



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**NUEVA HERRAMIENTA TERAPÉUTICA EN
EL TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA
MIELOIDE CRÓNICA**

Autor: Sara Ortega Baraibar

Tutor: Rafaela Raposo González

Convocatoria: Febrero 2018

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	3
1. RESUMEN/ABSTRACT.....	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. LMC.....	4
2.2. CRISPR/Cas.....	9
3. OBJETIVOS.....	10
4. MATERIAL Y MÉTODOS	11
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
6. CONCLUSIONES.....	16
7. BIBLIOGRAFÍA.....	17

ABREVIATURAS

- LMC/CML: Leucemia Mieloide Crónica.
- SMPc: Síndromes Mieloproliferativos.
- NMP: Neoplasias Mieloproliferativas.
- Ph: Filadelfia.
- ITC: inhibidores de la tirosina cinasa.
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
- TAC: tomografía axial computarizada.
- FDA: food and drug administration.
- CRISPR: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas.
- Cas: endonucleasa.
- ADN: ácido desoxirribonucleico.
- ARN: ácido ribonucleico.
- REC: lóbulo de reconocimiento de la diana.
- NUC: lóbulo con actividad nucleasa.
- HNV y RuvC: dominios nucleasa.
- PI: dominio de reconocimiento.
- BER: reparación por escisión de bases.
- LLA: Leucemia Linfoide Aguda.
- LMA: Leucemia Mieloide Aguda.

1. RESUMEN

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa crónica que afecta a las células precursoras de la sangre. Se origina por una mutación genética característica, la translocación entre los cromosomas 9 y 22, generando un oncogén *BCR-ABL* (cromosoma *Ph*). Es una enfermedad difícil de curar de forma definitiva. Actualmente sólo se logra mediante un trasplante alogénico de células madre, pero no es fácil realizarlo debido a la dificultad para encontrar un donante compatible. Por ello se usan, entre otros, los inhibidores de la tirosina cinasa (ITC) que consiguen frenar el progreso de la enfermedad. Recientemente se está investigando sobre una terapia de edición genética (CRISPR-Cas), que podría eliminar de forma definitiva el oncogén.

ABSTRACT

CML is a Chronic Myeloproliferative Neoplasm affecting the precursor cells of the blood. It arises from a genetic mutation, which consists of a translocation between chromosomes 9 and 22 that result in an oncogene *BCR-ABL* (*Ph* chromosome). It is a disease hard to cure permanently. Currently, the only definitive treatment is to transplant allogeneic stem cells, but compatible donors are difficult to find. For this reason, tyrosine kinase inhibitors (TKI) are used, among others, to slow down the progression of the disease. Recently researches have focused on gene therapy through CRISPR-Cas, which attempts to knock out the oncogene.

Palabras claves: Leucemia Mieloide Crónica, Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas, oncogén *BCR-ABL*, cromosoma Filadelfia, anticuerpos monoclonales, inhibidor de la tirosina cinasa (ITC), CRISPR-Cas, ARN guía, endonucleasa.

Key words: Chronic Myeloid Leukemia, Chronic Myeloproliferative Neoplasm, oncogene *BCR-ABL*, Philadelphia chromosome, monoclonal antibodies, tyrosine kinase inhibitor (TKI), CRISPR-Cas, guide RNA, endonuclease

2. INTRODUCCIÓN

2.1. La Leucemia Mieloide Crónica (**LMC**) es una neoplasia de la célula madre pluripotente con expansión de la serie granulocítica y cromosoma Filadelfia. Su etiopatogenia puede deberse a algunas de las siguientes causas o a la suma de ellas: ⁽¹⁾

- Alteraciones genéticas: t (9; 22) (q 34; q11).
- Producción de citoquinas (CSF-G, FNT-A, IL-1).
- Interacción estroma – célula neoplásica.

Forma parte de un grupo de enfermedades denominadas Síndromes Mieloproliferativos Crónicos (SMPc) o Neoplasias Mieloproliferativas (NMP), entre cuyas características más comunes se encuentran: ⁽²⁾

- Son proliferaciones clonales mieloides neoplásicas autónomas con respecto al factor de estimulación de colonias (CSF).
- Son enfermedades con mayor prevalencia en adultos (50-60 años) sin etiología conocida.
- Pueden presentar alteraciones trombóticas y/o hemorrágicas.
- Son características la hepato y/o esplenomegalia con signos de hipermetabolismo. No presentan adenopatías.

- Pueden transformarse en leucemias agudas.
- Hay un incremento de anomalías cromosómicas con el tiempo y con el tratamiento con radio y/o quimioterapia.
- La fibrosis medular puede producirse en cualquiera de ellas.

Dentro de las NMP, junto a la LMC, se incluyen: ⁽³⁾

- Policitemia vera: proliferación autónoma de precursores mieloides y predominio de la serie eritroide.
- Mielofibrosis primaria: NMP Filadelfia negativa caracterizada por una fibrosis medular y hematopoyesis extramedular.
- Trombocitemia esencial: enfermedad clonal adquirida, neoplásica, con expansión de la serie megacariocítica y aumento de plaquetas en sangre periférica.

Su velocidad de instauración suele ser muy lenta de forma que muchas personas que padecen esta enfermedad no presentan síntomas durante años.

