Universidad Europea MADRID

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Biomedicina

OPTIMIZACIÓN DE ESTRATEGIAS DE EDICIÓN GENÉTICA PARA EL ESTUDIO DE MUTACIONES ASOCIADAS A LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA) EN MODELOS CELULARES

Autor: **Miriam de Martín Marañón**

Villaviciosa de Odón, *22 de mayo de 2026*

Título del Trabajo: Optimización de estrategias de edición genética para el estudio de mutaciones asociadas a la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) en modelos celulares.

El presente trabajo de fin de Grado (TFG) ha sido realizado en el Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid), dentro del Laboratorio de Diagnóstico Genético e Investigación en ELA (GenELA), perteneciente a la Unidad de ELA del Servicio de Neurología e integrado en el **Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12).**

Tutor académico: Dra. Emma Muñoz Sáez.

Tutor externo: Dr. Alberto García Redondo.

AGRADECIMIENTOS

Si alguien me hubiera avisado de lo poco considerado que es el tiempo y de lo rápido que se pasa, quizás hoy estaría más mentalizada para despedirme de estos cuatro años. Pienso que todo cierre merece un buen recuerdo y el reconocimiento de todas aquellas personas que han formado parte de esta etapa.

En primer lugar, estoy muy agradecida con todo el claustro de profesores: con **David** por enseñarme que algunas asignaturas, aunque te encanten, requieren más de un intento y que volver a intentarlo también forma parte del aprendizaje. Con **Laura** por ser capaz de transmitir una asignatura tan compleja de manera sencilla y hasta divertida. Con **Cris** por la dedicación que pone en cada clase y por contagiar su energía. Con **Antonio** por hacerme entender que la exigencia te prepara. Con **Manu**, que me ha acompañado desde el primer año y no solo ha visto mi evolución a lo largo de la carrera, sino que ha contribuido a ella con cada clase y cada examen. En especial quiero agradecer a **Emma**, porque su forma de transmitir y enseñar me motivó a seguir esforzándome en la carrera. Creo que nadie ha tenido tanta suerte como yo al poder contar con ella como tutora del TFG.

Quiero agradecer a **Alba**, a **Dani** y a **Marti** por haber hecho estos últimos años más amenos. Por las tardes en videollamada estudiando y por los infinitos trabajos en grupo. Por culpa de Marta ahora la biblioteca de Pacífico es mi segunda casa.

A **Raquel,** por haber hecho de hermana mayor, escucharme mil y una vez de los mismos temas y por hacerme querer ser mejor cada día.

A **Olga,** por cuidarme y quererme como si fuera su hija. Por acompañarme desde las tablas de multiplicar hasta convertirme en biomédica.

A **Alva**, por alegrarse de cada uno de mis logros como si fueran los suyos, por estar de mi lado desde el primer minuto y estar presente incluso cuando yo no lo estaba. Tengo claro que no estaría aquí sin ti.

A **Luis**, por ser el ejemplo perfecto de que el esfuerzo diario acaba dando sus frutos.

A **Camino**, por ser mi gemela y la persona más inteligente y a la que más admiro.

A **mamá**, por enseñarme que las cosas que se empiezan se acaban y a **Tata**, por ser tan independiente y fuerte. Al abuelo **Ángel** que de alguna manera este trabajo es por y para ti.

A la **abueli** y al **abuelo** que sé con certeza que son mi suerte y me están protegiendo.

A **papá**, por no haberme limitado nunca, por no haber dudado y por haber confiado siempre en mí. Eres, sin duda, la persona más trabajadora que conozco.

Gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN. 1

1.1 Marco teórico. 1

1.2 Bases moleculares y genéticas de la ELA. 2

1.3 Limitaciones terapéuticas. 4

2. OBJETIVOS. 7

2.1 Objetivo general: 7

2.2 Objetivos específicos: 8

3. METODOLOGÍA. 8

3.1 Líneas celulares y diseño experimental. 8

3.2 Diseño de ARN guías. 8

3.3 Transfección. 9

3.3.1 Lipofección. 9

3.3.2 Nucleofección. 10

3.4 Extracción de ADN genómico. 10

3.5 Amplificación y verificación de fragmentos. 10

3.6 Purificación y secuenciación. 10

3.7 Análisis de secuenciación y estadística. 12

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN. 12

4.1 Evaluación de la edición en HEK293T mediante ABE. 12

4.2 Evaluación de la edición en fibroblastos mediante CBE. 17

4.3 Comparación de estrategias de transfección en la edición de bases. 20

4.4 Impacto de la viabilidad celular y eficiencia de transfección. 23

4.5 Limitaciones del estudio. 25

4.6 Proyección al futuro. 26

4.7 Integración en los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). 26

5. CONCLUSIONES. 26

6. BIBLIOGRAFÍA. 27

7. ANEXOS. 37

7.1 Tabla suplementaria 1: Mutaciones y diseño de *protospacers*. 37

7.2 Tabla Suplementaria 2: Materiales clave del estudio. 38

RESUMEN

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva caracterizada por la degeneración de motoneuronas y para la que aún no existe un tratamiento curativo eficaz. En este contexto, las herramientas de edición de bases han surgido como una estrategia prometedora para introducir modificaciones precisas en el ADN sin generar roturas de doble cadena. El objetivo de este trabajo fue evaluar dos sistemas de edición de bases en modelos celulares de la ELA mediante lipofección y nucleofección. Los resultados obtenidos evidenciaron que los editores de adenina permitieron introducir mutaciones asociadas a la ELA en células HEK293T, aunque con eficiencias variables según la mutación analizada. Por otro lado, los editores de citosina alcanzaron elevados niveles de corrección en fibroblastos derivados de pacientes, con mayor especificidad sobre la base diana. La capacidad de introducir y corregir mutaciones puntuales observada en este estudio pone de manifiesto el potencial de la edición de bases para ampliar el alcance y la eficiencia de la edición genética de precisión.

Palabras clave: ELA, *base editing*, CRISPR-Cas9, ABE, CBE, edición genética, medicina de precisión.

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease characterized by the degeneration of motor neurons, for which no effective curative treatment is currently available. In this context, base editing technologies have emerged as a promising strategy for introducing precise DNA modifications without generating double-strand breaks. The aim of this study was to evaluate two base editing systems in ALS cellular models using lipofection and nucleofection. The results demonstrated that adenine base editors enabled the introduction of ALS-associated mutations in HEK293T cells, although editing efficiencies varied depending on the mutation analyzed. In contrast, cytosine base editors achieved high levels of correction in patient-derived fibroblasts, with increased specificity toward the target base. The ability to introduce and correct point mutations observed in this study highlights the potential of base editing to expand the scope and efficiency of precision genome editing.

Keywords: ALS, base editing, CRISPR-Cas9, ABE, CBE, genome editing, precision medicine.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Marco teórico.

No fue hasta 1874 cuando Jean-Martin Charcot introdujo el término "Esclerosis Lateral Amiotrófica" (ELA), englobando en una única entidad patológica diversas manifestaciones clínicas que previamente habían sido descritas de forma independiente (1). Desde su caracterización inicial, la ELA se considera una enfermedad neurodegenerativa destacada por la afectación en las motoneuronas superiores e inferiores, lo que conduce a un deterioro progresivo de las funciones motoras (2,3). Estos rasgos quedan reflejados en la propia denominación de la enfermedad; "esclerosis lateral" alude a la degeneración de los tractos corticoespinales en los cordones laterales de la médula espinal y "amiotrofia" hace referencia a la atrofia y debilidad muscular derivadas de la degeneración de las motoneuronas inferiores (4). La enfermedad adquirió una notable repercusión en Estados Unidos tras el diagnóstico en 1939 del jugador de béisbol Lou Gehrig (5), pasando a conocerse coloquialmente como la "enfermedad de Lou Gehrig". En aquel momento, persistía una considerable incertidumbre en torno a su origen y evolución. En la actualidad, a pesar de los avances en la investigación, la ELA continúa siendo una enfermedad con importantes incógnitas. En este sentido, entre el 90–95 % de los casos corresponden a formas esporádicas, mientras que solo un 5–10 % presenta un origen familiar vinculado a mutaciones genéticas heredables (6). De acuerdo con la evidencia actual, la ELA se entiende como una enfermedad de origen multifactorial en la que intervienen factores genéticos, ambientales y de estilo de vida (7). En términos epidemiológicos, la enfermedad presenta un pico de incidencia entre la quinta y la sexta década de la vida (8), así como una mayor frecuencia en varones que en mujeres (9).

Desde el punto de vista clínico, algunos pacientes presentan signos propios de la afectación de la motoneurona superior, como un aumento del tono muscular y pérdida de fuerza, mientras que la implicación de la motoneurona inferior se hace evidente en fases más avanzadas. En otros casos, el inicio se caracteriza por signos de afectación de la motoneurona inferior, como fasciculaciones, calambres y pérdida progresiva de la masa muscular debido a la pérdida de conectividad neuromuscular (7,8). Esta heterogeneidad en la afectación de las motoneuronas se traduce en diferentes formas de presentación clínica. La más frecuente es la de inicio en las extremidades, que representa el 70 % de los casos y se caracteriza por la coexistencia de afectación de ambas motoneuronas. Aproximadamente el 25 % de los pacientes presenta un inicio bulbar, manifestándose inicialmente por alteraciones del habla

(disartria espástica), la deglución y reflejos mandibulares, extendiéndose a las extremidades conforme avanza la enfermedad. Con menor frecuencia, se identifican fenotipos con predominancia de un único tipo de motoneurona como la esclerosis lateral primaria, caracterizada por la implicación exclusiva de la motoneurona superior, o la atrofia muscular progresiva vinculada a la motoneurona inferior (10,11).

