal silenciada durante el desarrollo en células madre y progenitoras hematopoyéticas derivadas de pacientes adultos, la expresión o síntesis de hemoglobina fetal en pacientes con anemia falciforme y beta talasemia alivia los efectos nocivos de los fenotipos de enfermedad grave.

Por lo tanto, las herramientas de edición del genoma, en particular CRISPR-Cas9, son muy eficaces y se pretende que estén ampliamente disponibles en el futuro para lograr estos niveles terapéuticos de hemoglobina fetal, de hecho, algunos de los objetivos actuales para

la expresión de niveles altos de hemoglobina fetal incluyen la generación de mutaciones en los promotores del gen globina.

Pero antes no está demás aclarar que es un promotor, en biología molecular, es una región de ADN proximal a un gen, en este caso el gen de la globina, en la que proteínas relevantes como la ARN polimerasa y factores de transcripción se unen para iniciar la transcripción de ese gen (globina).

Si bien la creación de la mutación de la persistencia hereditaria natural de la hemoglobina fetal a través de reparación dirigida por homología, permitiría una expresión predecible de hemoglobina fetal, la reparación dirigida por homología no es tan eficiente como la unión de extremos no homólogos en el injerto de células madre a largo plazo. Por otra parte, la terapia en investigación llamada CTX001, la cual involucra al sistema CRISPR-cas9 propone modificar las células madre in vivo las cuales dan lugar a los distintos tipos celulares de la sangre, cuyo objetivo será expresar hemoglobina fetal, para llevar a cabo dicho objetivo el primer paso sería obtener células madre hematopoyéticas y células progenitoras, para luego modificarlas utilizando tecnología CRISPR-cas9 en laboratorios para luego introducirlas de nuevo en los pacientes.

Según esta terapia la modificación genética para reactivar la expresión de la hemoglobina fetal se basa en la eliminación de una región intensificadora del gen BCL11A que codifica para un represor de la expresión de la gamma globina, al eliminar esta región intensificadora se sigue produciendo BCL11A cuya actividad es necesaria para el sistema hematopoyético normal del adulto.

De esta forma el gen BCL11A se ha convertido en un importante represor de la expresión del gen de la gamma globina en el adulto y, por tanto puede representar un objetivo para la

intervención terapéutica usando la tecnología CRISPR-cas9, la expresión de BCL11A en células eritroides está gobernada por un potenciador específico del tipo celular que contiene un sitio de unión crítico a GATA1, el cual es un factor transcripcional el cual juega un papel importante en el desarrollo de los eritrocitos regulando el paso de la hemoglobina fetal a la hemoglobina adulta. (Genotipia,2019pag 6)<sup>5</sup>

La persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal es otro enfoque en el tratamiento de la anemia falciforme usando la tecnología CRIPR-cas9 es la producción de la persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal.

La persistencia hereditaria de la hemoglobina fetal, es una condición en algunas personas que tienen un nivel alto de hemoglobina fetal durante toda la vida, los individuos con anemia falciformes y persistencia hereditaria de hemoglobina fetal tienen manifestaciones clínicas más leves.

Utilizando la tecnología en biología molecular de edición del genoma CRISPR-Cas9, se eliminaron, in vitro en células madre y progenitoras hematopoyéticas normales 13 kb del locus de  $\beta$ -globina para imitar el proceso natural de la persistencia hereditaria de hemoglobina fetal y de esa manera disminuir los síntomas de la enfermedad convirtiéndose en una opción en el tratamiento de la anemia falciforme. (PNAS,2016pag 8)<sup>6</sup>

Como se mencionó anteriormente, los niveles elevados de hemoglobina fetal en pacientes con anemia falciforme que no han presentado daño orgánico severo, tienen un rol beneficioso al prevenir algunas complicaciones de la enfermedad. Es por ello, que se han realizado estudios que utilizan la edición genética especialmente utilizando la tecnología CRISPR-cas9 para inducir la producción de hemoglobina fetal como una estrategia terapéutica para la anemia falciforme.

La inducción de la síntesis de hemoglobina fetal se realiza utilizando la técnica en biología molecular CRISPR-cas9 para realizar una edición o modificación en las secuencias reguladoras, como promotores o de regiones genómicas relacionadas con factores de transcripción que controlan los niveles de la hemoglobina fetal.