En la LMC las células normales de la médula ósea son totalmente sustituidas por otras procedentes de una célula madre hematopoyética anormal en la que se han producido alteraciones genéticas que desencadenan su comportamiento tumoral.

Consiste en la translocación (intercambio de material genético) entre los cromosomas 9 y 22, rompiéndose el protooncogén *c-ABL* que se encuentra en el brazo largo del cromosoma 9, y translocándose al gen *BCR* (gen *Ph*) situado en el brazo largo del cromosoma 22.

Este proceso incluye la adición de segmentos 3' del gen *ABL* (9q34) a segmentos 5' del gen *BCR* (22q11).⁽⁴⁾ El oncogén denominado ***BCR-ABL*** queda localizado en el cromosoma 22 (cromosoma *Ph*) y codifica para una proteína con actividad tirosina cinasa (p210) cuya actividad se encuentra incrementada, responsable además de otras vías que facilitan un aumento de la proliferación celular, una reducción de adhesión al estroma y una disminución de la apoptosis.⁽⁵⁾

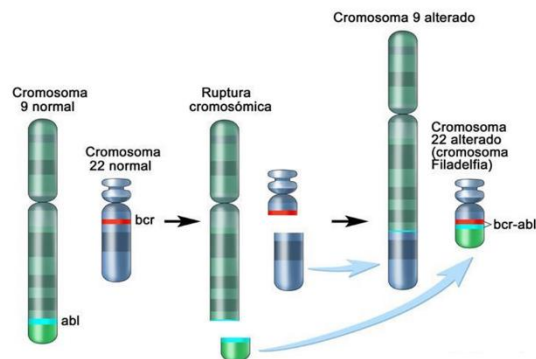


Figura 1. Translocación cromosómica y formación del cromosoma Filadelfia

Las mutaciones en el dominio *ABL* del oncogén *BCR-ABL* son la causa más frecuente y mejor conocida de las resistencias a los ITC. Recientes estudios muestran la posibilidad de que la mutación se produzca debido a una inestabilidad génica. Se han descrito más de 100 mutaciones con más de 90 cambios de aminoácidos. Las más frecuentes son la T315I y la E255V, que representan entre el 30 y el 40% de todas las mutaciones. Es muy importante detectarlas ya que su presencia y su tipo orientarán hacia el uso de los diferentes tratamientos.^(6,7)

La LMC se desarrolla en tres fases:

- Fase inicial o crónica: exceso de producción de granulocitos. Con un periodo de duración aproximado de 2 a 6 años.
- Fase de aceleración: la enfermedad comienza a agudizarse y empieza a ser difícil de controlar.
- Fase de crisis blástica: se transforma en una Leucemia Aguda Mieloide o Linfoide, ambas de muy mal pronóstico.⁽⁵⁾

En la mayor parte de los pacientes la enfermedad se **DIAGNOSTICA** mediante una analítica rutinaria y muchos de ellos no presentan síntomas clínicos. En el resto, los principales son: debilidad, fatiga persistente, fiebre, sudoración excesiva, pérdida de peso, anemia, hemorragias y hematomas no justificados, pequeñas infecciones, dolores óseos y articulares. Muchos pacientes muestran, además, sensación de hinchazón en el lado izquierdo del abdomen como consecuencia del crecimiento de tamaño del bazo (esplenomegalia).

El diagnóstico de la LMC se basa en el aumento de leucocitos en sangre y médula, y en la demostración de una alteración cromosómica característica de las células sanguíneas, el denominado cromosoma *Ph* (presente en el 95 % de los casos de LMC), o de la alteración génica que origina la enfermedad, el denominado oncogén *BCR-ABL*.⁽¹⁾

Las pruebas de laboratorio que se realizan para su estudio son las siguientes:⁽⁸⁾

- ❖ Estudio de la médula ósea: se realiza un aspirado de la médula ósea y se estudia la morfología y composición de las células hematopoyéticas, el estudio genético y las pruebas de genética molecular. También puede realizarse una biopsia de la médula ósea que permite conocer la fase en la que se encuentra la enfermedad o distinguir la LMC de otras enfermedades

- ❖ Hemograma y frotis sanguíneo: suelen aparecer diferentes tipos de glóbulos blancos inmaduros principalmente en médula ósea. Para saber si hay también en sangre se realiza un frotis que posteriormente se observa al microscopio.

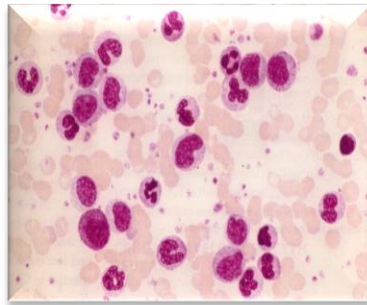


Figura 2. Leucemia mieloide crónica

- ❖ Bioquímica completa: se produce una elevación del ácido úrico, lactato deshidrogenasa y alteración hepática.
- ❖ Citogenética: para llevar a cabo las técnicas citogenéticas es necesario que el cromosoma *Ph* esté presente en el momento en el que se realiza la prueba. La más utilizada es la técnica PCR que permite detectar el oncogén *BCR-ABL*, además de tener una gran sensibilidad, rapidez y una buena relación coste – eficacia.
- ❖ Ecografía por ultrasonidos o TAC del abdomen: sirve para detectar la hepato y/o esplenomegalia. Esta prueba puede utilizarse tanto en el diagnóstico, como para evaluar la eficacia del tratamiento.