A medida que avanza la enfermedad es frecuente la aparición de fatiga (12), pérdida de la capacidad física, disfagia y, con ello, pérdida de peso y desnutrición (13). Posteriormente, se ve afectada la musculatura respiratoria que conduce a hipoventilación, ortopnea y disnea de esfuerzo. El deterioro progresivo de los músculos respiratorios acaba derivando en insuficiencia respiratoria, a menudo asociada a neumonía (14). Además de los síntomas motores, ciertos pacientes desarrollan alteraciones cognitivas y conductuales características de la demencia frontotemporal (DFT), incluyendo cambios en la personalidad, apatía e impulsividad. Este solapamiento clínico y patológico refuerza la idea de que forman parte de un mismo espectro o continuo degenerativo (15). En conjunto, la enfermedad presenta un curso progresivo e irreversible, con una notable variabilidad interindividual en la supervivencia (2). Aproximadamente la mitad de los pacientes fallece en los primeros 30 meses. No obstante, una proporción menor puede alcanzar hasta 10 años de supervivencia, lo que pone de manifiesto la complejidad y heterogeneidad de su curso clínico (16).

1.2 Bases moleculares y genéticas de la ELA.

La ELA es una enfermedad compleja cuyos mecanismos fisiopatológicos se sustentan en la disrupción de múltiples procesos celulares y moleculares que convergen en la degeneración progresiva del sistema motor (17). El eje central de las bases moleculares de la patología está constituido en torno a la proteína de unión al ADN TAR de 43 kDa (TDP-43, del inglés *TAR DNA-binding protein 43*) codificada por el gen proteína de unión al ADN TAR (*TARDBP*, del inglés *TAR DNA-binding protein*), cuya alteración está presente en aproximadamente el 97 % de los casos (18–20). De forma fisiológica, TDP-43 se une al ácido ribonucleico (ARN) desempeñando un papel fundamental en su procesamiento y regulación de procesos como el procesamiento alternativo o *splicing* y la estabilidad y transporte de transcritos, controlando así la correcta expresión de numerosos genes implicados en la función neuronal (18). En la ELA, TDP-43 presenta modificaciones postraduccionales aberrantes como la hiperfosforilación y la ubiquitinación, que conducen a la depleción nuclear y agregación de esta proteína en el citoplasma. Este fenómeno conlleva una doble consecuencia: por un lado, la pérdida de su función fisiológica en el núcleo, que altera el metabolismo del

ARN; por otro, una ganancia de toxicidad asociada a la acumulación de agregados (21). Estas inclusiones proteicas interfieren con otros procesos celulares esenciales, como son los defectos en la reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN) (22), la alteración de la homeostasis mitocondrial que conduce a la salida anómala del ADN mitocondrial (ADNmt) al citoplasma, el aumento del estrés oxidativo y la activación de respuestas inflamatorias (23), así como la formación de gránulos de estrés (18). Otras proteínas de unión a ARN, como la proteína fusionada en sarcoma (FUS, del inglés *Fused in Sarcoma*), presenta alteraciones similares a las descritas para TDP-43, aunque difiere en su función específica y localización (24), apareciendo también alterada en otras enfermedades neurodegenerativas como la DFT.

De forma complementaria, la expansión de repeticiones del hexanucleótido intrónico (GGGGCC) en el gen marco de lectura abierto 72 del cromosoma 9 (*C9orf72*, del inglés *Chromosome 9 Open Reading Frame 72*) también contribuye a la disrupción de la dinámica de los gránulos de estrés y del metabolismo del ARN (8,18). En este caso, el origen del daño reside en una alteración genética que da lugar a un ARN aberrante capaz de secuestrar proteínas de unión a ARN, interfiriendo en su función. Asimismo, estos transcritos dan lugar a proteínas de repetición de dipéptidos (DPR, del inglés *dipeptide repeat proteins*) mediante traducción no AUG asociada a repeticiones (RAN, del inglés *repeat-associated non-AUG translation*) (25). Como consecuencia, se produce una disrupción del transporte nucleocitoplasmático, comprometiendo el intercambio de ARN y proteínas entre el núcleo y el citoplasma (26).

El estrés oxidativo constituye otro de los mecanismos clave implicados en la fisiopatología de la ELA (27). En condiciones fisiológicas, la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1, del inglés *superoxide dismutase 1*) actúa como antioxidante (28) al catalizar la ruptura de las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) como el anión superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2). Además, actúa como factor de transcripción, induciendo la expresión de más genes antioxidantes y de reparación del ADN (29). Sin embargo, en la ELA ciertas mutaciones de dicho gen conllevan hasta un 42 % menos de la actividad de SOD1, lo que implica un desequilibrio entre la degradación y generación de ROS (17). A su vez, estas mutaciones favorecen la inestabilidad estructural de la proteína, aumentando la tendencia al mal plegamiento y a la formación de agregados (30). El mantenimiento en el tiempo de estos procesos supone el establecimiento de un estado de estrés oxidativo, que contribuye al daño de proteínas, lípidos y ADNmt, agravando la disfunción mitocondrial y favoreciendo la degeneración neuronal. En este contexto, se ha descrito que la enzima SOD1 mutada puede interactuar de forma aberrante con

