



**Evaluación *in vitro* del sistema de edición genómica CRISPR/nCas9 en fibroblastos de pacientes con mucopolisacaridosis IIB como posible estrategia de tratamiento**

Paloma Lemaitre Gómez

Trabajo de grado

Presentado como requisito parcial para optar el título de:

Microbióloga Industrial

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias – Departamento de Microbiología

Carrera de Microbiología Industrial

Bogotá D.C, Colombia

2022

**Evaluación *in vitro* del sistema de edición genómica CRISPR/nCas9 en fibroblastos de pacientes con mucopolisacaridosis IIB como posible estrategia de tratamiento**

**Paloma Lemaitre Gómez**

**Director:**

Carlos Javier Alméciga-Díaz  
QF., PhD

**Codirector:**

Andrés Felipe Leal Bohórquez  
BLC., M.Sc., PhDc

Instituto de Errores Innatos del Metabolismo

Línea de investigación: Herramientas biotecnológicas en Errores Innatos del Metabolismo

**Evaluación *in vitro* del sistema de edición genómica CRISPR/nCas9 en fibroblastos de pacientes con mucopolisacaridosis IIB como posible estrategia de tratamiento**

**Paloma Lemaitre Gómez**



---

Carlos Javier Alméciga-Díaz, QF., PhD.

**Director**



---

Andrés Felipe Leal, BLC., M.Sc., PhD

**Codirector**



---

Edwin Alexander Rodríguez, PhD.

**Evaluador**

Alba Alicia Trespalacios, PhD.

**Decana académica Facultad de Ciencias**

Marcela Franco, PhD.

**Directora carrera Microbiología Industrial**

**NOTA DE ADVERTENCIA**

ARTÍCULO 23 DE LA RESOLUCIÓN No. 13 DE JULIO DE 1946.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo por buscar verdad y justicia”

## **Agradecimientos**

En primer lugar, quisiera agradecer a Dios por todas las bendiciones recibidas durante mis estudios universitarios. A mis padres y hermanos por el apoyo y compañía incondicional brindada en todo momento a pesar de la distancia. Es gracias a ellos que el día de hoy logro cumplir una de mis mayores metas.

Al profesor Carlos Javier Alméciga-Díaz por la confianza que depositó en mí para realizar esta investigación. Por su apoyo, paciencia, enseñanzas y palabras de aliento durante todo este proceso.

A Andrés Felipe Leal Bohórquez, por su paciencia, dedicación, enseñanzas y por ser un guía que me ayudó a crecer tanto en el ámbito personal como profesional.

A la profesora Angela Johana Espejo por su constante apoyo y colaboración durante todo el proceso de realización de este proyecto.

A Diego Alejandro Suarez, un agradecimiento muy especial porque, sin tener un compromiso formal para darme apoyo en este trabajo, siempre estuvo en disposición para brindarme ayuda en los momentos en que lo necesité.

A Luz Marina Rodriguez por su cariño, constantes palabras de aliento, por estar siempre pendiente de mi bienestar y la calidez con la que siempre me acogió.

Finalmente, un agradecimiento a la Dra. Michelina Locavino por su gentil donación del plásmido pSAM::NAGLU, a todos los miembros del IEIM, y todas aquellas personas que directa o indirectamente contribuyeron en la realización y culminación de mi trabajo de grado.

## Tabla de contenido

1. Introducción .....	11
2. Justificación y planteamiento del problema.....	12
3. Marco teórico .....	12
3.1 Errores Innatos del Metabolismo.....	12
3.2 Enfermedades de depósito lisosomal.....	12
3.3 Mucopolisacaridosis IIIB.....	13
3.4 Opciones terapéuticas.....	15
3.4.1 Terapia de reemplazo enzimático (TRE).....	15
3.4.2 Terapia de reducción de sustrato (TRS).....	15
3.4.3 Trasplante de células madre hematopoyéticas .....	16
3.4.4 Trasplante con células del cordón umbilical .....	16
3.4.5 Terapia génica .....	16
3.4.5.1 Virus adenoasociados (AAV) .....	16
3.4.5.2 CRISPR/Cas9.....	16
3.4.5.3 CRISPR/Cas9 y CRISPR/nCas9 como terapia génica .....	17
3.5 Situación en Colombia.....	18
4. Objetivos.....	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos específicos.....	18
5. Metodología.....	18
5.1 Cultivos celulares .....	18
5.2 Construcción de vectores .....	19
5.2.1 Vector con sistema CRISPR/nCas9 .....	19
5.2.2 Construcción de vector Donor AAVS1: NAGLU.....	19
5.2.2.1 Diseño y obtención de cebadores.....	19
5.2.2.2 Obtención de vector Donor AAVS1: Empty .....	20
5.2.2.3 Construcción de vector Donor AAVS1: NAGLU .....	20
5.2.2.3.1 Obtención de vector pSAM::NAGLU.....	20
5.2.2.3.2 Validación de vector pSAM::NAGLU.....	21
5.2.2.3.3 Clonaje de secuencia codificante del gen NAGLU en pJET1.2 .....	21
5.2.2.3.4 Subclonaje de secuencia codificante del gen NAGLU en vector Donor AAVS1:Empty .....	21
5.2.2.3.5 Validación de vector Donor AAVS1:NAGLU .....	22

5.3	Transfección de vectores en fibroblastos humanos.....	23
5.4	Actividad enzimática de NAGLU en fibroblastos de pacientes MPS IIIB .....	23
5.5	Acumulación lisosomal en fibroblastos de pacientes MPS IIIB .....	23
5.5.1	<i>Glicosaminoglicanos totales</i> .....	23
5.5.2	<i>Medición de masa lisosomal</i> .....	23
5.6	Análisis estadístico .....	24
6.	Resultados .....	24
6.1	Validación vector pSAM::NAGLU .....	24
6.2	Clonaje de secuencia codificante del gen <i>NAGLU</i> en pJET1.2.....	25
6.3	Subclonaje de secuencia codificante del gen <i>NAGLU</i> y validación de vector Donor AAVS1:NAGLU .....	26
6.4	Actividad enzimática de NAGLU en fibroblastos de pacientes MPS IIIB .....	28
6.5	Acumulación lisosomal en fibroblastos de pacientes MPS IIIB .....	29
7.	Discusión.....	31
8.	Conclusiones.....	32
9.	Bibliografía .....	33

## Tabla de figuras

<b>Figura 1.</b> Ruta de degradación del heparán sulfato donde se indican distintas enzimas que actúan en sitios y etapas particulares causando distintos tipos de MPS según sus deficiencias... ..	<b>15</b>
<b>Figura 2.</b> Esquema general del mecanismo de acción del sistema CRISPR/nCas9 .....	<b>17</b>
<b>Figura 3.</b> Mapa representativo del vector con el sistema CRISPR/nCas9.....	<b>19</b>
<b>Figura 4.</b> Mapa representativo del vector pSAM::NAGLU.....	<b>21</b>
<b>Figura 5.</b> Mapa representativo del vector Donor AAVS1:NAGLU. ....	<b>22</b>
<b>Figura 6.</b> Validación de vector pSAM::NAGLU por PCR, electroforesis y ensayo de actividad enzimática.....	<b>25</b>
<b>Figura 7.</b> Evaluación de la clonación de la secuencia del gen <i>NAGLU</i> en vector pJET1.2... ..	<b>26</b>
<b>Figura 8.</b> Subclonaje de secuencia codificante del gen <i>NAGLU</i> en Donor AAVS1:Empty y validación de Donor AAVS1:NAGLU. ....	<b>27</b>
<b>Figura 9.</b> Actividad enzimática específica (NAGLU) de fibroblastos.....	<b>29</b>
<b>Figura 10.</b> Acumulación lisosomal en fibroblastos WT y MPS IIIB.....	<b>30</b>



## Resumen

La mucopolisacaridosis IIIB (MPS IIIB) es una enfermedad de depósito lisosomal (EDL) que se caracteriza por la deficiencia de la enzima  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa causada por mutaciones en el gen *NAGLU*. La deficiencia de esta enzima lisosomal genera la acumulación de glicosaminoglicanos (GAGs), específicamente de heparán sulfato (HS) tanto en los lisosomas como a nivel extracelular, lo que causa distintas afecciones clínicas con particular compromiso del sistema nervioso central (SNC). A la fecha, no hay una terapia aprobada para el tratamiento de la MPS IIIB, sin embargo, la edición génica con CRISPR/nCas9 y vectores no virales como mecanismo de entrega de genes surge como una alternativa de tratamiento que ha mostrado resultados alentadores en otros tipos de EDL como la gangliosidosis GM2 y MPS IVA. En este sentido, en el presente estudio se evaluó por primera vez en un modelo *in vitro* el uso de la herramienta de edición genómica CRISPR/nCas9 para generar el *knock-in* de un casete de expresión que contiene el ADNc de *NAGLU* en el locus *AAVS1* del genoma humano. Los resultados mostraron una construcción exitosa de un vector donante con el ADNc de *NAGLU*. Luego de 30 días de edición, se alcanzó hasta un 71% de la actividad normal de *NAGLU*. Adicionalmente, se observó una tendencia a la disminución de la masa lisosomal promedio a los 30 días *post*-transfección, aunque no en la cantidad de GAGs totales. Estos resultados sirven como base para futuros experimentos que permitan sumar al conocimiento sobre los beneficios, ventajas y riesgos de la utilización de CRISPR/nCas9 como nueva alternativa de terapia génica para la MPS IIIB.

## Abstract

Mucopolysaccharidosis IIIB (MPS IIIB) is a lysosomal storage disease (LSD) characterized by the deficiency of the  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase enzyme caused by mutations in the gene encoding for it. The deficiency of this lysosomal enzyme generates the accumulation of glycosaminoglycans (GAGs), especially heparan sulfate (HS) in the lysosomes of the cell as well as extracellularly, which causes different clinical conditions mainly affecting the central nervous system (CNS). To date, there is no approved therapy for the treatment of MPS IIIB, however, gene editing with CRISPR/nCas9 and non-viral vectors as a gene delivery mechanism arises as a treatment model alternative that has shown encouraging results in other types of LSD such as GM2 gangliosidosis and MPS IVA. In this sense, in the present study the use of the genomic editing tool CRISPR/nCas9 for the expression of a cassette with NAGLU cDNA at the *AAVS1* locus of the human genome was evaluated for the first time in an *in vitro* model. The results showed a successful recombination and construction of a donor vector with NAGLU cDNA, and an increase in long-term enzyme activity (30 days) reaching values of 71% of normal NAGLU activity. Additionally, a decrease in the average lysosomal mass was observed within 30 days post-transfection, but not in total GAGs. These results serve as a basis for future experiments that sum up to the actual information about the benefits, advantages, and risks of using CRISPR/nCas9 as a new gene therapy alternative for MPS IIIB.

## 1. Introducción

La Mucopolisacaridosis IIIB (MPS IIIB), o Síndrome de Sanfilippo B, es una enfermedad de depósito lisosomal que se caracteriza principalmente por causar la degeneración del sistema nervioso central (SNC) y afecta a 1 de cada 200.000 nacidos vivos [1,6]. Esta enfermedad se genera por mutaciones en el gen *NAGLU* que codifica para la enzima  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa (NAGLU), involucrada en el catabolismo del glicosaminoglicano (GAG) heparán sulfato (HS). La pérdida de la actividad hidrolítica de NAGLU, causa una acumulación de HS a nivel lisosomal [1,2,6]. Los pacientes afectados por este síndrome presentan signos clínicos característicos como retardo del neurodesarrollo, deterioro cognitivo progresivo, hiperactividad, espasticidad y disfunción motora [1], y cuentan con una esperanza de vida usualmente hasta la adolescencia [4,33]. Actualmente, es una enfermedad para la cual no existe un tratamiento específico, no obstante, recientes investigaciones se han centrado en la elaboración e implementación de alternativas de tratamientos para intentar corregir las principales alteraciones clínicas de estos pacientes [5,6,14]. Dentro de las terapias actualmente en estudio, se encuentran la terapia de reemplazo enzimático (TRE), terapia de reducción de sustrato (TRS), trasplante de células madre hematopoyéticas, trasplante con células de cordón umbilical, o terapia génica principalmente con virus adenoasociados (AAV) [6]. A pesar de esto, estas alternativas han mostrado muy poca o nula efectividad en mejorar o revertir los síntomas en los pacientes con Sanfilippo B [6]. Adicionalmente, algunas de estas requieren tratamientos periódicos, lo que puede significar un alto costo para los pacientes y el sistema de salud [2,22]. Es por estas razones, que surge la necesidad de seguir en la búsqueda de nuevas opciones de tratamiento.