El **TRATAMIENTO** de elección depende de varios factores, entre los que destacan, la fase de la enfermedad, los posibles efectos secundarios, la preferencia del paciente a la hora de elegir, así como el estado de salud de éste. ⁽⁹⁾

- **Quimioterapia:** el uso de hidroxurea (Hydrea ®) permite una disminución rápida de la leucocitosis. Es necesario comenzar lo antes posible con los ITC. ⁽¹⁰⁾
- **Inmunoterapia → interferón α :** reduce el crecimiento y la división de las células leucémicas. Debido a que produce efectos secundarios relevantes, en muchas ocasiones muy difíciles de soportar, ha ido sustituyéndose por los ITC.
- **Terapia dirigida:** se utilizan anticuerpos monoclonales creados en el laboratorio a partir del estudio de antígenos específicos de la superficie de células neoplásicas. Esta tecnología permite dirigir el tratamiento hacia células específicas, causando una menor toxicidad en células sanas. ⁽¹¹⁾

Para el tratamiento de la LMC se usan los ITC que impiden el funcionamiento de la enzima tirosina cinasa, haciendo que las células malignas mueran rápidamente. Por lo general, este tipo de fármacos pueden provocar una alteración hepática, por lo que en aquellos pacientes enfermos de hepatitis, debe extremarse la vigilancia. Aunque se encuentren en un estado de remisión citogenética completa, se recomienda que los pacientes reciban estos fármacos durante toda la vida para evitar que la LMC revierta.

- a. **Imatinib (Glivec®):** fue la primera terapia dirigida aprobada por la FDA de los Estados Unidos en 2001. La dosis pautada es de 400mg en 1 o 2 comprimidos al día y funciona mejor que la quimioterapia. Se ha comprobado que entre el 80-90% de los pacientes que reciben tratamiento con Glivec® en fase crónica, los niveles de células mutadas que contienen el cromosoma *Ph* son casi indetectables. Los efectos adversos que produce son leves como retención de líquidos, náuseas, cansancio, diarrea, etc. ⁽¹²⁾
 - i. **Asociación con interferón α :** no existe evidencia de mejoría tras la asociación con Imatinib, al contrario, el grado de toxicidad que produce es causa de una alta tasa de abandono. El hecho de que no sea indicación autorizada en España restringe su uso a tratamiento compasivo. ⁽¹³⁻¹⁵⁾

- b. **Dasatinib (Sprycel®):** aprobado por la FDA como tratamiento inicial de la LMC en fase crónica en aquellos casos en los que otros fármacos no funcionen. La dosis inicial recomendada es de 100mg una vez al día. En el caso de que el paciente se encuentre en fases más avanzadas, se recomiendan 140mg una vez al día. Dasatinib es sustrato e inhibidor del citocromo P450 (CYP) 3A4, por lo que hay riesgo de interacción con otros fármacos que se metabolizan por la misma vía. Puede producir reacciones adversas como: mielosupresión, hemorragias, retención de líquidos, hipertensión pulmonar arterial, etc. ⁽¹⁶⁾

- c. **Nilotinib (Tasigna®):** aprobado por la FDA como tratamiento inicial de la LMC en fase crónica en aquellos casos en los que otros fármacos no funcionen. La dosis recomendada es de 300mg dos veces al día. Puede ser necesario una reducción de la dosis o una interrupción temporal por toxicidad hematológica no relacionada con la leucemia de base. ⁽¹⁷⁾

- d. **Bosutinib (Bosulif®):** la FDA lo aprobó para tratar la LMC cuando uno de los anteriores no resulte eficaz o si un paciente experimenta demasiados efectos secundarios. Los efectos secundarios más frecuentes incluyen diarrea, náuseas y vómitos, niveles bajos de células sanguíneas, dolor abdominal, cansancio, fiebre, reacciones alérgicas y problemas hepáticos.⁽¹⁸⁾
- e. **Ponatinib (Iclusig®):** aprobado en 2012 por la FDA para la misma indicación que el Bosutinib. Además se utiliza para aquellos pacientes que presenten la mutación T315I en el dominio *ABL* del oncogén *BCR-ABL*. La dosis inicial recomendada es de 45mg una vez al día. Las reacciones adversas más importantes que produce son: mielosupresión, oclusión arterial, tromboembolismo venoso, hipertensión, hemorragias, etc.⁽¹⁹⁾
- **Trasplante de médula ósea/células madre:** es el único tratamiento en la actualidad que puede curar de forma definitiva la LMC. El principal objetivo es destruir las células neoplásicas en la médula, la sangre y otras partes del cuerpo, usando quimioterapia y/o radioterapia, y luego, permitir que las células madre sanguíneas reemplazadas creen una médula ósea sana. En el tratamiento de la LMC sólo se utilizan trasplantes alogénicos, que consiste en el uso de células madre de donantes histocompatibles.

2.2. CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats):

Técnica de edición genética que permite modificar el genoma inhibiendo un gen defectuoso concreto o sustituyendo su secuencia por una correcta. Originalmente ha sido utilizada por las bacterias como respuesta inmune frente al ataque de virus. En los últimos años esta técnica se ha usado para modificar el genoma tanto de animales como de plantas.