Dentro de los primeros blancos u objetivos de la tecnología de edición genética CRISPR-cas9 se encuentra el BCL11A, un factor de transcripción que funciona como supresor de los niveles de hemoglobina fetal, la inactivación genética de BCL11A demostró una inducción vigorosa de hemoglobina fetal y la corrección fenotípica de la anemia falciforme.

No obstante, se siguen realizando investigaciones utilizando el sistema CRISPR/Cas9 para introducir mutaciones a células eritroides con el fin de evaluar el efecto en los niveles de hemoglobina fetal y se han identificado un sitio específico en la región potenciadora específica para el gen BCL11A, que permite aumentar la producción de hemoglobina fetal de forma significativa sin afectar a las células madre hematopoyéticas o el desarrollo linfóide. (Crónicas científicas,2019pag36)<sup>7</sup> No obstante queda mucho por investigar en el bello mundo de la edición genética y tratamiento de la anemia falciforme mediante el sistema CRISPR/cas9.

### III. CONCLUSIONES

La enfermedad de células falciformes es un grupo de trastornos hereditarios de los glóbulos rojos, lo cuales en condiciones normales son redondos y pasan por pequeños vasos sanguíneos para llevar oxígeno a todas las partes del cuerpo. La hemoglobina de una persona que presenta la enfermedad de células falciformes es anormal, lo cual causa que los glóbulos rojos se pongan duros y pegajosos y tengan la apariencia de la herramienta agrícola en forma de C llamada hoz. Estas células falciformes mueren antes de tiempo, lo que causa una constante deficiencia de glóbulos rojos. Además, cuando pasan por los vasos sanguíneos pequeños pueden atascarse y obstruir la circulación de la sangre, la anemia falciforme al ser la hemoglobinopatía estructural más frecuente a nivel mundial, a través de la cual los pacientes presentan múltiples complicaciones agudas y crónicas, y para las cuales no se cuenta con un tratamiento óptimo, 100% efectivo, por lo cual necesitamos hacer uso de las nuevas técnicas en biología molecular de la mano con laboratorio clínico para el diseño de sistemas de manipulación genética, que permitan obtener un tratamiento, para mejorar la calidad de vida de las personas que padecen la enfermedad. Por lo cual la comunidad científica a nivel mundial y no solo en el salvador debe hacer especial énfasis en la importancia del desarrollo de estas tecnologías, en biología molecular con el fin de obtener el apoyo necesario por parte de los diferentes actores políticos, sociales y económicos para el desarrollo de los estudios y ensayos clínicos que permitan desarrollar, implementar y utilizar de forma segura estas prometedoras alternativas terapéuticas en la edición del genoma y corrección de la mutación del gen de la beta globina ya que de momento no se cuenta con la tecnología necesaria para su implantación.

#### IV. FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Marcela, Y. J. (05 de agosto 2021). *SciELO*, Anemia falciforme: una revisión sobre el genotipo de la enfermedad, haplotipos, diagnóstico y estudios asociados. <https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.scielo.cl/pdf/rmc/v149n9/0717-6163-rmc-149-09-1322.pdf&ved=2ahUKEwigofzHqp6BAxXxmGoFHYxfA2cQFnoECCgQAQ&usg=AOvVaw2YlyYIHVkJJqOT0QpXByBs>
2. Patricia. (29 de junio 2019) *BioTech*. La historia de CRISPR/Cas9. <http://biotech-spain.com/es/articulos/la-historia-de-crispr-cas9/#:~:text=El%20origen%20de%20CRISPR%2FCas9,detectar%20ADN%20viral%20y%20destruirlo>
3. Selami, A. K. (12 de octubre del 2021) *CellPres*. CRISPR-Cas9 para inducir hemoglobina fetal para el tratamiento de la anemia de células falciformes. [https://www.cell.com/molecular-therapy-family/methods/fulltext/S2329-0501\(21\)00148-0](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/methods/fulltext/S2329-0501(21)00148-0)
4. Richter, M. Z. (02 de septiembre del 2020) *Nat Biotechno*. Evolución asistida por fagos de un editor de base de adenina con actividad y compatibilidad mejoradas del dominio Cas, <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0453-z>
5. Amparo. (27 de noviembre de 2019). *Genotipia*. Resultados preliminares positivos para los primeros pacientes con hemoglobinopatías graves tratados con CRISPR. [https://genotipia.com/genetica\\_medica\\_news/ensayo-crispr-talasemia/](https://genotipia.com/genetica_medica_news/ensayo-crispr-talasemia/)