proteínas reguladoras de la apoptosis, como linfoma de células B 2 (Bcl-2, del inglés *B-cell lymphoma 2*) (27,31), alterando su función protectora y favoreciendo la toxicidad mitocondrial (32). Esta interacción compromete el metabolismo energético celular y afecta al intercambio de metabolitos a través de la membrana mitocondrial, contribuyendo a la generación de más ROS (33,34). La alteración de la permeabilidad mitocondrial favorece la entrada excesiva de calcio (Ca^{2+}), provocando su acumulación y desestabilizando su homeostasis. Este aumento de Ca^{2+} afecta a la producción de energía al promover la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm) y activa las cascadas de muerte celular como la vía de liberación de citocromo c y la activación de calpaínas (27,35). La sobrecarga de Ca^{2+} se ve favorecida por fenómenos de excitotoxicidad, derivados de un exceso de glutamato en la sinapsis (28). Las motoneuronas presentan alta vulnerabilidad debido a su limitada capacidad de amortiguación del Ca^{2+} y a la mayor permeabilidad de los receptores Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPAR, del inglés *AMPA receptor*) facilitando así la entrada masiva de calcio (36). Además, la alteración del transportador de aminoácidos excitadores 2 (EAAT2, del inglés *Excitatory Amino Acid Transporter 2*) da lugar a la acumulación de más glutamato (8).

Todos estos hallazgos reflejan que la ELA no responde a un solo mecanismo patogénico, sino a la convergencia de diversas vías celulares y metabólicas interrelacionadas: las alteraciones en el metabolismo del ARN, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, el transporte intracelular y el fallo axonal debido a la degeneración de los oligodendrocitos, responsables del soporte metabólico de las neuronas. A todo ello se suma un entorno de neuroinflamación caracterizado por la activación de astrocitos y microglía, que liberan mediadores tanto neuroprotectores como neurotóxicos. Sin embargo, con la progresión de la enfermedad, este equilibrio se desplaza hacia un estado proinflamatorio contribuyendo a la degeneración de las motoneuronas (8,17).

1.3 Limitaciones terapéuticas.

Pese a los avances en la comprensión de los mecanismos moleculares implicados y el reflejo en la sintomatología clínica, las opciones terapéuticas actuales continúan siendo limitadas y fundamentalmente paliativas. En Estados Unidos, el tratamiento farmacológico incluye el riluzol (2-amino-6-trifluorometoxibenzotiazol), aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) en 1995 (37,38). Su mecanismo de acción comprende la inhibición de la liberación de glutamato, la modulación de la señalización mediada por los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR,

del inglés *N-methyl-D-aspartate receptor*) y la acción sobre canales de sodio dependientes de voltaje (28). Asimismo, se dispone del fármaco edaravona (3-metil-1-fenil-2-pirazolina-5-ona), aprobado por la FDA en 2017 (39,40) y que actúa como captador de radicales libres reduciendo el estrés oxidativo, aunque con un beneficio clínico limitado (41); en este sentido, su solicitud de autorización en la Unión Europea fue retirada, reflejando la controversia en torno a su eficacia (42). Más recientemente, se ha incorporado el uso de tofersen, un oligonucleótido antisentido dirigido frente al ARN mensajero de *SOD1*, que promueve su degradación y reduce la síntesis de la proteína mutada; este fármaco fue aprobado por la FDA en abril de 2023 (43) para pacientes con la ELA portadores de mutaciones en *SOD1*. En la Unión Europea, el tratamiento aprobado se basa principalmente en el riluzol, autorizado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, del inglés *European Medicines Agency*) (44), mientras que el empleo de tofersen fue aprobado por la Comisión Europea en 2024, representando un avance hacia la medicina de precisión, aunque limitado a un subgrupo reducido de pacientes (45). En consecuencia, estas estrategias no logran modificar el curso de la patología, lo que pone de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevos enfoques terapéuticos más eficaces.

1.4 Aplicación del *base editing* en la ELA.

La edición génica surge como una herramienta prometedora en el contexto de la ELA (46). El editor de bases o *base editing* **(Figura 1)** destaca como una aproximación capaz de introducir modificaciones precisas en el ADN sin generar cortes bicatenarios (47,48). Es una tecnología derivada del sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR, del inglés *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) (49), originalmente descrito como un mecanismo de defensa adaptativo en bacterias y arqueas frente a infecciones virales (50,51). Este sistema permite a los microorganismos reconocer y eliminar material genético extraño. Para ello, incorporan fragmentos de ADN viral en regiones específicas de su genoma (CRISPR), generando una memoria molecular frente a futuras exposiciones (46). Estas secuencias se transcriben en pequeños ARN que, junto con las proteínas asociadas a CRISPR (Cas, del inglés *CRISPR-associated proteins*), permiten reconocer y cortar el ADN del virus en futuras infecciones (51).