CRISPR-Cas tiene muchas ventajas entre las que se encuentran: facilidad a la hora de diseñar e implantar, mayor eficacia de focalización y menor coste. Por lo tanto, se está convirtiendo en una de las herramientas más poderosas para la eliminación de un gen individual, así como su inserción y/o el control de la transcripción.⁽²⁰⁾

Los estudios han demostrado que es una excelente herramienta para editar genes en una gran variedad de especies de plantas, así como cultivos de importancia agrícola, como el algodón, el maíz, el trigo y el arroz. La edición del genoma basada en CRISPR-Cas9 se puede utilizar para mejorar el rendimiento, calidad y tolerancia al estrés ambiental

Para realizar esta técnica se necesita un ARN guía (diseñado previamente en el laboratorio), una enzima endonucleasa (Cas) que corte específicamente la secuencia del genoma y un fragmento de ADN que se utiliza como molde para introducir el cambio deseado.

El mecanismo es el siguiente: se introduce en la célula el ARN guía de secuencia complementaria a la del ADN que se quiere cambiar y se une al sistema CRISPR-Cas. La enzima Cas es la encargada de cortar el fragmento específico del genoma. Finalmente se activa la maquinaria de reparación celular que permite la sustitución de la secuencia objeto de corrección.

Actualmente se ha utilizado esta técnica de forma *in vitro* en embriones humanos para eliminar posibles enfermedades hereditarias, generando embriones humanos sanos. En humanos se están realizando ensayos clínicos para tratar diferentes tipos de cánceres. En investigación se utiliza para activar o desactivar genes ya que es una técnica sencilla y barata.⁽²¹⁾

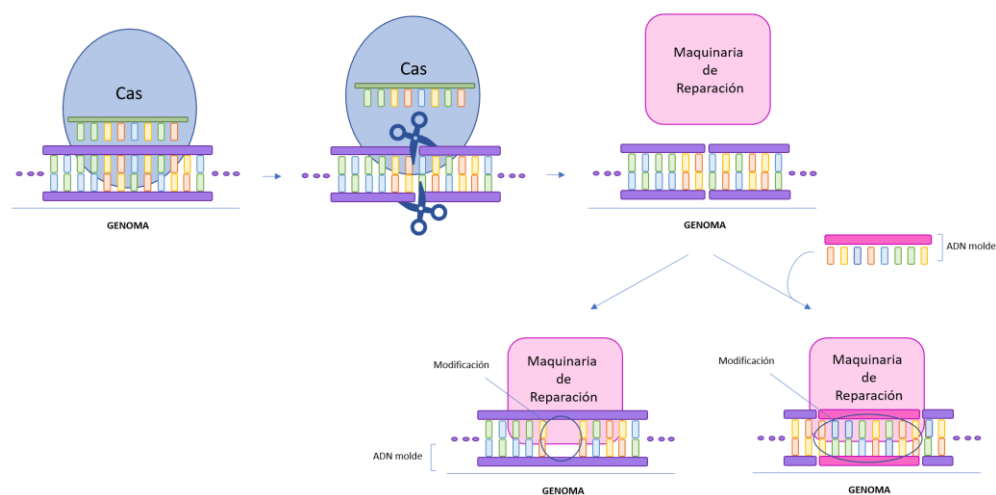


Figura 3. Sistema CRISPR-Cas

3. OBJETIVOS

- ✓ Descripción general de la Leucemia Mieloide Crónica, en qué consiste, cuáles son sus síntomas y cómo se diagnostica.
- ✓ Conocer extensamente el tratamiento actual que se utiliza en los pacientes que padecen LMC, y además, la nueva herramienta génica CRISPR-Cas9 para la erradicación definitiva de ésta.
- ✓ El uso de la técnica CRISPR-Cas en el tratamiento de otras enfermedades.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica extensa sobre la Leucemia Mieloide Crónica y la nueva terapia génica CRISPR-Cas, utilizando diversas fuentes de información. Ya que esta terapia es de reciente descubrimiento, se han consultado numerosos artículos de investigación clínica, bases de datos (Scielo, PubMed, Cisne, Google), libros de texto (manuales de hematología), revistas científicas y páginas web con el fin de obtener la información más actualizada. Para elaborar la bibliografía se ha utilizado Zotero, un software libre de gestión de referencias bibliográficas. Más adelante se muestra una enumeración completa de las fuentes consultadas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actualmente el único tratamiento capaz de curar de forma definitiva la LMC es el trasplante de células madre de un donante. La dificultad del trasplante alogénico es encontrar un donante que sea totalmente compatible con el receptor, además, la edad y el estado de salud del paciente son factores a considerar a la hora de realizarlo. Los ITC son muy eficaces para el tratamiento de la LMC y tienen muchos menos efectos secundarios que los trasplantes de células madre, por lo que se usan con mayor frecuencia.⁽⁹⁾

La **TERAPIA GÉNICA** ha supuesto una gran revolución a la hora de tratar enfermedades genéticas. Consiste en un conjunto de técnicas que utilizan la transferencia de material genético (u otro método que permita modificar la información genética) para prevenir o incluso curar este tipo de enfermedades. Uno de los principales problemas de esta técnica es la dificultad para dirigir el material genético exactamente al lugar donde se quiere.