Dicho lo anterior, es oportuno mencionar las emergentes herramientas de edición genómica que han ganado popularidad en la última década por sus resultados prometedores en investigaciones que evalúan su implementación como terapia génica para el tratamiento de distintos tipos de enfermedades, como la anemia falciforme, la enfermedad de Huntington, la leucemia mieloide aguda (AML), entre muchas otras [14]. Dentro de las tecnologías de edición del genoma se encuentran TALENs (*transcription activator-like effector nuclease*), ZFNs (*zinc finger nucleases*) y CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats – crispr associated system 9*), de las cuales se destaca esta última por su fácil elaboración y manejo, y su bajo costo [6,14].

El tratamiento con CRISPR/Cas9 se basa en la posibilidad de modificar un genoma en una secuencia específica, por acción de una ARN guía y una proteína con actividad endonucleasa [13]. Si se inserta una secuencia homóloga en las células en conjunto con el sistema CRISPR/Cas9, el mecanismo de reparación homóloga de ADN será activado y se dará la respectiva inserción (*knock-in*) de la secuencia exógena [13,18]. Este mecanismo se convierte en un potencial terapéutico ya que permite proporcionar un cambio permanente e irreversible en la secuencia de ADN que puede revertir o mejorar los efectos de una enfermedad genética [6,13,14,18]. En el caso puntual de la MPS IIIB, lo que se busca es generar una corrección del gen *NAGLU* que permita la adecuada degradación del HS, y que esto en consecuencia reestablezca el funcionamiento normal de células, tejidos, órganos, y especialmente, del sistema nervioso central [1,3,4].

## **2. Justificación y planteamiento del problema**

Teniendo en cuenta que en la actualidad no hay una terapia aprobada para el tratamiento de la MPS IIIB, y que aquellas alternativas en evaluación han mostrado muy poca efectividad contra los síntomas de la enfermedad, se presenta CRISPR/nCas9 como una alternativa prometedora de terapia génica que hasta el momento no ha sido evaluada para este síndrome. Carvahlo y colaboradores evaluaron el uso de CRISPR/Cas9 en fibroblastos enfermos para corregir la mutación más común causante de la MPS I (síndrome de Hurler), evidenciando un aumento significativo en la actividad enzimática y disminución de la masa lisosomal [7]. Recientemente Leal & Alméciga-Díaz, 2022 demostraron el potencial uso de CRISPR/Cas9 para el tratamiento de MPS IVA, con una recuperación de fenotipo a niveles de wild-type [35], haciendo uso de una nicasa de Cas9 (CRISPR/nCas9) [44].

En consecuencia, en el presente estudio se evaluó el sistema CRISPR/nCas9 en fibroblastos MPS IIIB, con el fin de determinar si el uso de esta herramienta permite un aumento en la actividad enzimática de NAGLU y disminución de la masa lisosomal, y así aportar en la generación de conocimiento para el desarrollo de un tratamiento efectivo, capaz de corregir la alteración genética de esta enfermedad, y en un futuro, contribuir a la mejora de calidad y expectativa de vida de los pacientes.

## **3. Marco teórico**

### **3.1 Errores Innatos del Metabolismo**

Los Errores Innatos del Metabolismo (EIM) son un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas causadas por mutaciones espontáneas en genes que codifican para proteínas involucradas en el almacenamiento o ruta metabólica de ácidos grasos, lípidos o proteínas [30]. Estas mutaciones dan como resultado la generación de una gran variedad de afecciones que pueden incluir intoxicaciones, acidosis, deficiencias energéticas, o defectos a nivel de síntesis de moléculas complejas, con síntomas clínicos leves a graves, mayoritariamente neurológicos y psiquiátricos, que a menudo conducen a la muerte o discapacidad de por vida. [30, 31, 32].

La gran mayoría de EIM son enfermedades heredadas de manera autosómica recesiva, aunque hay algunas que pueden estar ligadas al cromosoma X [30, 31]. Hoy día hay más de 1500 EIM descritos, dentro de los que se encuentran las acidosis metabólicas, hipoglicemias, hiperamonemias, enfermedades de depósito lisosomal, ictericias, enfermedades mitocondriales, entre muchas otras [31]. Si bien estas son enfermedades raras o huérfanas, afectan en gran medida a la colectividad, teniendo una incidencia de 1 por cada 2500 nacidos vivos, lo que las hace bastante comunes [30]. Su diagnóstico temprano es crucial para la implementación de un tratamiento adecuado y lo suficientemente eficaz para prevenir la muerte y mejorar las complicaciones derivadas de estas enfermedades.

### **3.2 Enfermedades de depósito lisosomal**

Las enfermedades de depósito lisosomal (EDL) son un grupo de cerca de 50 EIM causadas por mutaciones en genes codificantes para enzimas lisosomales implicadas en la degradación de macromoléculas, transporte de productos del lumen del lisosoma a otros compartimentos celulares, modulación del entorno lisosómico o biogénesis lisosomal. La deficiencia de estas enzimas causa la acumulación progresiva de sustratos no degradados o parcialmente

degradados en el lisosoma, lo que a su vez genera la disfunción de procesos celulares tales como la homeostasis lipídica, viabilidad celular, autofagia, o reparación de la membrana plasmática [4, 19, 22,]. Algunas de las manifestaciones clínicas comunes que suelen indicar el padecimiento de una EDL incluyen la hepatoesplenomegalia, disostosis múltiple, rasgos faciales toscos, angioqueratomas y especialmente, el nivel de afectación del sistema nervioso central. Sin embargo, su diagnóstico puede ser complicado debido a la variabilidad clínica y a la inespecificidad de signos y síntomas de cada enfermedad, por lo que usualmente este requiere de pruebas de sangre, radiológicas, neurofisiológicas, bioquímicas y genéticas [19].

Las EDL son comúnmente clasificadas según el sustrato acumulado en: esfingolipidosis, mucopolisacaridosis, mucopolipidosis, oligosacaridosis, deficiencias en proteínas lisosomales de membrana, y otros sustratos [22]. Su prevalencia puede variar entre 7,5 y 23,5 por cada 100.000 individuos, lo que las convierte en las patologías más comúnmente presentadas dentro de los EIM [19, 22].

### 3.3 Mucopolisacaridosis IIIB

Las mucopolisacaridosis (MPS) son trastornos metabólicos causados por la deficiencia de enzimas involucradas en la degradación de GAGs, los cuales hacen parte de la matriz extracelular, cumpliendo funciones relacionadas con comunicación y diferenciación celular; por lo que se encuentran en varios tejidos del cuerpo como en cartílago, piel, córnea, vaso, tejido conectivo y vascular [1,3,4]. Esta deficiencia enzimática genera una acumulación de los GAGs a nivel lisosomal lo que da como resultado la disfunción progresiva de células, tejidos y órganos [3].

Existen 11 tipos de MPS, cuya clasificación depende del gen afectado y de la enzima deficiente [4]. En la Tabla 1 se muestran los diferentes tipos de MPS que existen, con su respectivo gen y enzima afectados.

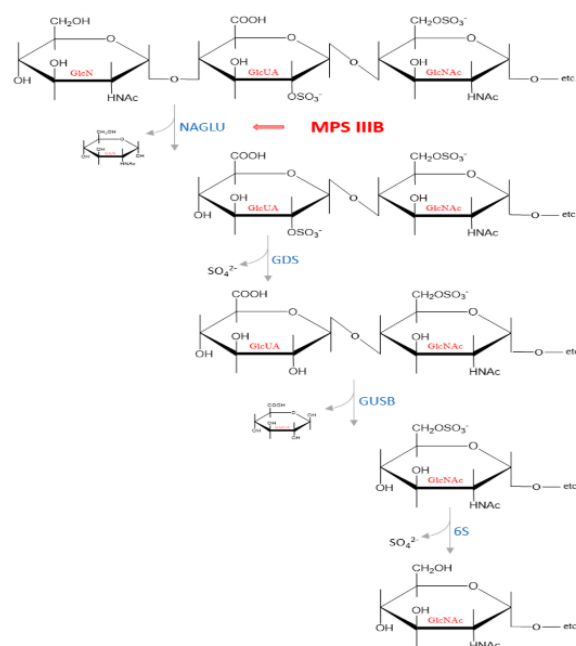
**Tabla 1.** Clasificación de mucopolisacaridosis.

<b>Enfermedad</b>	<b>Gen</b>	<b>Enzima deficiente</b>
MPS I (Síndrome de Hurler, Síndrome de Scheie)	<i>IDUA</i>	Alfa-L-iduronidasa
MPS II (Síndrome de Hunter)	<i>IDS</i>	Iduronato-2-sulfatasa
MPS IIIA (Síndrome de Sanfilippo A)	<i>SGSH</i>	Heparan-N-sulfatasa
MPS IIIB (Síndrome de Sanfilippo B)	<i>NAGLU</i>	$\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa
MPS IIIC (Síndrome de Sanfilippo C)	<i>HGSNAT</i>	AcetilCoa glucosamina N-acetiltransferasa
MPS IIID (Síndrome de Sanfilippo D)	<i>GNS</i>	N-acetil-glucosamina-6-sulfatasa
MPS IVA (Síndrome de Morquio A)	<i>GALNS</i>	N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa

MPS IVB (Síndrome de Morquio B)	<i>GLBI</i>	$\beta$ -galactosidasa
MPS VI (Síndrome de Maroteaux-Lamy)	<i>ARSB</i>	Arilsulfatasa B
MPS VII (Síndrome de Sly)	<i>GUSB</i>	$\beta$ - glucuronidasa
MPS IX	<i>HYALI</i>	Hialuronidasa

Las manifestaciones clínicas, edad de presentación, complicaciones, tratamientos y diferentes formas de la patología varían dependiendo del gen y GAG afectado [1]. Sin embargo, este tipo de enfermedades suelen manifestarse en los primeros años o durante la primera década de vida de los afectados, con hepatoesplenomegalia, facies toscas y malformaciones a nivel óseo siendo las afecciones clínicas más comunes entre las diferentes MPS [2]. Algunas MPS presentan trastornos cognitivos, impedimentos a nivel visual y auditivo, o incluso limitación en la movilidad articular; algunos pacientes pueden vivir hasta su adolescencia y otros hasta los 40 años [1, 2, 9].

Particularmente, la Mucopolisacaridosis IIIB (MPS IIIB, síndrome de Sanfilippo B, OMIM #252920), es una enfermedad autosómica recesiva causada por la acumulación de heparán sulfato (HS) parcialmente degradado en el lisosoma, generada por la deficiencia enzimática de la  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa (NAGLU, EC:3.2.1.50), como consecuencia de mutaciones en el gen *NAGLU*, localizado en el locus 17q21, que codifica para esta enzima [3]. NAGLU está involucrada en el metabolismo del HS, específicamente en la hidrólisis de los residuos de N-acetilglucosamina en el extremo no reductor del HS, generados durante la degradación de este GAG en el lisosoma [3,4]. La deficiencia de la enzima NAGLU genera una acumulación anormal de HS en el lisosoma de la célula, lo que lleva a un aumento en la masa lisosomal que en consecuencia ocasiona afectación en las funciones de movilidad y principalmente en el SNC [3,9]. En la **Figura 1** se muestra el mecanismo de acción de la enzima NAGLU y el GAG involucrado.



**Figura 1.** Ruta de degradación del heparán sulfato donde se indican distintas enzimas que actúan en sitios y etapas particulares causando distintos tipos de MPS según sus deficiencias. Kaczor-Kaminska, 2022 [33].

Este tipo de MPS se caracteriza por un deterioro progresivo del sistema nervioso central, lo cual incluye retraso neurológico y trastornos cognitivos. A nivel de rasgos morfológicos, los pacientes pueden presentar macroglosia, cejas pobladas, labio inferior grueso y evertido, dolicocefalia, baja talla y surco nasolabial prominente. Sin embargo, no son rasgos distintivos de la enfermedad, debido a que estos pueden o no presentarse [1,9]. Los primeros síntomas se pueden presentar entre los 2 a 6 años de vida, con trastornos de conducta como la hiperactividad, ansiedad y el comportamiento agresivo, también el lento desarrollo del lenguaje y, asimismo, problemas en las habilidades motoras [3,4,9]. A medida que va progresando la enfermedad se pueden presentar trastornos del sueño, espasticidad y convulsiones en un 60-70% [4,9]. Por otro lado, a diferencia de otras MPS, como la MPS I y IV, presenta muy poca afectación a nivel esquelético [9].