Con el objetivo de reducir el número de inserciones y deleciones (indels, del inglés *insertions and deletions*) indeseadas asociadas a la inducción de roturas de doble cadena mediante sistemas CRISPR-Cas y mejorar la precisión en la edición de mutaciones puntuales,

se desarrollaron los sistemas de *base editing* (52). Dicho enfoque se basa en la fusión de una variante de Cas9 con actividad nickasa (nCas9, del inglés *nickase Cas9*), capaz de introducir cortes monocatenarios en el ADN, con una enzima desaminasa responsable de la modificación química de las bases (52–54). La proteína Cas9 presenta de forma nativa dos dominios nucleasa (HNH y RuvC), responsables de la escisión de cada una de las hebras del ADN, generando roturas de doble cadena (51,55,56); sin embargo, la inactivación de uno de estos dominios da lugar a la variante nCas9, que permite evitar este tipo de roturas (48,55). La especificidad del sistema viene determinada por un ARN guía (ARNg), cuya estructura contiene una secuencia de aproximadamente 20 nucleótidos complementaria a la región diana del ADN, denominada protoespaciador o *protospacer*, responsable de dirigir su reconocimiento mediante apareamiento de bases (51,57). En sistemas eucariotas, este ARNg se expresa bajo el control del promotor U6, que es reconocido por la polimerasa III, permitiendo la generación eficiente de ARN pequeños no codificantes sin modificaciones postranscripcionales (57,58). Asimismo, el ARNg incorpora una estructura secundaria conservada o *scaffold* necesaria para la interacción con nCas9 y la formación del complejo ribonucleoproteico activo (51). El reconocimiento y unión al ADN diana requieren además la presencia de una secuencia corta denominada motivo adyacente al protoespaciador (PAM, del inglés *protospacer adjacent motif*). Su detección es imprescindible para la activación de nCas9 (59), ya que induce un cambio conformacional que permite la apertura local del ADN y la posterior hibridación con el ARNg (55,60), condicionando así las regiones del genoma susceptibles de ser modificadas.

En función de la desaminasa empleada, se distinguen distintos tipos de editores de bases: los editores de bases de citosina (CBE, del inglés *cytosine base editors*), que catalizan la conversión de citosina (C) a uracilo (U), dando lugar finalmente a una sustitución de timidina (T; C·G→T·A); y los editores de bases de adenina (ABE, del inglés *adenine base editors*), que convierten la adenina (A) en inosina (I), reconocida como guanina (G), produciendo una sustitución de A·T→G·C (48,54). Estas conversiones tienen lugar dentro de una ventana de edición definida, lo que limita la posición exacta de las bases susceptibles de ser modificadas (48,54). En este contexto, la aplicación de los sistemas de *base editing* en células humanas requiere el uso de vectores de expresión que permitan la producción intracelular de los componentes del editor. Entre ellos, se han desarrollado constructos plasmídicos que codifican variantes optimizadas de ABE, como ABE8e, una versión mejorada con mayor eficiencia catalítica (61), presente en plásmidos como pCMV-T7-ABE8e-nSpRY-P2A-EGFP, desarrollado en el laboratorio de Kleinstiver (62). Este sistema incorpora además una variante de nCas9 con reconocimiento ampliado de PAM (nSpRY), lo

que aumenta el número de regiones del ADN que pueden ser editadas (63). De hecho, estos constructos se han utilizado en estudios recientes para mejorar la eficiencia y precisión de la edición en modelos celulares (62).

A pesar de los avances en el desarrollo de las tecnologías de edición génica, su aplicación en enfermedades complejas como la ELA continúa siendo limitada debido a la heterogeneidad genética de la enfermedad y la necesidad de herramientas precisas en células humanas (7,64). Por ello, el presente estudio plantea evaluar el uso del *base editing* en modelos celulares derivados de pacientes con la ELA, con el objetivo de mejorar la eficiencia y precisión de la edición, facilitando tanto la corrección de mutaciones patogénicas como la generación de modelos experimentales reproducibles para el estudio de la enfermedad.