Hay diferentes estrategias para aplicar esta terapia:⁽²²⁾

- *Ex vivo*: se extraen las células que se quieren modificar, se reparan y se reimplantan en el individuo.
- *In situ*: se introduce el gen reparador directamente en el órgano defectuoso.
- *In vivo*: se administra directamente el gen corrector para que alcance el lugar de acción.

Dentro de la terapia génica, se ha diseñado un modelo de edición génica llamado **CRISPR-Cas**, donde existen una gran diversidad de sistemas clasificados en función de la filogenia, conservación de genes, organización de locus y contenido, en 3 tipos: I, II y III.

CRISPR-Cas es un sistema inmune adquirido producido de la siguiente forma:

- 1) **Fase de adquisición:** el genoma de una bacteria contiene repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR), separadas por segmentos cortos de ADN espaciador que procede de la infección por un virus.

Una vez introducido el material genético del virus en el interior de la bacteria, la proteína Cas toma una parte del genoma del virus y lo introduce en una de las agrupaciones CRISPR, quedando la bacteria inmunizada.

- 2) **Fase de expresión:** el material genético del virus es copiado generando pequeñas moléculas individuales de ARN guía.
- 3) **Fase de interferencia:** en el caso de que se produzca una reinfección, el material genético del virus va a ser reconocido por el ARN guía correspondiente y las proteínas Cas van a ser capaces de destruirlo. ⁽²³⁾

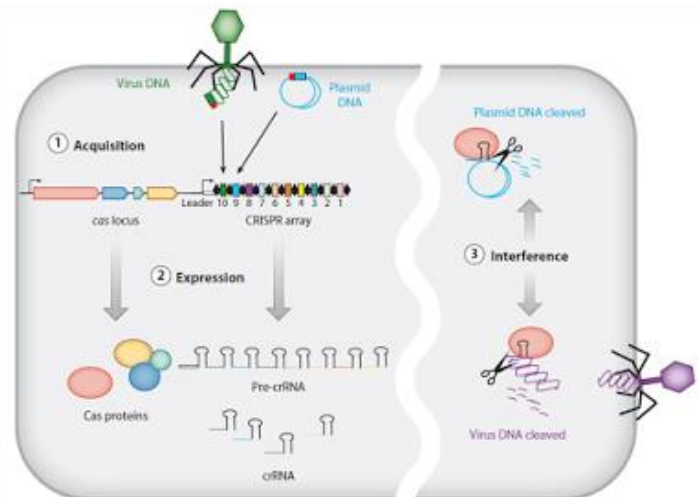


Figura 4. Fases del mecanismo de defensa de microorganismos llevado a cabo por CRISPR-Cas

Recientemente se está investigando sobre la técnica de edición genética **CRISPR-Cas9**, en bacterias de tipo *Streptococcus pyogenes*, que permite corregir el genoma de cualquier célula mediante endonucleasas que eliminan el error y lo corrigen, pero para ello es necesario conocer el proceso de edición genómica empleando nucleasas de diseño.

Para que el sistema lleve a cabo los cortes de ADN es necesaria la presencia de dos componentes: el **ARN guía** y la **endonucleasa Cas9**.

En primer lugar, se diseña el ARN guía de secuencia complementaria al ADN diana. Cuando se introduce el ARN guía en el interior de la célula a través de adenovirus, se asocia con el sistema CRISPR-Cas9, y lo dirige al lugar del genoma que quiere reparar. Una vez reconocida

la secuencia de ADN, el ARN, por mecanismos de complementariedad de bases, hibrida y posteriormente la enzima Cas9 corta el fragmento específico del genoma.

Finalmente, se activan dos posibles mecanismos de reparación celular:

- 1) Mecanismo natural *indel* (inserción – delección). Puede quedar un hueco en la cadena o insertarse una secuencia del genoma, aunque conlleva una pérdida de funcionalidad.
- 2) Tras la extracción de células madre de médula ósea, se corrige en el laboratorio el oncogén *BCR-ABL* y posteriormente se reintroduce la molécula de ADN molde reparada que la célula copiará e incorporará al ADN diana.

Uno de los principales inconvenientes a la hora de realizar esta técnica es que todos los componentes ocupan más espacio del disponible en los adenovirus y es necesario utilizar múltiples partículas virales. A esta limitación se añade el hecho de que una proporción importante de la población presenta inmunidad frente a estos virus y por tanto no puede recibir terapia génica basada en los mismos.