### **3.4 Opciones terapéuticas**

#### **3.4.1 Terapia de reemplazo enzimático (TRE)**

Esta terapia consiste en suministrar al paciente la enzima funcional, en este caso NAGLU, la cual puede ser producida a partir de células humanas, de mamíferos, bacterias o incluso levaduras, usando técnicas de ADN recombinante [10]. La TRE es utilizada actualmente en Mucopolisacaridosis I, II, IVA, VI y VII [22]. Sin embargo, presenta deficiencias a nivel de eficacia como tratamiento ya que las enzimas introducidas a nivel intravenoso pueden llegar a acumularse en tejidos del hígado o bazo, lo que limita la llegada de estas a los tejidos afectados. Incluso, su entrada al SNC es nula, al no lograr atravesar la barrera hematoencefálica [29], lo cual disminuye el efecto terapéutico deseado teniendo en cuenta que es el sistema de principal afección de esta enfermedad. Asimismo, puede desencadenar una respuesta inmune por parte del cuerpo, lo que afecta su propósito. Finalmente, es una terapia que se debe realizar de forma periódica, lo cual puede ser dispendioso para el paciente, su familia y el sistema de salud [6].

#### **3.4.2 Terapia de reducción de sustrato (TRS)**

La TRS consiste en utilizar una molécula que inhiba la biosíntesis de los compuestos que se acumulan debido a la deficiencia de una enzima, lo cual generaría un equilibrio en la célula y, por ende, una posible reducción de la sintomatología. En comparación con la TRE, la TRS puede llegar a disminuir la acumulación de compuestos a nivel cerebral, la administración es oral y es menos probable que se genere una respuesta inmune en el organismo [11]. Sin embargo, tiene desventajas tales como un tratamiento continuo y periódico, lo cual puede llegar a ser molesto para el paciente. A nivel *in vivo*, la genisteína, una de las primeras moléculas propuestas para la TRS, no mostró disminución de los síntomas y además se prevé que sus efectos secundarios por inhibición no específica pueden ser considerables y perjudiciales para el paciente [6,23]. En este sentido, es importante seguir explorando moléculas que puedan lograr de forma efectiva reducir la síntesis del sustrato y demostrar efecto terapéutico.

### **3.4.3 Trasplante de células madre hematopoyéticas**

Este tratamiento se basa en el trasplante de células madre hematopoyéticas que reemplazan las células que contienen la deficiencia enzimática. Estas células madre son usadas por su gran capacidad de proliferar en ciertos tipos de compartimentos tisulares y por sus propiedades de autorrenovación [12]. Ya ha sido empleado para la MPS I, donde ha demostrado éxito en prolongar la supervivencia, retrasar el deterioro cognitivo, y conducir a mejoras en la hepatoesplenomegalia [6]. Sin embargo, uno de los mayores retos y desventajas es encontrar un donante compatible, lo cual demora el tratamiento y con ello, genera más riesgos que posibles soluciones [6]. Para el caso de MPS III, el trasplante de células madre hematopoyéticas no ha mostrado efectos significativos, y en el momento no se encuentra entre las opciones de tratamiento recomendadas para estos pacientes [24].

### **3.4.4 Trasplante con células del cordón umbilical**

Este tipo de trasplante se ideó para generar una mayor eficiencia en el tratamiento en comparación con el trasplante de células madre hematopoyéticas. Ha sido implementado en pacientes con MPS IIIA y MPS IIIB. Se planteó como tratamiento para pacientes sin inicio de síntomas de deterioro neurológico. Aun así, los pacientes tratados muestran deterioro neurológico progresivo, alteración de comportamiento y pérdida de habilidades cognitivas, lo cual evidencia su nula efectividad [15].

### **3.4.5 Terapia génica**

#### ***3.4.5.1 Virus adenoasociados (AAV)***

Esta terapia se ha usado en investigaciones para el tratamiento de MPS I, II, IIIA, IIIB, IVA, VI, VII [6,34]. Asimismo, se muestra como potencial tratamiento ya que los virus adenoasociados presentan tropismo por las células que se desean tratar mediante la elección del serotipo, no son patógenos y pueden persistir a largo plazo, incluso, sin integrarse al genoma del hospedero, lo que los convierte en un vector potencial de terapia génica [16]. Desafortunadamente, es un tratamiento que puede generar respuesta inmune o inducir hepatocarcinomas [6]. Para el caso de la MPS III diferentes estudios han mostrado la posibilidad de reducir la acumulación de GAGs en líquido cefalorraquídeo y la posibilidad de prevenir o disminuir el progreso de las manifestaciones sobre el sistema nervioso central [24]. Sin embargo, hasta el momento ninguno de estos tratamientos ha sido aprobado.

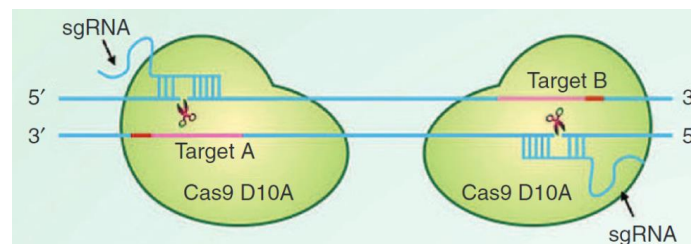
#### ***3.4.5.2 CRISPR/Cas9***

CRISPR/Cas9 es una herramienta molecular de edición genética que se utiliza para modificar el genoma de cualquier tipo de célula y organismo [18]. CRISPR hace referencia a secuencias cortas repetidas palindrómicas que están agrupadas y regularmente interespaciadas [13]. El sistema CRISPR/Cas9 está compuesto por dos partes principales: un RNA guía de cadena simple (gRNA o sgRNA) que dirige a la proteína Cas9 hacia la secuencia de ADN a editar, y una proteína nucleasa Cas9 que genera cortes de doble cadena (DSB) en la secuencia de ADN. El gRNA debe ser una secuencia de más o menos 20 pb complementaria a la secuencia objetivo de ADN a modificar, y esta debe estar seguida de una corta secuencia de ADN corriente arriba, conocida como la secuencia PAM, para asegurar la compatibilidad con la proteína Cas9 [14].



Hay varios tipos de sistema CRISPR-Cas, dependiendo de la variación estructural y organización del gen *Cas*. Sin embargo, el sistema más utilizado a nivel terapéutico es el CRISPR/Cas9 tipo II, el cual involucra una única proteína Cas de origen bacteriano, usualmente derivada de *Streptococcus pyogenes* [6].

La endonucleasa Cas9 está compuesta por dos dominios principales, HNH y RuvC, de los cuales cada uno corta una hebra de ADN; el dominio HNH corta la hebra antisentido, mientras que el dominio RuvC la hebra sentido [13]. Sin embargo, existe una versión nicasa de Cas9 (nCas9), que se caracteriza por estar mutada para que únicamente uno de los dos dominios de la endonucleasa este activo [25,26]. Esta mutación permite generar un corte de cadena sencilla, en cada hebra de ADN, mediado por dos gRNA ubicados adyacentemente en las hebras opuestas. Una vez el gRNA se une, por complementariedad de bases, a la secuencia de ADN a modificar, las proteínas nCas9 generan los cortes de cadena sencilla y se inducen los mecanismos de reparación del ADN: la vía de reparación no homóloga o la vía de reparación homóloga [17]. En este caso, se busca inducir la vía de reparación homóloga utilizando como secuencia donante la secuencia correcta del gen *NAGLU*. Esta versión nicasa de la nucleasa Cas9 ha demostrado una menor tasa de efectos *off-target*, respecto a la variante *wild-type* [28]. En la **Figura 2** se muestra el mecanismo de acción del sistema CRISPR/nCas9.



**Figura 2.** Esquema general del mecanismo de acción del sistema CRISPR/nCas9. Tomado de: Zhang et al., 2015 [25].

### 3.4.5.3 CRISPR/Cas9 y CRISPR/nCas9 como terapia génica

Varios estudios han demostrado el potencial terapéutico de CRISPR/Cas9 en la corrección de mutaciones en el genoma que derivan en enfermedades genéticas. Yin et al. realizaron un estudio en un modelo murino de la tirosinemia hereditaria humana en donde lograron corregir la mutación en hepatocitos en un 33.5% luego de 33 días del tratamiento junto con la inoculación del sistema CRISPR/Cas9 [20]. En el caso de las mucopolisacaridosis, Carvalho y colaboradores realizaron un estudio de edición génica mediada por CRISPR/Cas9 en fibroblastos MPS I (Síndrome de Hurler), logrando corregir 7% de los alelos de fibroblastos al día 15 y 4% al día 30, con un aumento de la actividad enzimática de IDUA entre 4- 20% y una disminución de masa lisosomal en un 25% [7].

En cuanto al sistema CRISPR/nCas9, este fue implementado en el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo de la Pontificia Universidad Javeriana en el tratamiento de fibroblastos de tres enfermedades de depósito lisosómico distintas, Enfermedad de Tay-Sachs, Enfermedad de Sandhoff y Mucopolisacaridosis IVA (Síndrome de Morquio), logrando un aumento de la actividad enzimática correspondiente, respecto a fibroblastos sanos, de un ~10, ~13 y ~40%, respectivamente [35, 48].

### 3.5 Situación en Colombia

Las enfermedades de almacenamiento lisosomal (EDL) en Colombia han sido estudiadas progresiva y recientemente en el país. Por medio de la Ley de Enfermedades Huérfanas de Colombia se ha impulsado la recolección de datos a partir de informes de enfermedades como MPS y otros EDL para la mejora del diagnóstico, tratamiento e investigación de estas patologías, ya que se ha evidenciado la falta de atención hacia estas, por medio de la falta de accesibilidad de los pacientes a la atención hospitalaria y a recursos analíticos especializados [19]. En cuanto a la mucopolisacaridosis III, en Colombia afecta a 0,17 por cada 100.000 nacidos vivos, localizados mayormente en Boyacá, lo que ha causado interés en la investigación y comprensión de la enfermedad para la búsqueda de opciones de tratamiento y manejo de los pacientes [19]. Dentro de los tratamientos utilizados actualmente se encuentran TRE (para MPSI, MPSII, MPSIVA, MPSIV y MPSVII) y terapia con células madre hematopoyéticas, sin embargo, se desea estudiar áreas como la terapia génica, edición del genoma y proteínas recombinantes, ya que estudios prueban su potencial como tratamiento para esta enfermedad, con la ventaja de ser terapias de una sola dosis y que principalmente, contribuirían a mejorar la calidad de vida de los pacientes [19]. A la fecha, de acuerdo con el Sistema de Salud Pública (SIVIGILA) en Colombia se han registrado 24 pacientes con MPS III [27] aunque este número puede ser muy inferior al número real de pacientes afectados por esta patología en nuestro país, principalmente por problemas de subregistro o en el diagnóstico.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del uso de la herramienta de edición genómica CRISPR/nCas9 sobre la actividad enzimática de la N-acetilglucosaminidasa y acumulación lisosomal en fibroblastos de pacientes con Mucopolisacaridosis IIIB.

### 4.2 Objetivos específicos

- Diseñar un vector donante que contenga un casete de expresión con la secuencia codificante del gen *NAGLU*.
- Determinar el efecto del uso de CRISPR/nCas9 sobre la actividad enzimática de *NAGLU* en fibroblastos de pacientes con mucopolisacaridosis IIIB.
- Determinar el efecto del uso de CRISPR/nCas9 sobre la acumulación lisosomal en fibroblastos de pacientes con mucopolisacaridosis IIIB.