6. Lin, J. Y. (5 de junio de 2016) *PNAS*. Edición del genoma utilizando CRISPR-Cas9 para crear el genotipo HPFH en HSPC: un enfoque para tratar la anemia de células falciformes y la  $\beta$ -talasemia. <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1612075113>
7. Mackenzie, V. (03 de julio de 2019). *Cronicas científicas*, Terapia genética en la enfermedad de células falciformes. <https://www.cronicascientificas.com/index.php/ediciones/edicion-xii-mayo-agosto-2019/26-ediciones/241-terapia-genetica-en-la-enfermedad-de-celulas-falciformes>
8. Díaz M, Márquez Y, Martínez J, Balcázar I, Benitez E, Bernal J.(Septiembre 2021) *SciELO*. Anemia falsiforme una revisión sobre el genotipo de la enfermedad, haolotipos diagnóstico y estudios asociados. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872021000901322>
9. Márquez P, (29 de mayo de 2019) *BioTech*. La historia de CRISPR/CAS9. <http://biotech-spain.com/es/articles/la-historia-de-crispr->
10. Nicole M, Gaudelli et al.(julio de 2020) *National Library of Medicine*. Evolución dirigida de editores de base de adenina con mayor actividad y aplicación terapéutica. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32284586/>
11. Meyer G, Cheong A, Olijnik A, (julio de 2018) *Methods and Protocols*. edición robusta del genoma CRISPR/CAS9 de la línea precursora eritroide HUPED-2 utilizando plásmidos y donantes de oligonucleótidos monocatenarios. ResearchGate. [https://www.researchgate.net/publication/326693906\\_Robust\\_CRISPRCas9\\_Genome\\_Editing\\_of\\_the\\_HUDEP2\\_Erythroid\\_Precursor\\_Line\\_Using\\_Plasmids\\_and\\_Single-Stranded\\_Oligonucleotide\\_Donor](https://www.researchgate.net/publication/326693906_Robust_CRISPRCas9_Genome_Editing_of_the_HUDEP2_Erythroid_Precursor_Line_Using_Plasmids_and_Single-Stranded_Oligonucleotide_Donor)

12. Román, J. Ugalde, L. Alvares, L. Surrallés, J. Buerén, A. Rio, P. (19 de septiembre de 2019) *Cell Stem Cell*. La reparación mediada por NHEJ de roturas de ADN inducidas por CRISPR-Cas9 corrige eficientemente mutaciones en HSPC de pacientes con anemia de Fanconi [https://www.cell.com/cell-stem-cell/fulltext/S1934-5909\(19\)30351-0](https://www.cell.com/cell-stem-cell/fulltext/S1934-5909(19)30351-0)
13. Rasmus, O. Daniel, P. Mateo, H. (25 de enero de 2018) *Natureprotocols*. Edición del genoma CRISPR/Cas9 en células madre hematopoyéticas humanas <https://www.nature.com/articles/nprot.2017.143>
14. Mateo, C. Daniel, B. Abhishek, D. Takahiro, M. Barry, H. Stuart, H. ( agosto de 2014) *journal of biological chemistry*. Caracterización de la eficiencia de la delección genómica mediada por repeticiones palindrómicas agrupadas regularmente espaciadas (CRISPR)/sistema de nucleasa Cas9 en células de mamífero. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.564625>
15. Megan, D. Gregory, J. Mateo, C. Zulema, R. Michael, L. Alok, V. Michelle, H. Dianne, L. David, G. Georgia, L. Aaron, R. Fabrizia, U. (23 de abril de 2015) *blood*. Corrección de la mutación de la anemia de células falciformes en células madre/progenitoras hematopoyéticas humanas. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-615948>
16. Patrick, D. Jason, W. Vineeta, A. David, S. Feng, Z. (24 de octubre de 2013) *natureprotocols*. Ingeniería del genoma mediante el sistema CRISPR-Cas9. <https://www.nature.com/articles/nprot.2013.143>
17. Pankaj, K. Leonardo, M. Ryan, C. Michael, E. Derrick, J. Chad, A. (06 de noviembre de 2014) *Cell Stem Cell*. Ablación eficiente de genes en células madre

hematopoyéticas humanas y células efectoras mediante CRISPR/Cas9.

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.10.004>

18. Adli, M. (15 de mayo de 2018) *nature communications*. El kit de herramientas

CRISPR para la edición del genoma y más allá.

<https://www.nature.com/articles/s41467-018-04252-2>