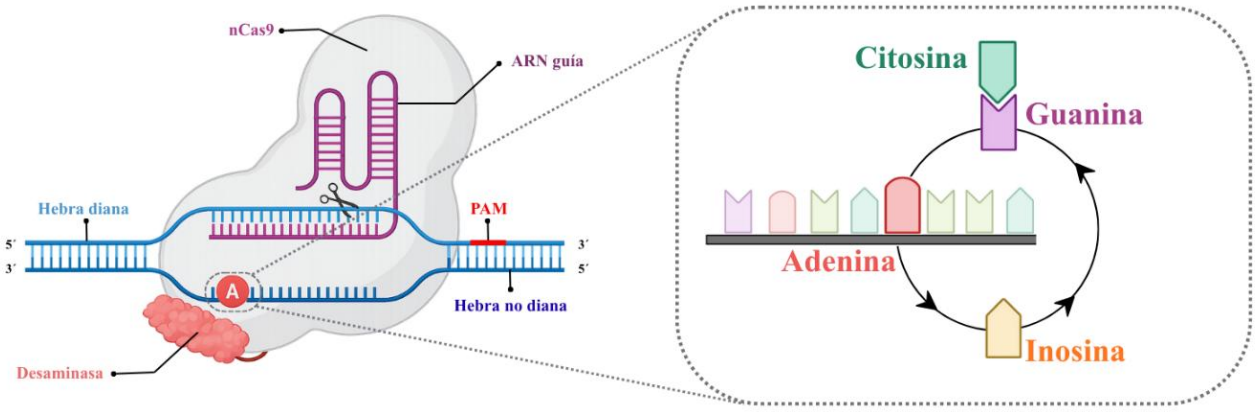

Figura 1. Representación esquemática del mecanismo de edición de bases mediante *adenine base editors* (ABE). El complejo formado por la nickasa Cas9 (nCas9) y el ARN guía (ARNg) reconoce la secuencia diana adyacente al motivo (PAM), formando un R-loop que expone la hebra no diana. La adenosina desaminasa actúa sobre la adenina (A) localizada dentro de la ventana de edición, catalizando su conversión a inosina (I). Posteriormente, la inosina es reconocida funcionalmente como guanina (G) durante los procesos de replicación y reparación celular, dando lugar finalmente a la conversión estable del par de bases adenina-timina (A·T) en guanina-citosina (G·C). El esquema ampliado muestra de forma simplificada la transición molecular A→I→G y el apareamiento preferencial de la inosina con citosina (C). Figura de elaboración propia creada con BioRender.com

2. OBJETIVOS.

2.1 Objetivo general:

Desarrollar y evaluar estrategias de edición genética en modelos celulares relevantes para la ELA, con fines tanto terapéuticos como para la optimización de la generación de modelos *in vitro* para su uso en investigación.

2.2 Objetivos específicos:

- Aplicar estrategias de *base editing* para la corrección de mutaciones patogénicas en fibroblastos primarios derivados de pacientes con ELA.
- Optimizar la herramienta ABE8e-SpRY mediante el diseño de ARN guía dirigidos a introducir mutaciones específicas asociadas a la ELA y generar nuevos modelos celulares de la enfermedad.
- Comparar el rendimiento de distintos métodos de transfección en modelos celulares de la ELA, evaluando parámetros como la eficiencia de edición, la transfección y la viabilidad celular.

3. METODOLOGÍA.

3.1 Líneas celulares y diseño experimental.

Se emplearon dos líneas celulares con objetivos experimentales diferenciados. Los fibroblastos derivados de pacientes con la ELA portadores de las variantes *TARDBP* p.I383V, *SOD1* p.E101G y *SOD1* p.N66S, procedentes del Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid), constituyeron un modelo de relevancia patológica directa para evaluar la corrección de dichas mutaciones mediante editores de bases tipo CBE. Asimismo, la línea celular *Human Embryonic Kidney* 293T (HEK293T, Cytion, Alemania) se empleó como sistema experimental para la introducción *in vitro* de distintas mutaciones asociadas a la ELA, incluyendo *SOD1* p.E22G, *SOD1* p.I113T, *FUS* p.H517R y *TARDBP* p.M337V con el objetivo de generar un modelo celular mimético mediante un editor de bases tipo ABE **(Figura 2)**. Ambas líneas celulares fueron cultivadas y mantenidas en condiciones estándar de incubación a 37 °C y 5 % de CO_2, utilizando el medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU). Los principales reactivos, kits comerciales y materiales clave utilizados en el estudio se detallan en la **Tabla suplementaria 2**.

3.2 Diseño de ARN guías.

Para dirigir de manera específica los sistemas de edición de bases hacia la secuencia diana, se diseñaron diferentes ARNg capaces de reconocer regiones concretas del genoma mediante la plataforma Benchling (Benchling Inc). La selección de las secuencias se realizó en función de la compatibilidad con los motivos PAM y de las características estructurales de las nucleasas empleadas, concretamente *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) y *Neisseria*

meningitidis Cas9 variante 2 (Nme2Cas9). En este contexto, se diseñaron *protospacers* de 20 nucleótidos asociados a PAMs 5'-NGG-3' para SpCas9, mientras que para Nme2Cas9 se emplearon *protospacers* de 23 nucleótidos junto a PAMs 5'-N_4CN-3'. Las secuencias guía se ensamblaron como unidades de expresión que incluían el promotor U6, el *protospacer* y la región *scaffold,* obtenidas mediante síntesis comercial (Life Technologies S.A.). Estos constructos se utilizaron para su posterior transfección en células.

3.3 Transfección.

La introducción del material genético se realizó mediante dos estrategias de transfección: lipofección mediante el kit Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen, CA, EE. UU.) y nucleofección utilizando el sistema 4D-Nucleofector™ X Unit junto con el kit P2 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Kit (Lonza, Colonia, Alemania). La utilización de ambos métodos permitió evaluar la eficiencia de transfección y la viabilidad celular en los distintos modelos celulares empleados. Con el fin de cuantificar estos parámetros, la viabilidad celular se determinó mediante ensayos de exclusión con azul tripán (*Trypan Blue;* Bio-Rad, Cat. No. 1450021). Por otro lado, la eficiencia de transfección se evaluó a través de la detección de fluorescencia asociada a la proteína *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP).