## 5. Metodología

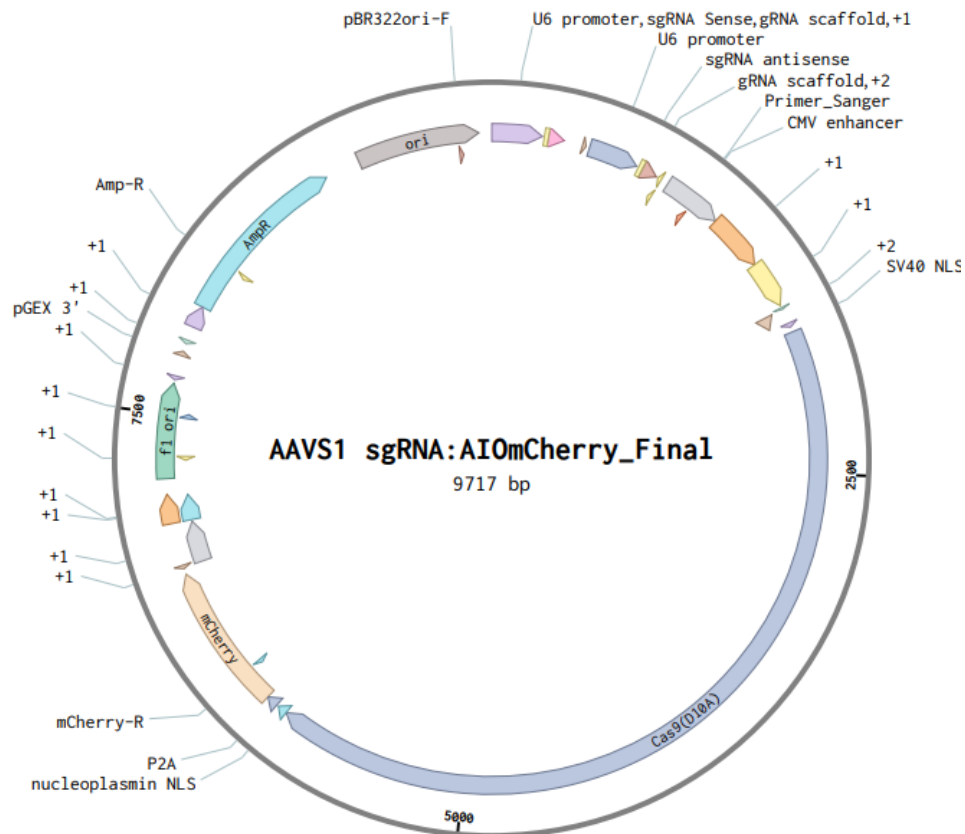
### 5.1 Cultivos celulares

Fibroblastos primarios de pacientes con MPS IIIB (GM002931), así como fibroblastos *wild-type* (GM00613) fueron obtenidos del Instituto Coriell y mantenidos en frascos de cultivo de 75cm<sup>2</sup> con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con suero fetal bovino al 15% + penicilina/estreptomicina 1X. Asimismo, células embrionarias humanas de riñón (HEK293FT), fueron obtenidas de Invitrogen y mantenidas en frascos de cultivo de 25cm<sup>2</sup> con medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% + penicilina/estreptomicina 1X. Todos los ensayos se realizaron con células entre pases 5 y 15.

## 5.2 Construcción de vectores

### 5.2.1 Vector con sistema CRISPR/nCas9

El vector con el sistema CRISPR/nCas9 fue obtenido del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo de la Pontificia Universidad Javeriana [35]. El vector contiene las secuencias para dos gRNA clonados en conjunto con nCas9 (D10A), diseñados para generar un corte de cadena doble del ADN en el *locus* AAVS1 del genoma humano.



**Figura 3. Mapa representativo del vector con el sistema CRISPR/nCas9.** Es un vector de 9.717 pb. Se destaca la secuencia del gen de la proteína Cas9 (D10A) de 4.000 pb aproximadamente y las secuencias para el gRNA sentido (*sgRNA Sense*), y el gRNA antisentido (*sgRNA antisense*).

### 5.2.2 Construcción de vector Donor AAVS1: NAGLU

#### 5.2.2.1 Diseño y obtención de cebadores

El diseño de los cebadores para el gen *NAGLU* humano se realizó mediante la implementación de la plataforma bioinformática Primer-BLAST de NCBI a partir de la secuencia referenciada en el sistema para el ARN mensajero del gen *NAGLU*. Los cebadores fueron diseñados para amplificar todo el marco abierto de lectura del gen *NAGLU* y tienen los sitios para las enzimas de restricción *MfeI* y *MluI*.  
NAGLU\_Fw\_USA: 5'CAATTGATGGAAGCCGTGGCTGTCG3'.  
NAGLU\_Rv\_USA: 5'ACGCGTCCAACCTACCAGCCACCCAT3'.

### 5.2.2.2 Obtención de vector Donor AAVS1: Empty

El vector donante denominado Donor AAVS1:Empty fue obtenido del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo de la Pontificia Universidad Javeriana [35]. Bacterias quimiocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  fueron transformadas con el vector donante mediante choque térmico. Posteriormente, una colonia proveniente de cultivo axénico fue servida en caldo LB suplementado con kanamicina a una concentración de 50  $\mu$ g/ml en un volumen de 10 mL. Se dejó en incubación durante 16 h a 37°C y 250 rpm, y terminado el período de incubación, se procedió a hacer la extracción del ADN plasmídico utilizando el kit ZymoPURE™ Plasmid Miniprep kit (Zymo Research, Cat. No. D4210), según las indicaciones del fabricante.

### 5.2.2.3 Construcción de vector Donor AAVS1: NAGLU

#### 5.2.2.3.1 Obtención de vector pSAM::NAGLU

El plásmido con la secuencia codificante del gen *NAGLU* (pSAM::NAGLU) fue donado por la Dra. Michelina Lacovino, del The Lundquist Institute Harbor-UCLA Medical Cent., California, USA. El plásmido fue transformado en células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  cultivadas en agar LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ml). Posterior a eso, una colonia proveniente del cultivo axénico fue servida en caldo LB también suplementado con ampicilina a una concentración de 100  $\mu$ g/ml en un volumen de 10 mL. Se dejó en incubación durante 16 h a 37°C y 250 rpm, y terminado el período de incubación, se procedió a hacer la extracción del ADN plasmídico utilizando el kit ZymoPURE™ Plasmid Miniprep kit, según las indicaciones del fabricante. Una vez extraído el plásmido, este fue verificado mediante una PCR convencional con los cebadores diseñados en el numeral 5.2.2.1.



**Figura 4. Mapa representativo del vector pSAM::NAGLU.** Es un vector de 12.843 pb y se destaca una secuencia del gen *NAGLU* de 2.000 pb aproximadamente.

#### **5.2.2.3.2 Validación de vector pSAM::NAGLU**

Un ensayo de validación inicial se realizó en células HEK293FT mediante la transfección del plásmido pSAM::NAGLU haciendo uso de Lipofectamina 3000 (*ThermoFisher*, USA) para confirmar la expresión del gen *NAGLU* mediante ensayos de actividad enzimática. Para el respectivo ensayo, 80.000 células/pozo mantenidas en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% + penicilina/estreptomicina 1X, fueron servidas en placa de 12 pozos y se dejaron en incubación por 24 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Una hora antes de la transfección, se hizo cambio de medio a las células. Luego, las células fueron transfectadas con 0,5 µg del plásmido pSAM::NAGLU utilizando Lipofectamina 3000, y se dejaron en incubación a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 48h. Las células sin tratar fueron empleadas como control. Luego de las 48h, las células fueron tripsinizadas, colectadas por centrifugación y lisadas haciendo uso de un buffer (acetato de sodio 0,2M a pH 4,5, Triton X-100 al 0,5% y PMSF 1mM) [43]. Las células fueron ubicadas en hielo durante 20 min. El ensayo fue realizado con 50µl del lisado celular mezclados con 50µl del sustrato 4-metilumbeliferil-β-glucuronido a una concentración de 2mM en placas de fluorimetría de 96 pozos, de acuerdo a lo reportado previamente por Tropak et al., 2013 [43]. Se dejó la placa en incubación a oscuridad por 1 h a 37°C, luego, se agregaron 150 µl de buffer glicina (glicina 12,6 g/L, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 18 g/L, pH 9,8) por pozo para detener la reacción, y se procedió a medir la actividad con un fluorómetro a una longitud de onda de 365/450. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 nmol de sustrato por hora. La actividad se midió primero en URF (unidades relativas de fluorescencia) y los datos fueron comparados con una curva estándar de 4-metilumbeliferona. La proteína fue cuantificada haciendo uso del kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay Kit (*ThermoFisher*, Ref.23227). Los niveles de actividad se reportan como enzimática específica, medida en U/mg.

#### **5.2.2.3.3 Clonaje de secuencia codificante del gen NAGLU en pJET1.2**

Tras la validación, se realizó una PCR convencional con Q5 de alta fidelidad (NEB, #M0491), haciendo uso de los cebadores diseñados en el numeral 5.2.2.1, para la amplificación de todo el marco abierto de lectura del gen *NAGLU* y los sitios para las enzimas de restricción *MfeI* y *MluI*. Una vez obtenido el amplicón, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,7% para la extracción de ADN por medio de la utilización del kit comercial GeneJET Gel Extraction Kit (*ThermoFisher*, #K0692). Una vez extraída y purificada la secuencia del gen *NAGLU*, se insertó en el vector de clonación pJET1.2 utilizando el kit comercial CloneJET PCR Cloning kit (*ThermoFisher*, #K1232), según las indicaciones del proveedor. Una vez insertada la secuencia amplificada en el vector pJET1.2, se transformó en células quimiocompetentes de *E. coli* DH5α, se sirvieron 10 colonias en caldo LB con ampicilina (100 µg/ml), y se hizo la extracción de ADN plasmídico correspondiente mediante el kit ZymoPURE™ Plasmid Miniprep kit, según las indicaciones del fabricante. Una vez extraído el ADN, se realizó una PCR con los cebadores NAGLU\_Fw\_USA y NAGLU\_Rv\_USA, y electroforesis en gel de agarosa al 1% a todos los clones obtenidos, para confirmar la inserción del gen *NAGLU*. Aquellos clones recombinantes se analizaron por secuenciación Sanger (Macrogen).

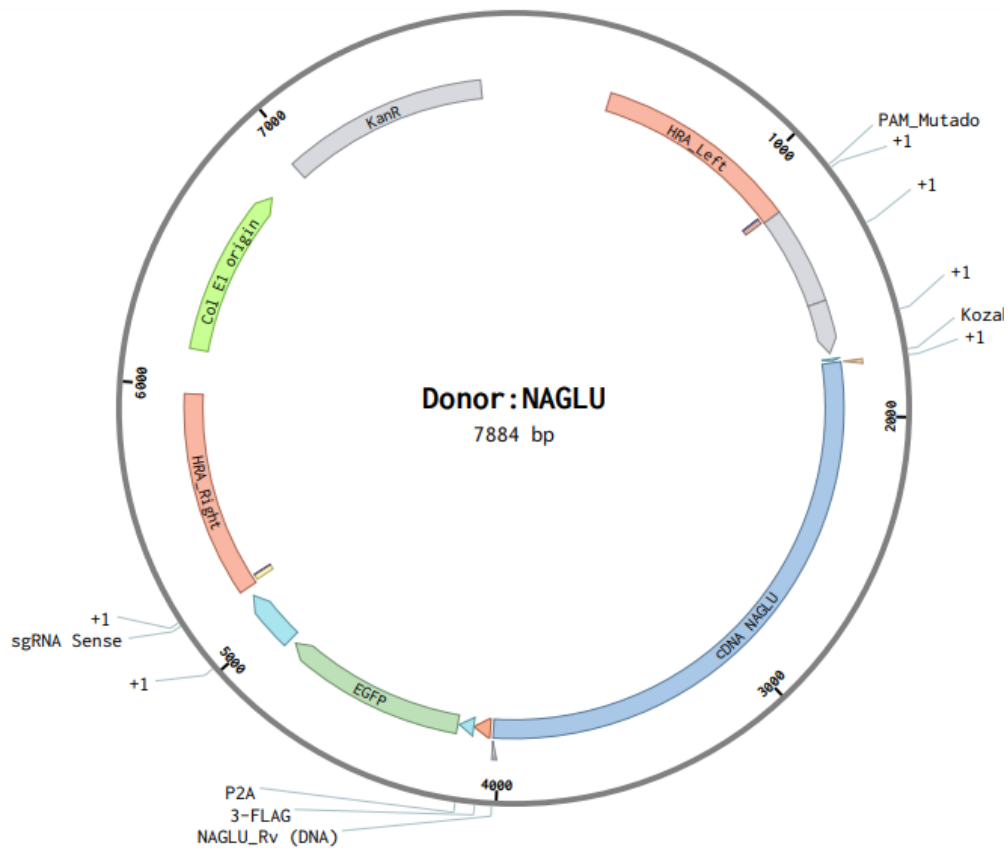
#### **5.2.2.3.4 Subclonaje de secuencia codificante del gen NAGLU en vector Donor AAVS1:Empty**

Luego de confirmada la secuencia, se procedió a hacer una digestión enzimática en el plásmido recombinante obtenido en el numeral 5.2.2.3.3 y el vector Donor AAVS1:Empty con las

enzimas *MfeI*-HF y *MluI*-HF. Posterior a esto, se insertó la secuencia del gen *NAGLU* en el vector Donor AAVS1:Empty haciendo uso la ligasa de ADN T4 (NEB, #M0202S). Para esto, 25 ng de vector Donor AAVS1:Empty y 68,75 ng de inserto (para una relación 7:1 inserto/vector) fueron mezclados con 1 µl de ligasa T4 y dejados a 4°C por 16 h para permitir la reacción. Una vez pasadas las 16 h, se transformó el producto de ligación en células quimiocompetentes de *E.coli* DH5α, se sirvieron 5 colonias en caldo LB suplementado con kanamicina (50 µg/ml), y se realizó la extracción de ADN plasmídico mediante el kit ZymoPURE™ Plasmid Miniprep kit. Una vez realizada la extracción, se hizo una digestión enzimática *screening* con las enzimas *MfeI*-HF y *MluI*-HF para confirmar la construcción del vector Donor AAVS1:NAGLU. Los clones positivos fueron analizados por secuenciación Sanger (Macrogen) utilizando los *primers* universales EGFP\_NR (5'CGTCGCCGTCAGCTC3') y CMV\_F (5'CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG3').