Para solucionar este problema, se ha diseñado un vehículo especial (**CRISPR-Gold**) para transportar todos los componentes del sistema. El vector está compuesto de partículas de oro conjugadas con ADN que forman un complejo con Cas9, el ARN guía y el ADN molde, rodeándose de un polímero endosómico disruptivo con carga positiva. CRISPR-Gold entra en la célula mediante endocitosis, y una vez en el citoplasma, el polímero activa la fragmentación de la vesícula endosomal, liberando los componentes en el interior de la célula, desde donde pueden acceder al núcleo para ejercer su función.⁽²⁴⁾

La proteína Cas9 presenta una estructura bilobulada, compuesta por un lóbulo de reconocimiento de la diana (REC) y un lóbulo con actividad nucleasa (NUC). El lóbulo NUC está compuesto de dos dominios nucleasa (HNV y RuvC) y un dominio PI que se encarga de reconocer la secuencia PAM (adyacente al espaciador).^(25–27)

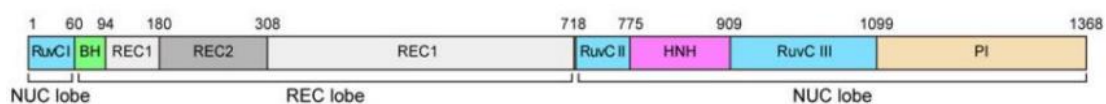


Figura 5. Estructura de la proteína Cas9

Tal y como se ha descrito, Cas9 tiene dos dominios catalíticos y esto puede ser un impedimento durante el proceso de corte de la secuencia, activándose mecanismos de reparación celular.

Además, al igual que otras nucleasas, posee el inconveniente de cortar secuencias del genoma que tengan cierta similitud con la secuencia diana que lleva el ARN guía, pudiendo producir graves errores.

Para ello, se quiere modificar Cas9 para que únicamente posea un único centro catalítico activo (Cas9n) y así se produzcan cortes en una sola hebra del ADN diana, disminuyendo pues los cortes en sitios no deseados.⁽²⁸⁾

El proceso va a consistir en el diseño de un ARN guía para cada cadena del ADN diana. La presencia de dos ARN guía va a incrementar la especificidad del corte ya que existen un mayor número de bases que deben ser reconocidas de manera específica. Los nuevos cortes van a ser subsanados mediante mecanismos de mayor fiabilidad como la reparación por escisión de bases (BER).

Además de la edición del genoma, el sistema CRISPR-Cas9 permite ejercer un control en la expresión génica sin producir una alteración permanente en el genoma. Inactivándose ambos dominios catalíticos, el ARN guía cuando llegue al ADN diana, no va a realizar un corte en la secuencia, si no que se va a unir a ella impidiendo que la ARN-Polimerasa pueda actuar, evitando pues, la elongación de la cadena.

Un grupo de investigadores del Centro de Investigación del Cáncer en Salamanca (CIC) ha empleado la técnica CRISPR-Cas9 para eliminar el oncogén que produce la LMC. El procedimiento ha permitido suprimir el gen *BCR-ABL*, inductor del cáncer, en células de ratón. El resultado es la reversión del fenotipo patológico a un fenotipo normal, lo que quiere decir que ya no es capaz de crecer ni de formar tumores.⁽²⁹⁾

Ahora lo que se quiere conseguir es realizar el mismo experimento *in vivo* en células tumorales de enfermos humanos. Para ello habría que extraer células madre tumorales de la médula ósea del paciente, corregirlas en el laboratorio y reintroducirlas.

Como se ha comentado anteriormente, hoy en día lo más difícil a la hora de tratar la LMC es encontrar un donante compatible, pero mediante esta terapia génica no sería necesario, ya que se realizaría un autotrasplante.⁽²⁰⁾

A pesar de que CRISPR puede dirigirse específicamente a determinadas secuencias del ADN, en ocasiones llega a otras partes del genoma, produciendo cientos de mutaciones no intencionadas. Es por esto que actualmente se trabaja en mejorar los componentes del sistema CRISPR, tanto en la enzima Cas9, como en el ARN guía, para aumentar así la eficiencia de la edición.⁽³⁰⁾

El Instituto Tecnológico de Massachusetts, ha desarrollado una versión de CRISPR capaz de modificar el ARN, encargado de transcribir las instrucciones escritas en el ADN para sintetizar las proteínas. Al igual que el ADN, el ARN posee cuatro bases nitrogenadas: adenosina, guanina, citosina y uracilo (tiamina en el ADN). Estas letras siempre se juntan en pares de bases (A – T (U); C – G). Muchas enfermedades raras de origen genético están producidas por una única base del ADN mal situada en la secuencia.

Se ha descrito un nuevo grupo de enzimas (**Cas13b**) presentes en bacterias del género *Prevotella* que habitualmente forman parte de la microbiota intestinal y vaginal. El objetivo que se quiere alcanzar es desactivar estas enzimas para cortar el ARN y añadirle otra proteína que cambie una base de adenina (A) por una inosina (I), que se lee como si fuera guanina (G). Este sistema se une selectivamente a secuencias determinadas del ARN y transforma el par de bases erróneo A – C en G - C. Este tipo de alteración de la secuencia de nucleótidos del ADN está implicado en aproximadamente la mitad de las enfermedades humanas asociadas a mutaciones puntuales. En contraposición con el CRISPR tradicional, los cambios son temporales y reversibles, duran lo que tarda el ARN en degradarse.