3.3.1 Lipofección.

Las células HEK293T se resuspendieron a una concentración de $1,7 \times 10^5$ células/mL y se sembraron en microplacas de 24 pocillos, alcanzando una confluencia del 60–70 % en el momento de la transfección, aproximadamente 24 horas después. Mediante lipofección se introdujo el plásmido pCMV-T7-ABE8e-nSpRY-P2A-EGFP (Addgene plasmid #185912; depositado por Benjamin Kleinstiver), descrito por Alves *et al.* (62), junto con los correspondientes ARNg diseñados para dirigir la edición hacia las mutaciones **(Tabla suplementaria 1)**. Además del control negativo, se incluyeron como controles positivos una diana previamente validada del sistema de edición (HEK2) y construcciones con secuencias diana en contexto favorable o *context sequence,* orientadas a la optimización de la eficiencia de edición. Por otro lado, los fibroblastos se resuspendieron a una concentración de $1,2 \times 10^5$ células/mL y se sembraron en microplacas de 12 pocillos. Para la edición se emplearon los plásmidos eNme2C-CBE6b (Addgene plasmid #215830; depositado por David Liu), descrito por Zhang *et al.* (53) y EE-BE4max (Addgene plasmid #138158; depositado por David Liu), descrito por Doman *et al.* (65). Tras 72 horas de expresión, se procedió a la recolección celular mediante centrifugación, obteniéndose el pellet para su posterior análisis.

3.3.2 Nucleofección.

La nucleofección se aplicó en ambas líneas celulares empleando los mismos ARNg específicos para cada mutación, junto con los plásmidos previamente descritos. Como control positivo de transfección se utilizó el vector pmaxGFP™ (Lonza, Colonia, Alemania), cuya expresión permitió validar la eficiencia de transfección mediante microscopía de fluorescencia empleando un microscopio invertido EVOS® FL (AMF4300; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Para cada condición se emplearon 1,2 × 10^6 células HEK293T y 7,1 × 10^5 fibroblastos por cubeta en un volumen final de 100 µL, utilizando el programa DS-150. Tras la nucleofección, las células se sembraron en microplacas de 6 pocillos y se incubaron en condiciones estándar hasta su posterior análisis.

3.4 Extracción de ADN genómico.

La extracción de ADN genómico se realizó utilizando el kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ADN extraído se determinaron mediante espectrofotometría utilizando un equipo NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Se registraron los valores de absorbancia a 260 y 280 nm, aplicándose la relación A260/A280 como indicador de pureza del ADN.

3.5 Amplificación y verificación de fragmentos.

Para la amplificación de los fragmentos de interés se empleó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando un volumen final de 25 µL por reacción. Para cada muestra se emplearon aproximadamente 200 ng de ADN genómico. Las reacciones se prepararon mediante una mezcla maestra o *master mix* que incluía agua libre de nucleasas, cebadores específicos para cada gen (OriGene Technologies, Rockville, MD, EE. UU.*)* y la enzima de alta fidelidad *Q5® High-Fidelity 2X Master Mix* (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.). Las condiciones de amplificación se ajustaron en función de la temperatura de fusión de los cebadores empleados. La verificación de los fragmentos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.6 Purificación y secuenciación.

Los productos de PCR se purificaron inicialmente mediante el *GeneJET PCR Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Con el objetivo de optimizar la pureza del ADN, se incorporó una purificación mediante filtración al vacío

utilizando placas de filtración MultiScreen® PCR de 96 pocillos (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). La concentración y pureza del ADN se determinaron mediante espectrofotometría. El ADN purificado se almacenó a −20 °C hasta su utilización. Posteriormente, los fragmentos obtenidos se analizaron mediante secuenciación Sanger, utilizando el *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Las reacciones de secuenciación se prepararon en un volumen final de aproximadamente 8,25 µL, empleando 2,5 µL de ADN junto con una mezcla de reacción compuesta por BigDye Terminator, tampón de secuenciación, el cebador específico de cada mutación (OriGene Technologies, Rockville, MD, EE. UU.), dimetilsulfóxido (DMSO; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y agua libre de nucleasas. Las reacciones se llevaron a cabo en un Termociclador SimpliAmp™ (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) utilizando un programa estándar de secuenciación con una temperatura de alineamiento de aproximadamente 55 °C. Tras la amplificación, los productos de secuenciación se purificaron mediante el *BigDye™ XTerminator™ Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Finalmente, las muestras se transfirieron a placas de PCR ópticas de 96 pocillos MicroAmp™ EnduraPlate™ (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) para su análisis mediante secuenciación capilar.