#### 5.2.2.3.5 Validación de vector Donor AAVS1:NAGLU

El ensayo de validación se realizó en células HEK293FT siguiendo el mismo protocolo descrito en el numeral 5.2.2.3.2, para confirmar la expresión del gen *NAGLU* en el nuevo vector Donor AAVS1:NAGLU mediante ensayos de actividad enzimática.



**Figura 5. Mapa representativo del vector Donor AAVS1:NAGLU.** Es un vector de 7.884 pb con una secuencia del gen *NAGLU* de 2.000 pb aproximadamente.

### **5.3 Transfección de vectores en fibroblastos humanos**

Para los ensayos de transfección, 30.000 células/pozo fueron servidas en placas de 12 pozos y se dejaron en incubación por 24 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. La transfección de los vectores se realizó 24h después con Lipofectamina 3000 según las indicaciones del proveedor. Para ello, se hizo cambio de medio una hora antes y después las células fueron transfectadas con 1 µg de ADN total (0,5 µg del vector con el sistema CRISPR/nCas9 y 0,5µg del vector Donor AAVS1:NAGLU). Brevemente, 0,5 µg del vector con el sistema CRISPR/nCas9 y 0,5µg del vector Donor AAVS1:NAGLU fueron mezclados con medio OPTI-MEM y reactivo P3000 en tubos de microcentrífuga. Por aparte, el reactivo Lipofectamina 3000 se diluyó en medio OPTI-MEM, se mezcló, y se le añadió la mezcla del tubo 1. La mezcla se dejó en incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se añadió a las células asegurando una distribución homogénea de esta. Fibroblastos *wild-type* fueron utilizados como controles normales. Fibroblastos tratados únicamente con 0,5µg del vector Donor AAVS1:NAGLU fueron incluidos como control para determinar el impacto de la expresión episomal de los vectores.

### **5.4 Actividad enzimática de NAGLU en fibroblastos de pacientes MPS IIIB**

La actividad enzimática de NAGLU en los fibroblastos de pacientes con MPS IIIB y controles normales se midió a los 12 y 30 días luego de la transfección de las células siguiendo el mismo protocolo descrito en el numeral 5.2.2.3.2.

### **5.5 Acumulación lisosomal en fibroblastos de pacientes MPS IIIB**

#### ***5.5.1 Glicosaminoglicanos totales***

Para determinar el efecto del tratamiento de fibroblastos MPS IIIB con CRISPR/nCas9 y Donor AAVS1:NAGLU sobre la acumulación de sustratos, se midieron glicosaminoglicanos (GAGs) totales en medio extracelular haciendo uso del reactivo azul de 1,9-dimetilmetileno (DMB), bajo un protocolo estandarizado en el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo de la Pontificia Universidad Javeriana [35]. Para este, medio de cultivo sobrenadante de cada grupo experimental fue recolectado cada 3 días y almacenado en tubos de microcentrífuga a -20°C. Pasados los 30 días luego de la transfección de las células, se hizo un pool de todos los medios recolectados de cada grupo experimental, se mezclaron y se tomaron 50 µl de cada pool para mezclarlos con 275 µl de DMB al 1% p/v - 2M Tris-Base. Se midió la absorbancia de cada muestra a 520 nm dentro de los primeros 5 minutos de reacción utilizando un espectrofotómetro BioSpec-1601. Se utilizó una curva de calibración de sulfato de condroitina para su medición.

#### ***5.5.2 Medición de masa lisosomal***

Para medir la masa lisosomal luego de la transfección de las células, se realizó cuantificación de lisosomas por citometría de flujo pasados los 30 días *post*-transfección [35]. Para ello, fibroblastos GM002931 transfectados y no transfectados, y controles normales (GM00613) fueron tratados con LysoTracker Deep Red (50nM) e incubados a 37°C/5% CO<sub>2</sub> durante 1 hora. Transcurrido el tiempo de incubación, se pasó a observar las células en microscopio de epifluorescencia con el filtro DsRED a un aumento de 10X. Seguido de esto, se tripsinizaron las células con 400 µl de tripsina por pozo, se centrifugaron a 1600 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante, se lavaron con 400 µl de PBS 1X, y se volvieron a centrifugar. Una vez centrifugadas las células, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 100 µl de buffer HBBS con yoduro de propidio (1/1000) para evaluar la viabilidad celular. Finalmente,

se analizó la intensidad media de fluorescencia de los diferentes grupos experimentales haciendo uso de un citómetro BD FACSAria™ III Cell Sorter. Para analizar los resultados obtenidos en citometría se utilizó el software FlowJo 10.8.1, y para el procesamiento de las imágenes de epifluorescencia, Image J.

## 5.6 Análisis estadístico

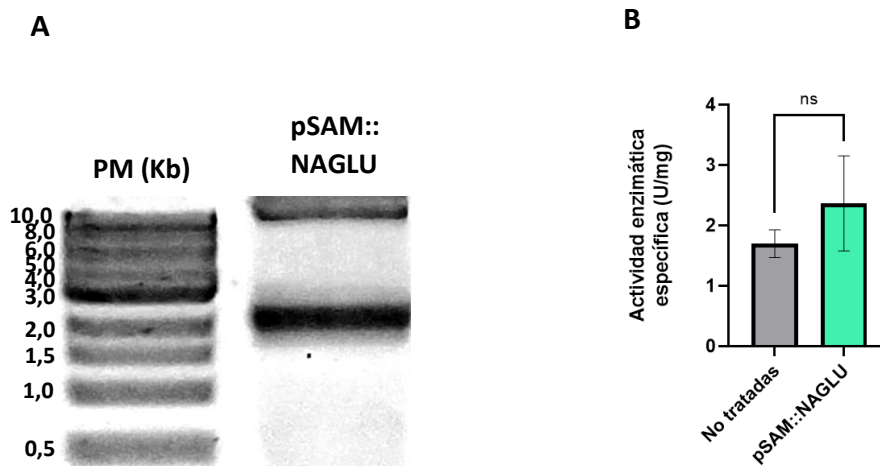
Los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism. Los resultados de actividad enzimática en células HEK293 FT se analizaron por medio de una prueba T-Student. Por su parte, los resultados de actividad enzimática y masa lisosomal (intensidad media de fluorescencia de LysoTracker Deep Red y GAGs) en fibroblastos se analizaron por una prueba ANOVA seguida de una prueba Tukey. Se aseguró la distribución normal e igualdad de varianza de los datos. Todas las pruebas se realizaron con un nivel de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ).

## 6. Resultados

### 6.1 Validación vector pSAM::*NAGLU*

El plásmido pSAM::*NAGLU* recibido presenta un tamaño de 12,8 kb, con una secuencia del gen *NAGLU* de 2.319 pb, datos consistentes con los resultados obtenidos luego de la PCR realizada con los cebadores *NAGLU\_Fw\_USA* y *NAGLU\_Rv\_USA*, en la cual se obtuvieron 2 productos, uno de aproximadamente 10 kb y el otro de unos 2,3 kb (**Figura 6A**). Estos resultados confirman la presencia del gen *NAGLU* en el plásmido recibido del The Lundquist Institute Harbor-UCLA Medical Center.

Posteriormente, para confirmar la funcionalidad de la proteína *NAGLU*, se hizo el respectivo ensayo de actividad enzimática en células HEK293FT con el sustrato 4-MUG, obteniendo valores promedio de 2,36 U/mg de actividad en las células tratadas con el vector pSAM::*NAGLU* y de 1,70 U/mg para las células tratadas únicamente con Lipofectamina 3000 (no tratadas), lo que equivale a un aumento del 66.6% de la actividad enzimática de *NAGLU* con respecto a las células no tratadas (**Figura 6B**), tras 48 h de la transfección. Este aumento no fue estadísticamente significativo ( $p=0,1908$ ).

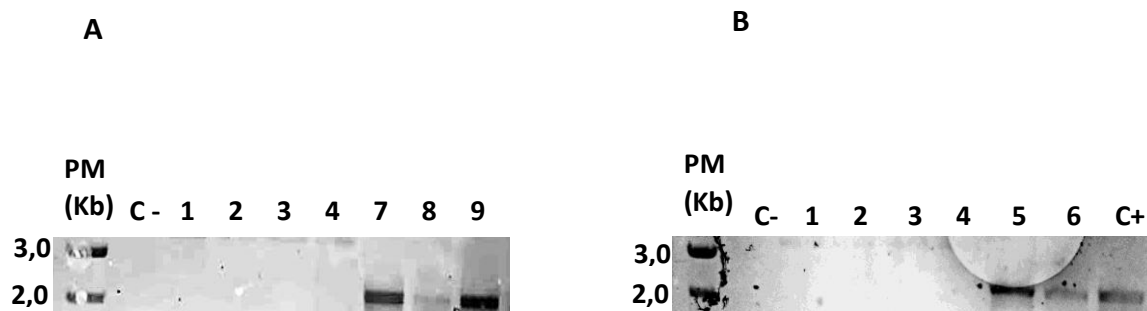




**Figura 6. Validación de vector pSAM::NAGLU por PCR, electroforesis y ensayo de actividad enzimática.** **A)** Gel de agarosa al 1% con productos de PCR amplificados con los cebadores NAGLU\_Fw\_USA y NAGLU\_Rv\_USA. **B)** Actividad enzimática específica de NAGLU determinada en células HEK293 FT no tratadas y transfectadas con el plásmido pSAM::NAGLU, 48 h luego del tratamiento ( $p=0,1908$ ;  $n=3$ ).

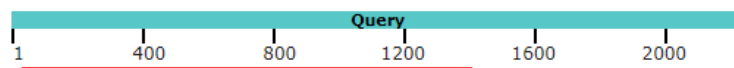
### 6.2 Clonaje de secuencia codificante del gen *NAGLU* en pJET1.2

El vector de clonación pJET1.2/blunt es un plásmido comercial que pesa 2.974 pb que al insertarle la secuencia del gen *NAGLU* proveniente del vector pSAM::NAGLU tiene un peso final de 5.294 pb. Luego de realizar el proceso de ligación con el kit CloneJET PCR Cloning kit (*ThermoFisher*, #K1232) a partir del producto de PCR amplificado, haciendo uso de la ligasa de ADN T4, y de obtener los clones recombinantes, se pasó a evaluar los clones positivos con una PCR convencional utilizando los cebadores NAGLU\_Fw\_USA y NAGLU\_Rv\_USA. Se obtuvieron 5 clones positivos para la amplificación del gen *NAGLU*: 5, 6, 7, 8 y 9, con un producto de PCR de 2,3 kb aproximadamente (**Figura 7A y B**), lo que sugiere la recombinación del fragmento de ADN del gen *NAGLU* en el sitio múltiple de clonación del vector pJET1.2. Estos 5 clones positivos fueron analizados por secuenciación Sanger (Macrogen) utilizando los primers NAGLU\_Fw\_USA y NAGLU\_Rv\_USA. De los 5 clones únicamente el clon 7 presentó una secuencia del gen *NAGLU* consistente con el fragmento de *NAGLU* del vector pSAM::NAGLU y contenía las secuencias respectivas para las enzimas de restricción *MfeI* y *MluI*. De igual forma, esta presentó un % de identidad del 97% para las secuencias amplificadas tanto en sentido *forward* como *reverse* según el alineamiento realizado en BLAST (**Figura 7C**).