Esta nueva versión de CRISPR reduce la tasa de errores inducidos de forma espontánea del 10% al 0,1%.^(31,32)

El descubrimiento del sistema CRISPR-Cas no sólo ha sido revolucionario en el estudio de la eliminación del cáncer; científicos de los mejores institutos de investigación de Estados Unidos, trabajan cada día para encontrar nuevas aplicaciones de esta terapia en el tratamiento de otras enfermedades. Recientemente se ha creado una nueva versión de la tecnología CRISPR-Cas9, que modifica la respuesta de una célula ante una enfermedad sin romper el ADN. Realizando ensayos en ratones de experimentación, se ha conseguido activar genes involucrados en tres tipos de enfermedades: diabetes mellitus tipo 1, lesión renal aguda y una forma de distrofia muscular, mejorando la función del organismo.⁽³³⁾

6. CONCLUSIONES

- I. La LMC es una neoplasia de la célula madre pluripotente producida la mayor parte de las veces por una alteración genética, la translocación recíproca de genes específicos entre los cromosomas 9 y 22. La formación del oncogén *BCR-ABL* queda localizado en el cromosoma *Ph* que codifica para una proteína con función tirosina cinasa (p210), cuya actividad se encuentra incrementada.
- II. El tratamiento con anticuerpos monoclonales, tales como Imatinib, Dasatinib, Nilotinib, etc.; suele ser el método de elección para frenar el progreso de la enfermedad. Mientras se obtienen los resultados definitivos del diagnóstico, suele realizarse un tratamiento profiláctico con hidroxiurea. Actualmente la única forma de eliminar por completo la LMC es mediante un trasplante alogénico de células madre de médula ósea, pero no se realiza con frecuencia debido a la dificultad para encontrar a un donante totalmente compatible con el receptor.
- III. Hoy en día se está investigando sobre un nuevo método de edición genética más sencillo, económico y eficaz para erradicar de forma definitiva la LMC. CRISPR-Cas9, encontrado por primera vez en bacterias, es un conjunto de repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente espaciadas, asociadas a una endonucleasa Cas9 o más recientemente Cas13b, capaz de eliminar el oncogén *BCR-ABL*.
- IV. Las herramientas CRISPR están facilitando de manera considerable el diagnóstico molecular y el estudio de trastornos genéticos, infecciones o procesos neoplásicos con el desarrollo de nuevos tratamientos que incluyan estas herramientas como agentes terapéuticos.
- V. La tecnología CRISPR ha supuesto una gran revolución en la investigación biomédica, siendo su incorporación a la práctica clínica una realidad a corto plazo para la prevención, cura y erradicación de enfermedades suponiendo un gran avance para la medicina personalizada.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. CarrerasMuntaner 383 FIJ, 2º08021BarcelonaESPAÑA93 414 55 66. Leucemia mieloide crónica [Internet]. Fundación Josep Carreras contra la Leucemia.. Disponible en: <http://www.fcarreras.org/es/leucemiamieloidecronica>
2. CarrerasMuntaner 383 FIJ, 2º08021BarcelonaESPAÑA93 414 55 66. Síndromes mieloproliferativos crónicos [Internet]. Fundación Josep Carreras contra la Leucemia. Disponible en: http://www.fcarreras.org/es/sindromes-mieloproliferativos-cronicos_360402
3. Leucemia A-AE de A por L Mieloma y. 1. ¿Qué son los Síndromes Mieloproliferativos? | AEAL [Internet]. Disponible en: <http://www.aeal.es/sindromes-mieloproliferativos-espana/1-que-son-los-sindromes-mieloproliferativos/>
4. Clarkson B, Strife A, Wisniewski D, Lambek CL, Liu C. Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. *Leukemia*. julio de 2013;17(7):1211-62.
5. Jesús F. San Miguel, Fermín M. Sánchez-Guijo. Hematología. Manual básico razonado. 3ª. Elsevier; 2009.
6. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, Gruber F, Lange T, Saglio G, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood*. 4 de agosto de 2011;118(5):1208-15.
7. Jabbour E, Soverini S. Understanding the role of mutations in therapeutic decision making for chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol*. abril de 2009;46(2 Suppl 3):S22-26.
8. ¿Cómo se diagnostica la leucemia mieloide crónica? [Internet]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-mieloide-cronica/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/como-se-diagnostica.html>
9. Leucemia - mieloide crónica - CML - en adultos: Opciones de tratamiento. Cancer.Net2012.
Disponible en: <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cancer/leucemia-mieloide-cr%C3%B3nica-cml-en-adultos/opciones-de-tratamiento>
10. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 8 de agosto de 2013;122(6):872-84.
11. Terapia dirigida: Anticuerpos monoclonales, antiangiogénesis y otras terapias contra el cáncer - Información de Quimioterapia [Internet]. Disponible en: <http://chemocare.com/es/chemotherapy/what-is-chemotherapy/terapia-dirigida.aspx>