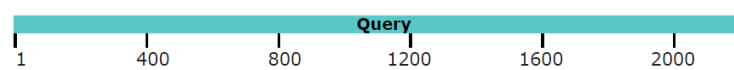


**C**

#### Distribution of the top 1 Blast Hits on 1 subject sequences



#### Distribution of the top 1 Blast Hits on 1 subject sequences

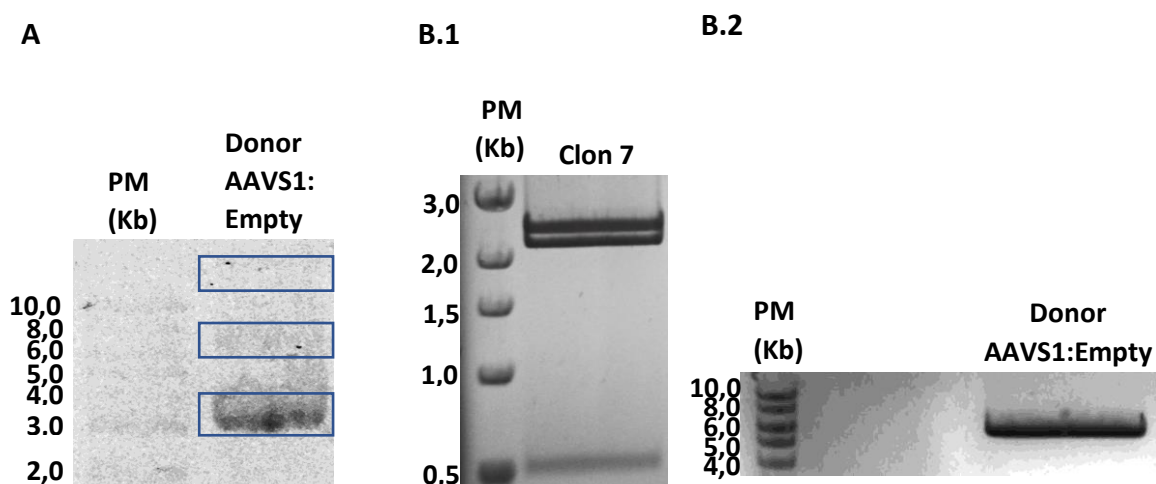


**Figura 7. Evaluación de la clonación de la secuencia del gen *NAGLU* en el vector pJET1.2.** A) Gel de agarosa al 1% con productos de PCR de los clones 1, 2, 3, 4, 7, 8, y 9 amplificados con *NAGLU\_Fw\_USA* y *NAGLU\_Rv\_USA*. C-: control negativo. B) Gel de agarosa al 1% con productos de PCR de los clones 1, 2, 3, 4, 5 y 6 amplificados con los cebadores *NAGLU\_Fw\_USA* y *NAGLU\_Rv\_USA*. C-: control negativo. C+: control positivo. El control positivo corresponde al vector pSAM::*NAGLU*. C) Resumen gráfico de la alineación entre la secuencia de *NAGLU* insertada en el vector pJET1.2 (línea roja) y la secuencia de *NAGLU* presente en el vector pSAM::*NAGLU* (Query, línea azul). La imagen superior corresponde al alineamiento de la secuencia de *NAGLU* en el vector pJET1.2 amplificada con el cebador *NAGLU\_Fw\_USA*. La imagen inferior corresponde al alineamiento de la secuencia de *NAGLU* en el vector pJET1.2 amplificada con el cebador *NAGLU\_Rv\_USA*, obteniendo así la secuencia completa del inserto de *NAGLU*.

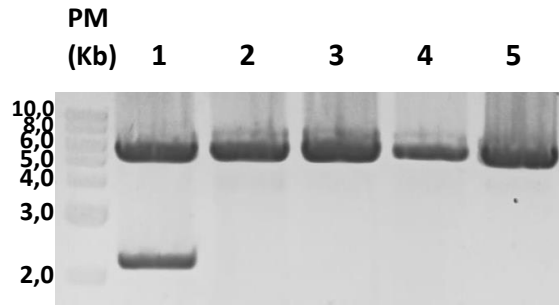
### 6.3 Subclonaje de secuencia codificante del gen *NAGLU* y validación de vector Donor AAVS1:*NAGLU*

El vector Donor AAVS1:Empty previamente diseñado y construido por Leal & Alméciga-Díaz [35] fue obtenido a partir de una extracción de ADN plasmídico de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas. Tras la extracción, se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1% para confirmar la misma. En la electroforesis se evidenciaron 3 bandas, una de un peso entre 3,0 y 4,0 kb, otra de aproximadamente 6,0 kb, y una última de más de 10 kb, lo que sugiere la extracción del plásmido en 3 conformaciones: superenrollado, enrollado y relajado, respectivamente (**Figura 8A**).

Por otra parte, una vez extraído el vector Donor AAVS1:Empty y confirmado la obtención de un clon recombinante (clon 7), se procedió a hacer la digestión enzimática de ambos vectores con las enzimas *MfeI*-HF y *MluI*-HF para el posterior subclonaje de la secuencia del gen *NAGLU*, obteniendo 3 productos de digestión para el clon 7 y 1 producto para el Donor AAVS1:Empty. En la digestión del clon 7 se obtuvo un producto de aproximadamente 2,9 kb, otro de 2,3 kb y uno último de 0,5 kb (**Figura 8B.1**). Estos resultados reafirman la inserción del gen *NAGLU* en el vector pJET1.2, puesto que se puede afirmar que los productos de 2,9 y 0,5 kb corresponden a fragmentos cortados del vector pJET1.2 y el producto de 2,3 kb al inserto del gen *NAGLU*. Adicionalmente, el plásmido Donor AAVS1:Empty es un vector de 5.683 pb, dato consistente con el único producto obtenido de la digestión enzimática de dicho vector con las enzimas *MfeI*-HF y *MluI*-HF, el cual se encuentra entre los pesos 5,0 y 6,0 kb (**Figura 8B.2**).

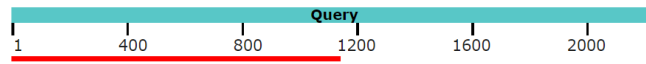


C

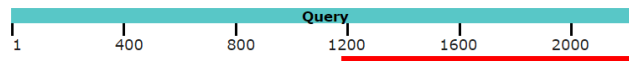


D

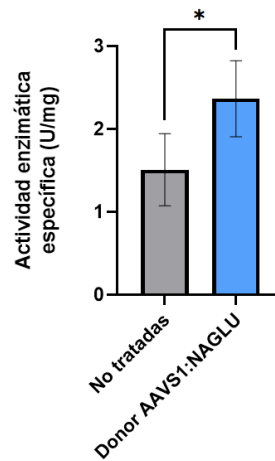
Distribution of the top 1 Blast Hits on 1 subject sequences



Distribution of the top 1 Blast Hits on 1 subject sequences



E



**Figura 8. Subclonaje de secuencia codificante del gen *NAGLU* en Donor AAVS1:Empty y validación de Donor AAVS1:NAGLU.** A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% con productos de la extracción de ADN del Donor AAVS1:Empty a partir del kit ZymoPURE™ Plasmid Miniprep kit. B.1) Electroforesis en gel de agarosa al 1% con productos de la digestión enzimática del clon recombinante No. 7 con las enzimas *MfeI*-HF y *MluI*-HF. B.2) Electroforesis en gel de agarosa al 1% con el producto de la digestión enzimática del vector Donor AAVS1:Empty con *MfeI*-HF y *MluI*-HF. C) Electroforesis en gel de agarosa al 1% con productos de la digestión enzimática de los clones recombinantes 1, 2, 3, 4 y 5 con *MfeI*-HF y *MluI*-HF. D) Resumen gráfico de la alineación entre la secuencia de *NAGLU* (línea roja) insertada en el vector Donor AAVS1:NAGLU y la secuencia de *NAGLU* presente en el vector

pSAM::NAGLU (Query, línea azul). La imagen superior corresponde al alineamiento de la secuencia de *NAGLU* en el Donor AAVS1:Empty amplificada con el cebador CMV\_F. La imagen inferior corresponde al alineamiento de la secuencia de *NAGLU* en el Donor AAVS1:Empty amplificada con el cebador EGFP\_NR, obteniendo así la secuencia completa del inserto de *NAGLU*. E) Actividad enzimática específica de NAGLU determinada en células HEK293 FT no tratadas y transfectadas con el plásmido Donor AAVS1:NAGLU, 48 h luego del tratamiento ( $p=0,0365$ ;  $n=3$ ).

A partir de los productos de la digestión enzimática (2,3 kb y 5,6 kb) se procedió a hacer la respectiva subclonación del inserto del gen *NAGLU* en el Donor AAVS1:Empty utilizando la ligasa de ADN T4. Para confirmar la subclonación se volvió a hacer una digestión enzimática de los productos de ligación de cada clon transformante con las enzimas *MfeI*-HF y *MluI*-HF, obteniendo únicamente un clon positivo para la recombinación del gen *NAGLU* en el vector Donor AAVS1:Empty. Este clon presentó un producto de aproximadamente 2,3 kb y otro más pesado de entre 5,0 y 6,0 kb, datos que concuerdan con los pesos del inserto del gen *NAGLU* y el vector Donor AAVS1:Empty (**Figura 8C**).

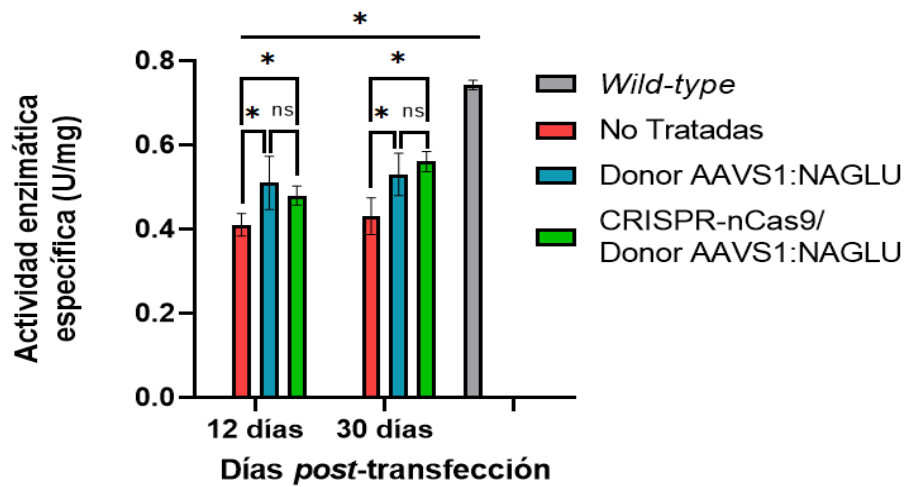
Asimismo, para verificar la recombinación exitosa del inserto del gen *NAGLU* en el vector Donor AAVS1:Empty sin mutaciones potencialmente dañinas, se analizó la secuencia de 2,3 kb por secuenciación Sanger con los cebadores EGFP\_NR y CMV\_F, obteniendo una secuencia consistente con la secuencia del gen *NAGLU* insertada en el plásmido pSAM::NAGLU (**Figura 8D**), con un porcentaje de identidad de 97% para la secuencia amplificada en sentido *forward* y de 99% para la amplificada en sentido *reverse*, luego del alineamiento en BLAST.

Paralelamente al análisis del vector Donor AAVS1:NAGLU por secuenciación, se realizó un ensayo de actividad enzimática en células HEK293 FT para verificar la funcionalidad de la proteína NAGLU, obteniendo una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,0365$ ) entre los valores obtenidos para las células tratadas con el vector donante y las no tratadas. Hubo un aumento del 86% de actividad NAGLU en las células tratadas con respecto a las no tratadas. En promedio se obtuvo una actividad enzimática específica de 2,36 U/mg en las células tratadas en comparación con una actividad promedio de 1,50 U/mg en los controles negativos (**Figura 8E**).

#### 6.4 Actividad enzimática de NAGLU en fibroblastos de pacientes MPS IIIB

Para evaluar si la transfección de fibroblastos MPS IIIB con CRISPR/nCas9 + Donor AAVS1:NAGLU tenía algún efecto sobre la expresión de la proteína NAGLU se llevaron a cabo ensayos de actividad enzimática específica. Como se observa en la **Figura 9**, hubo un aumento estadísticamente significativo de la actividad de NAGLU tras 12 días del tratamiento con los vectores CRISPR/nCas9 y Donor AAVS1:NAGLU ( $p=0,0281$ ), con un aumento de 6,91% con respecto a las células no tratadas. De igual forma, 30 días *post*-transfección, también se observó un aumento significativo de la actividad de NAGLU de células tratadas en comparación con las no tratadas ( $p=0,010$ ), obteniendo un aumento de 14,97%. Este aumento equivale al 71% de actividad NAGLU con respecto a los fibroblastos WT.

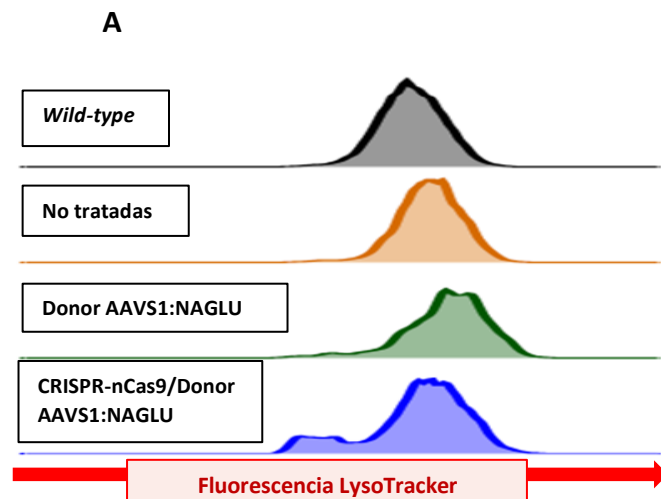
Asimismo, también se observó un incremento de 9,94% y 11,96% en la actividad enzimática de células tratadas únicamente con el vector Donor AAVS1:NAGLU con respecto a las células no tratadas, 12 y 30 días después de la transfección, con una diferencia estadísticamente significativa de 0,042 y 0,038, respectivamente. Este resultado sugiere la retención del vector en las células por lo menos hasta 30 días.

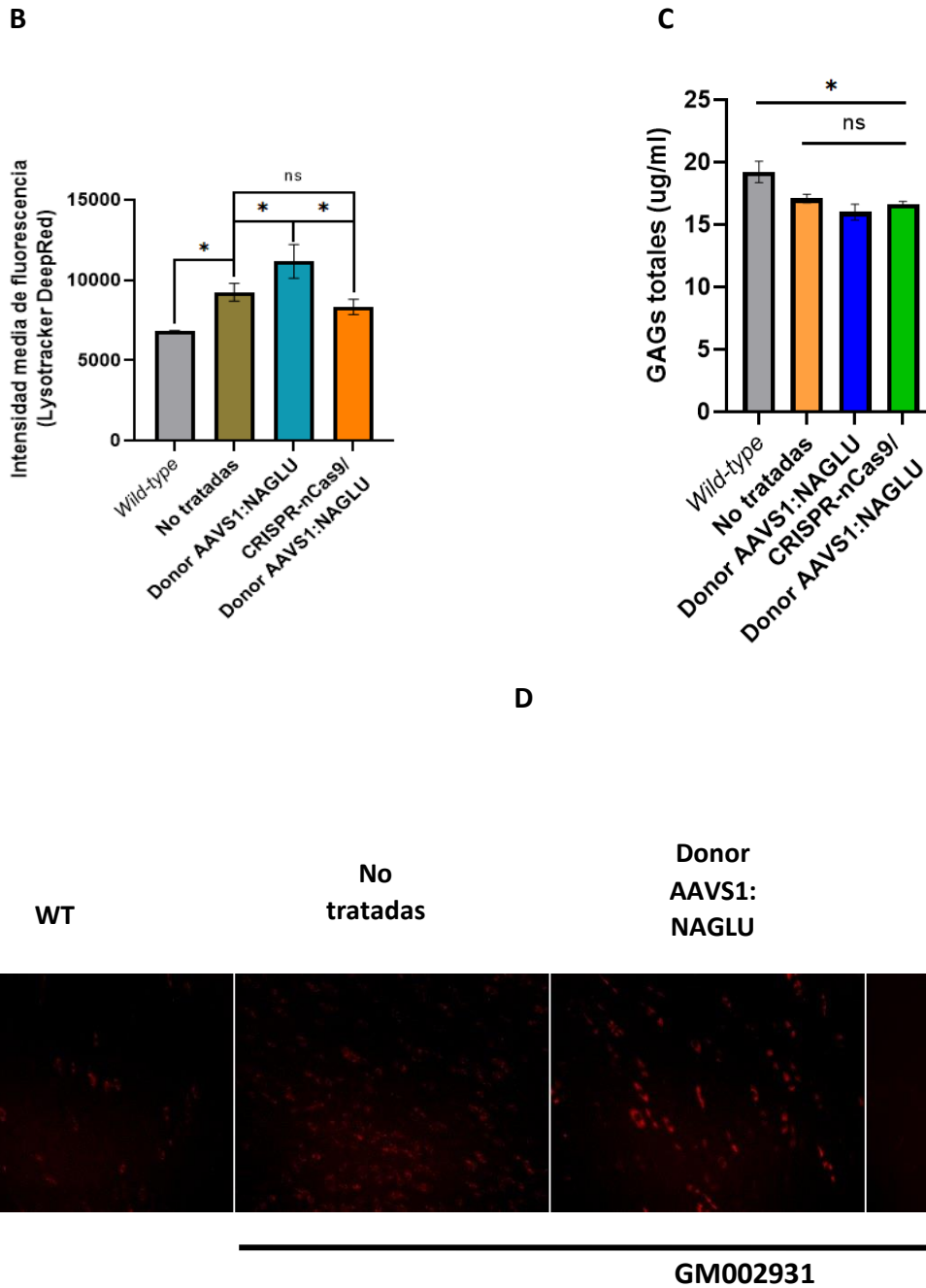


**Figura 9. Actividad enzimática específica de NAGLU en fibroblastos.** Actividad enzimática específica de NAGLU medida en fibroblastos WT, no tratadas, tratadas con Donor AAVS1:NAGLU y tratadas con CRISPR/nCas9 + Donor AAVS1:NAGLU pasados 12 y 30 días luego de la transfección ( $n=3$ ).

### 6.5 Acumulación lisosomal en fibroblastos de pacientes MPS IIIB

30 días luego del tratamiento de edición genética, se midió la masa lisosomal en fibroblastos MPS IIIB y controles normales. Se observó una disminución en el marcaje de células con LysoTracker Deep Red en las células tratadas con CRISPR/nCas9 + Donor AAVS1:NAGLU (**Figura 10A**). Esto concuerda con la disminución que se observó en la masa lisosomal promedio de las células editadas con los dos vectores, aunque la diferencia en la intensidad media de fluorescencia no haya sido significativa estadísticamente ( $p=0,132$ ;  $n=3$ ) entre las células no tratadas y las tratadas con CRISPR/nCas9 + Donor AAVS1:NAGLU (**Figura 10B**). A su vez, se observó una disminución en la tinción lisosomal de las células tratadas con ambos vectores en comparación con las no tratadas, visualizado por epifluorescencia (**Figura 10D**). A pesar de esto, no se evidenció una normalización de los niveles de GAGs totales medidos en el medio extracelular (**Figura 10C**). Cabe mencionar que los datos mostrados en la **Figura 10C** fueron calculados sin la normalización con el blanco.





**Figura 10. Acumulación lisosomal en fibroblastos WT y MPS IIIB.** A) Histograma representativo de fibroblastos teñidos con LysoTracker Deep Red luego de 30 días de tratamiento. Énfasis en el grupo de células editadas que disminuyó la fluorescencia de LysoTracker Deep Red tras el tratamiento con CRISPR/nCas9 + Donor AAVS1:NAGLU. B) Masa lisosomal promedio de fibroblastos WT y MPS IIIB tratados y no tratados luego de 30 días de la edición ( $n=3$ ). C) GAGs totales medidos en el medio extracelular 30 días *post*-transfección ( $n=3$ ). D) Imágenes fluorescentes de fibroblastos WT y MPS IIIB tratados y no tratados, 30 días *post*-transfección. La fluorescencia roja indica el marcaje de compartimentos acídicos (lisosomas) con LysoTracker Deep Red.

## 7. Discusión

La MPS IIB es una enfermedad actualmente sin cura, por lo que los esfuerzos para desarrollar un tratamiento lo más efectivo posible se hacen muy importantes. La edición genética es una alternativa que permite la manipulación directa del ADN o ARN de un organismo con el potencial de poder añadir, eliminar y corregir genes basándose en la generación de cortes de doble cadena (DSBs), lo que la hace la opción más favorable para el estudio y tratamiento de distintas enfermedades [6,14]. Estudios de terapia génica con CRISPR/Cas9 para el tratamiento de MPS I y MPS IVA han demostrado producir un aumento considerable en la actividad enzimática de IDUA y GALNS, respectivamente, al igual que una disminución en la masa lisosomal en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* [7,35]. Sin embargo, a la fecha no existen estudios que evalúen el uso de esta herramienta de edición genómica para el tratamiento de la MPS IIB, por lo que el presente estudio es el primero en evaluar el uso de CRISPR/nCas9 para el *knock-in* de un casete de expresión con el ADNc de la enzima NAGLU, en el *locus* AAVS1 del genoma humano, con el fin de dilucidar el potencial uso de esta herramienta como terapia génica para el tratamiento de la MPS IIB.

Los primeros ensayos de actividad enzimática tanto con pSAM::NAGLU como con Donor AAVS1:NAGLU en células HEK293 FT demostraron la expresión del vector recombinante y NAGLU funcional, con valores que superan el 50% de aumento de la actividad enzimática para ambos casos con respecto a los valores obtenidos para las células no tratadas (**Figura 6B y 8E**). Estos datos, muestran el aumento de la actividad enzimática de NAGLU y sugieren la exitosa endocitosis del complejo liposoma/ADN en el proceso de transfección de las células y consecuente transporte de información genética hasta el núcleo [42]. Dichos fenómenos celulares pueden verse afectados dependiendo del tipo de célula, su estado de senescencia, o cantidad de material exógeno siendo introducido a la célula [36]. En este sentido, era importante tener en cuenta estos factores para la transfección de fibroblastos enfermos con CRISPR/nCas9 + Donor AAVS1:NAGLU con el fin de conseguir una recombinación exitosa, ya que se está hablando de la introducción de dos vectores con información genética exógena a la célula. Se obtuvo una viabilidad celular > 75% para los fibroblastos transfectados (datos no mostrados), dato relativamente bajo pero que indica un comportamiento normal de las células al ser expuestas al estrés de una transfección [36,37]. No obstante, estas células mostraron aumentos significativos de actividad enzimática de NAGLU. Se puede afirmar que la transfección con el sistema CRISPR/nCas9 + Donor AAVS1:NAGLU permitió el aumento de la actividad enzimática incluso hasta el 71% de los valores normales de actividad, en comparación con el 40% y 20% obtenidos por Leal y Alméjiga-Díaz (MPS IVA), y Carvahlo et al. (MPS I), para la corrección de la actividad de GALNS e IDUA, respectivamente [7,35]. Estos resultados sugieren la exitosa inserción del gen NAGLU en el *locus* AAVS1 del genoma humano y muy seguramente se obtuvieron debido a la utilización de la versión mutada de la endonucleasa Cas9, nCas9, y a la presencia del promotor constitutivo CMV en el vector donante. El *locus* AAVS1 del genoma humano ha sido reportado como un sitio seguro para la inserción de transgenes al evitar que la respectiva inserción genere mutaciones en otros sitios del ADN [45,46,47]. Adicionalmente, es un sitio transcripcionalmente activo que permite la expresión robusta y estable de genes exógenos [46,47]. Por su parte, la versión mutada de la Cas9 es una de las alternativas utilizada y reportada como efectiva para reducir los efectos *off-target* que muchas veces se presentan durante la edición genética con el sistema CRISPR/Cas9,

además de presentar una mayor eficiencia de corte que la Cas9 convencional [25,26,28]. Asimismo, el promotor CMV es un promotor constitutivo fuerte que permite altos niveles de expresión de transgenes además de presentar propiedades *enhancer/promoter* y ser activo en gran variedad de líneas celulares de mamíferos [38,39,40]. Si bien estos resultados son prometedores, se considera indicado realizar ensayos adicionales como ensayos de estrés oxidativo, estimación de la frecuencia de corrección de las células, y medición de la tasa de doble corte generado por la endonucleasa nCas9 (ensayo T7), para dilucidar de manera más pertinente y específica el efecto del tratamiento con CRISPR/nCas9 + Donor AAVS1:NAGLU sobre la corrección de las células hacia un fenotipo normal.