12. GLIVEC Comp. recub. con película 100 mg - Datos generales [Internet]. Disponible en: https://www.vademecum.es/medicamento-glivec+comp.+recub.+con+pelicula+100+mg_27820
13. Hehlmann R, Lauseker M, Jung-Munkwitz S, Leitner A, Müller MC, Pletsch N, et al. Tolerability-adapted imatinib 800 mg/d versus 400 mg/d versus 400 mg/d plus interferon- α in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de abril de 2011;29(12):1634-42.
14. Deininger MW, Kopecky KJ, Radich JP, Kamel-Reid S, Stock W, Paietta E, et al. Imatinib 800 mg daily induces deeper molecular responses than imatinib 400 mg daily: results of SWOG S0325, an intergroup randomized PHASE II trial in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. enero de 2014;164(2):223-32.
15. Preudhomme C, Guilhot J, Nicolini FE, Guerci-Bresler A, Rigal-Huguet F, Maloisel F, et al. Imatinib plus peginterferon alfa-2a in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 23 de diciembre de 2010;363(26):2511-21.
16. Spain VV. SPRYCEL Comp. recub. con película 20 mg - Datos generales [Internet]. Disponible en: https://www.vademecum.es/medicamento-sprycel_30563
17. TASIGNA Cáps. dura 150 mg - Datos generales [Internet]. Disponible en: https://www.vademecum.es/medicamento-tasigna+caps.+dura+150+mg_36705
18. Bosutinib [Internet]. Disponible en: <https://www.vademecum.es/principios-activos-bosutinib-101xe14>
19. ICLUSIG Comp. recub. con película 45 mg - Datos generales [Internet]. Disponible en: https://www.vademecum.es/medicamento-iclusig+comp.+recub.+con+pelicula+45+mg_42377
20. García-Tuñón I, Hernández-Sánchez M, Luis Ordoñez J, Alonso-Pérez V, Álamo-Quijada M, Benito R, et al. The crispr-cas9 system efficiently reverts the tumorigenic ability of *BCR/ABL in vitro* and in a xenograft model of chronic myeloid leukemia. *Oncotarget* [Internet]. Disponible en: <http://www.oncotarget.com/abstract/15215>
21. “La aplicación del CRISPR en embriones humanos viables será posible en poco tiempo” - *DiarioMedico.com*
Disponible en: <http://www.diariomedico.com/2017/05/30/area-profesional/normativa/rla-aplicacion-del-crispr-en-embriones-humanos-viables-sera-posible-en-poco-tiempor>
22. Terapia génica: posible solución a las enfermedades genéticas [Internet]. Disponible en: <http://www.fundacionmencia.org/es/enfermedades-geneticas/terapia-genica/>

23. Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet.* 2011;45:273-97.
24. CRISPR-Gold para hacer llegar CRISPR al interior de las células [Internet]. *Genética Médica.* 2017. Disponible en: <https://revistageneticamedica.com/2017/10/23/crispr-gold/>
25. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell.* 27 de febrero de 2014;156(5):935-49.
26. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* 21 de julio de 2013;31(9):827-32.
27. Cong L, Zhang F. Genome engineering using CRISPR-Cas9 system. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2015;1239:197-217.
28. Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, Adler AF, Kabadi AM, Polstein LR, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods.* octubre de 2013;10(10):973-6.
29. Logran revertir células de leucemia mieloide crónica a su estado normal mediante el corta y pega genético - JANO.es - ELSEVIER [Internet]. Disponible en: <http://www.jano.es/noticia-logran-revertir-celulas-leucemia-mieloide-27456>
30. China se adelanta de nuevo al iniciar el primer ensayo con CRISPR - *DiarioMedico.com* [Internet]. *Diario Médico.* Disponible en: <http://www.diariomedico.com/2016/07/25/area-cientifica/especialidades/oncologia/investigacion/china-se-adelanta-de-nuevo-al-iniciar-el-primer-ensayo-con-crispr>
31. Una nueva técnica CRISPR edita ARN - *DiarioMedico.com* [Internet]. *Diario Médico.* Disponible en: <http://www.diariomedico.com/2017/10/25/area-cientifica/especialidades/genetica/una-nueva-tecnica-crispr-edita-arn>
32. contacto. Una nueva técnica de edición genética corrige enfermedades en células humanas [Internet]. 2017. Disponible en: <https://www.madrimasd.org/notiweb/noticias/una-nueva-tecnica-edicion-genetica-corrige-enfermedades-en-celulas-humanas>
33. Rediseñan el sistema CRISPR para tratar epigenéticamente la diabetes sin romper el ADN - JANO.es - ELSEVIER [Internet]. [citado 7 de enero de 2018]. Disponible en: <http://www.jano.es/noticia-rediseñan-el-sistema-crispr-tratar-28560>
34. J.Sans-Sabrafen. *Hematología Clínica.* 5ª. Harcourt;
35. G.L. Ruiz Argüelles. *Fundamentos de la hematología.* 5ª. Panamericana; 2014.

36. Shirlyn B. McKenzie. Hematología clínica. 2ª traducida del inglés.
37. Griffin P. Rodgers, Neal S. Young. Manual de hematología clínica. 3ª. Wolters Kluwer; 2014.
38. ATLAS OF HEMATOLOGY [Internet]. Disponible en: <http://www.hematologyatlas.com/>
39. Leucemias [Internet]. Disponible en: <http://manualmerck.tripod.com/MMCap138.htm>

Figuras:

Figura1. Cromosoma Filadelfia. National Cancer Institute. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario>

Figura2. L-Health Topics-Leukemia. Disponible en: <http://www.qmedicine.co.in/top%20health%20topics/L/Leukaemia%20%20A%20General%20Overview.html>

Figura3. CRISPR-Cas: Herramienta de edición génica. Genética Médica Blog. 2017. Disponible en: <http://revistageneticamedica.com/blog/crispr-cas/>

Figura4. CRISPR-Cas System [Internet]. Disponible en: <https://biomolecularblog.wordpress.com/2016/11/21/crisprcas9-y-sus-avances/>

Figura5. Nishimasu, H. et al., 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. Cell, 156(5), pp.935–949.