Por otra parte, la deficiencia de NAGLU en la MPS IIIB genera la acumulación del HS a nivel lisosomal, aunque recientemente se ha discutido la paralela acumulación de productos de almacenamiento secundarios como GM<sub>2</sub>, GM<sub>3</sub>, citoquinas inflamatorias y especies reactivas de oxígeno, lo que podría llevar a entender un poco mejor la afectación a nivel del SNC [33]. En este sentido, lo que se busca con la recuperación de la actividad enzimática a niveles normales es la correcta degradación del HS, una disminución en el número y tamaño de los lisosomas, y una recuperación de las funciones normales de los productos mencionados anteriormente. En cuanto a la acumulación lisosomal, las células tratadas con CRISPR/nCas9 + Donor AAVS1:NAGLU mostraron una disminución en la masa lisosomal promedio con respecto a las células no tratadas, y aunque esta fue una disminución no estadísticamente significativa, muestra una tendencia a recuperar los valores normales (**Figura 10A, B, D**). A pesar de esto, no fue posible corroborar estos resultados con la medición de GAGs totales ya que los datos para este ensayo no mostraron la misma tendencia. Por el contrario, no hubo una diferencia en la acumulación de sustratos entre las células no tratadas y las células tratadas (Donor AAVS1:NAGLU o CRISPR/nCas9 + Donor AAVS1:NAGLU). Estos resultados sugieren que posiblemente la línea celular de fibroblastos GM002931 no acumula GAGs a nivel extracelular. La mutación puntual presentada en esta línea celular es la sustitución de una leucina por una prolina en el nucleótido 1073 del gen *NAGLU* [41]. Dicho esto, la localización de la mutación puede llegar a ser determinante a la hora de presentarse un fenotipo leve o severo de la enfermedad, sugiriendo que posiblemente esta mutación de cambio de sentido no es lo suficientemente grave como para generar una deficiencia considerable de la enzima NAGLU ni acumulación de sustratos. Esto concuerda con los resultados obtenidos para la actividad enzimática de los fibroblastos no tratados (**Figura 9**) que, si bien es menor a la actividad enzimática de los fibroblastos WT, sigue siendo mayor a los valores reportados para IDUA y GALNS [7,35]. Por otra parte, es importante resaltar que el sistema de principal afección de la MPS IIIB es el SNC, por lo que sería oportuno realizar medición de GAGs en células neuronales, en las cuales previamente se ha reportado un aumento de masa lisosomal [24].

## 8. Conclusiones

En el presente estudio se logró la construcción de un vector donante con el casete de expresión con el ADNc de la enzima NAGLU, el aumento de la actividad enzimática de la  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa (NAGLU) y la disminución parcial de la masa lisosomal en fibroblastos de pacientes con MPS IIIB luego de 30 días del tratamiento con CRISPR/nCas9. Adicionalmente, se logró concluir que la línea celular de fibroblastos GM002931, correspondiente a células de pacientes con MPS IIIB, no acumula GAGs. Estos resultados son



un primer indicativo de una leve mejora de las funciones celulares de los fibroblastos tratados y una respuesta positiva a la implementación de la herramienta genómica CRISPR/nCas9 a nivel *in vitro*, lo que significa un primer acercamiento a una posible alternativa de tratamiento curativo para los pacientes con mucopolisacaridosis IIIB, enfermedad actualmente sin cura. Este primer acercamiento a nivel *in vitro* abre el camino para posteriores investigaciones en modelos avanzados *in vitro*, modelos animales o ensayos clínicos con el fin de profundizar en el conocimiento del uso de esta herramienta sobre esta enfermedad, sus beneficios, ventajas y riesgos. Se espera que con la información aportada en este documento se impulse el uso y la aplicación de este tipo de herramientas biotecnológicas y de edición genómica para enfermedades genéticas similares, empezando por otras mucopolisacaridosis y enfermedades de depósito lisosomal.

## 9. Bibliografía

- [1] Suarez-Guerrero J L, Gómez Higuera P J I, Arias Flórez J S, Contreras-García G A. Mucopolisacaridosis: características clínicas, diagnóstico y de manejo. Rev Chil Pediatr. 2016; 87(4):295–304.
- [2] Asociación de las Mucopolisacaridosis y Síndromes Relacionados “MPS ESPAÑA”. MPS III o SÍNDROME DE SANFILIPPO: Guía práctico para entender la enfermedad. Orden del Ministerio del Interior. 2012.
- [3] Coutinho M F, Lacerda L, Alves S. Glycosaminoglycan Storage Disorders: A review. Biochem. Res. Int. 2012;1-16.
- [4] Sun A. Lysosomal storage disease overview. Ann Transl Med. 2018;6(24):476.
- [5] Abarca H, Trubnykova M, Castro M. Tratamiento de las enfermedades genéticas: presente y futuro. Rev. Fac. Med. Hum. 2021; 21(2):399-416.
- [6] Poletto E, Baldo G, Gomez-Ospina N. Genome Editing for Mucopolysaccharidoses. Int. J. Mol. Sci. 2020: 500.
- [7] Carvalho T G, Schuh R, Pasqualim G, Pellenz F M, Filippi-Chiela E C, Giugliani R, Baldo G, Matte U. CRISPR-Cas9-mediated gene editing in human MPS I fibroblasts. Gene. 2018; 33-37.
- [8] Vachey G, Déglon N. CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing for Huntington's Disease. Methods Mol Biol. 2018;1780:463–481.
- [9] Menéndez-Sainz C, González-García S, Zaldívar-Muñoz C, González-Quevedo Monteagudo A. Mucopolisacaridosis con afectaciones al sistema nervioso central. Rev Mex Neuroci. 2006;7(6):150-155.
- [10] Emil D, Kakkis M, Joseph M, Tiller G, Lewis W, Belmont J, et al. Enzyme-Replacement Therapy in Mucopolysaccharidosis I. N Engl J Med. 2001;344:182-188.
- [11] Coutinho MF, Santos JI, and Alves S. Less Is More: Substrate Reduction Therapy for Lysosomal Storage Disorders. Int. J. Mol. Sci. 2016;17(7):1065.
- [12] Hatzimichael E, Mark T. Hematopoietic stem cell transplantation. Stem Cells Cloning. 2010;3:105-17.

- [13] Jiang F, Doudna J A. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* 2017;46:505-29.
- [14] Li H, Yang Y, Hong W, Huang M, Wu M, Zhao X. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances, and prospects. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):1.
- [15] Welling L, Marchal J P, Hasselt P, Ploeg A, Wijburg F A, Boelens J. Early Umbilical Cord Blood-Derived Stem Cell Transplantation Does Not Prevent Neurological Deterioration in Mucopolysaccharidosis Type III. *JIMD Rep.* 2015.
- [16] Flotte T, Carter B. In Vivo Gene Therapy with Adeno-Associated Virus Vectors for Cystic Fibrosis. *Adv Pharmacol.* 1997;40:85–101.
- [17] Wilson L O W, O'Brien A, Bauer D. The Current State and Future of CRISPR-Cas9 gRNA Design Tools. *Front. Pharmacol.* 2018; 9:749.
- [18] Redman M, King A, Watson C, King D. What is CRISPR/Cas9?. *Arch Dis Child Pract Ed.* 2016;101(4):213-5.
- [19] Puentes M, Lerma P, Garzón R, Suarez D, Espejo A, et al. A perspective on research, diagnosis, and management of lysosomal storage disorders in Colombia. *Heliyon.* 2021;6(3):e03635.
- [20] Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad R L, Benedetti E, Grompe M, Koteliansky V, Sharp P A, Jacks T, Anderson D G. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol.* 2014;32(6):551-3.
- [21] Meikle P, Fuller M, Hopwood J. Lysosomal Degradation of Heparin and Heparan Sulfate. *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate.* Chapter 10. 2005; 285-311.
- [22] Leal A F, Espejo-Mojica A J, Sánchez O F, Ramírez C M, Reyes L H, Cruz J C, Alméciga-Díaz C J. Lysosomal storage disease: current therapies and future alternatives. *J Mol Med.* 2020; 98(7):931-946.
- [23] Ruijter J, Valstar M J, Narajczyk M, Wegryzn G, Kulik W Ijlst L, et al. Genistein in Sanfilippo disease: a randomized controlled crossover trial. *Annals of neurology.* 2012;71(1): 110-20.
- [24] Pearse Y, Locavino M. A Cure For Sanfilippo Syndrome? A Summary of Current Therapeutic Approaches and their Promise. *Med Res Arch.* 2020;8(2).
- [25] Zhang X-H, Tee L Y, Wang X-G, Huang Q-S, Yang S-H. Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Molecular Therapy – Nucleic Acids.* 2015; 4:e264.
- [26] Han H A, Pang J K S, Soh B S. Mitigating off.target effects in CRISPR/Cas9-mediated in vivo gene editing. *J Mol Med.* 2020; 98:615-632.
- [27] Sistema de vigilancia en salud pública (Sivigila). Enfermedades huérfanas - raras, Colombia, periodo epidemiológico I 2021.2021.
- [28] Shen B, Zhang W, Zhang J, et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods.* 2014;11:399–402.

- [29] Dodge J C, Clarke J, Treleaven C M, Taksir T V, Griffiths D A, Yang W, et al. Intracerebroventricular infusion of acid sphingomyelinase corrects CNS manifestations in a mouse model of Niemann-Pick A disease. *Experimental Neurology*. 2009.
- [30] Jeanmonod R, Asuka E, Jeanmonod D. *Inborn Errors of Metabolism*. National Library of Medicine. 2021.
- [31] El-Hattab A W. *Inborn Errors of Metabolism*. *Clinics in Perinatology*. 2015;42(2):413–439.
- [32] Das SK. Inborn errors of metabolism: challenges and management. *Indian J Clin Biochem*. 2013;28(4):311-313.
- [33] Kaczor-Kaminska M, Kaminski K, Wrobel M. Heparan Sulfate, Mucopolysaccharidosis IIIB and Sulfur Metabolism Disorders. 2022;11(4):678.
- [34] Sawamoto K, Chen H H, Almeciga-Diaz C J, Mason R W, Tomatsu S. Gene therapy for Mucopolysaccharidoses. *Mol Genet Metab*. 2018;123(2): 59-68.
- [35] Leal A F, Alméciga-Díaz C J. Efficient CRISPR/Cas9 nickase-mediated genome editing in an *in vitro* model of mucopolysaccharidosis IVA. *Gene Ther*. 2022.
- [36] Khalil A M. The genome editing revolution:review. *J Genet Eng Biotechnol*. 2020;18:68.
- [37] Ben-Porath I, Weinberg R A. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. 2004;113(1):8-13.
- [38] Qin J Y, Zhang L, Clift K L, Hular I, Xiang A P, Ren B-Z, Lahn B T. Systematic Comparison of Constitutive Promoters and the Doxycycline-Inducible Promoter. *PLoS ONE*. 2010;5(5):e10611.
- [39] Skalamera D, Dhamer M, Purdon A S, Wilson B M, Ranall M V, Blumenthal A, Gabirelli B, Gonda T J. Generation of a Genome Scale Lentiviral Vector Library for EF1 $\alpha$  Promoter-Driven Expression of Human ORFs and Identification of Human Genes Affecting Viral Titer. *PLoS ONE*. 2012;7(12):eS1733.
- [40] Xia W, Bringmann P, McClary J, Jones P P, Manzana W, Zhu Y et al. High levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines. *Protein Expression and Purification*. 2006;45(1):115-124.
- [41] Coriell Institute for Medical Research. <https://www.coriell.org/>
- [42] Xiong Chong Z, Keong Yeap S, Yong Ho W. Transfection types, methods and strategies: a technical review. *PeerJ*. 2021;9:e11165.
- [43] Mauri V, Lofti P, Segatori L, Sardiello M. A rapid and sensitive Method for Measuring N-Acetylglucosaminidase Activity in cultured cells. *PLoS ONE*. 2013;8(6):e68060.
- [44] Chiang T W W, le Sage C, Larrieu D, Demir M, Jackson S P. CRISPR-Cas9<sup>D10A</sup> nickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing. *Sci Rep*. 2016;6(1):24356.

- [45] Mizutani T, Li R., Haga H, Kawabata K. Transgene integration into the human AAVS1 *locus* enhances myosin II-dependent contractile force by reducing expression of myosin binding subunit 85. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015; 465(2):270–274.
- [46] Tiyaaboonchai A, Mac H, Shamsedeen R, Mills J A, Kishore S, French D L, Gadue P. Utilization of the AAVS1 safe harbor *locus* for hematopoietic specific transgene expression and gene knockdown in human ES cells. *Stem Cell Res J.* 2014;12:630-637.
- [47] Sadelain M, Papapetrou E P, Bushman F D. Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. *Nat Rev Cancer.* 2012;12:51–58.
- [48] Leal A F, Espejo-Mojica A J, Alméciga-Díaz C J. Genome editing on GM2 gangliosidoses fibroblasts using CRISPR/nCas9. *Mol Genet Metab.* 2022;135:S72.