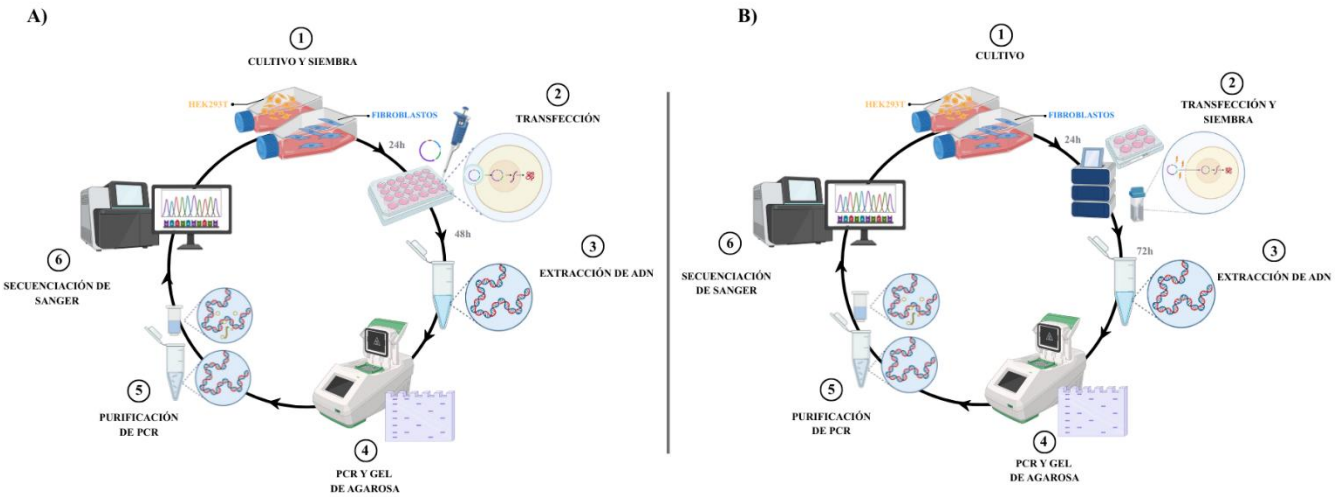

Figura 2. Esquema del diseño experimental y flujo de trabajo empleado para la evaluación de la edición de bases en modelos celulares de ELA. A) Introducción del material genético mediante lipofección en células HEK293T y fibroblastos derivados de pacientes empleando los plásmidos pCMV-T7-ABE8e-nSpRY-P2A-EGFP, eNme2C-CBE6b y EE-BE4max respectivamente. **B)** Introducción del material genético mediante nucleofección en ambas líneas celulares, empleando los mismos plásmidos. En ambos casos, tras la transfección, se realizó la extracción de ADN genómico, la amplificación de las regiones diana mediante PCR, la verificación por electroforesis en gel de agarosa, la purificación de los amplicones y su análisis mediante secuenciación Sanger. Figura de elaboración propia creada con BioRender.com.

3.7 Análisis de secuenciación y estadística.

Los cromatogramas obtenidos tras la secuenciación Sanger fueron analizados mediante la herramienta web EditR, que permitió cuantificar la eficiencia de edición de bases mediante el análisis de las intensidades de fluorescencia de los cromatogramas. El análisis estadístico y la representación gráfica de los resultados se realizaron utilizando GraphPad Prism v10.2.3. La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro–Wilk. En función de la distribución de los datos se emplearon pruebas paramétricas o no paramétricas, entre ellas la prueba *t* de Student, la prueba U de Mann–Whitney y la prueba de Wilcoxon. Para comparaciones múltiples se utilizó la prueba de Kruskal–Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. El número de réplicas empleadas varió según el experimento y las condiciones analizadas, indicándose en los pies de cada figura. Los resultados se representaron como media ± error estándar de la media (SEM, del inglés *standard error of the mean*), considerándose estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$. El grado de significación estadística se indicó mediante el sistema convencional de asteriscos: *$p < 0,05$; **$p < 0,01$; ***$p < 0,001$; ****$p < 0,0001$.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Evaluación de la edición en HEK293T mediante ABE.

La eficiencia de edición en células HEK293T se evaluó mediante sistemas de edición de bases tipo ABE, cuantificando el porcentaje de conversión A→G en adeninas localizadas dentro de la ventana de edición correspondiente a cada mutación **(Figura 3)**.

Con respecto a la ventana de edición 5 de la mutación *SOD1* p.E22G, se observó un aumento significativo de la conversión A→G tras la transfección con ABE en dos de las tres adeninas del *protospacer*. Concretamente, en la adenina correspondiente a la mutación (a5), la edición media aumentó desde un 1,00 % ± 0,71 en el grupo control hasta un 12,75 % ± 2,78 en las células tratadas con ABE, diferencia que resultó estadísticamente significativa ($t = 4,096$; $p = 0,0156$). Este efecto fue aún más pronunciado en la posición A8, que alcanzó el mayor porcentaje de edición observado, aumentando desde un 2,00 % ± 1,08 en el control hasta un 22,75 % ± 4,73 en la condición ABE ($t = 4,275$; $p = 0,0156$). En contraste, la posición A10 no mostró diferencias significativas entre grupos ($t = 0,447$; $p = 0,6704$).

Si bien los resultados presentan un respaldo estadístico aparentemente positivo, realmente evidencian una limitada especificidad del sistema ya que la diana de interés

mutacional presenta menor edición que la adyacente. Este fenómeno de edición en bases adyacentes o *bystander editing* constituye una característica intrínseca de los sistemas ABE, documentada desde sus primeras aplicaciones (54) y posteriormente caracterizada como una limitación inherente de esta tecnología (64). Estudios recientes han observado que menos del 40 % de las ediciones fuera de la diana pueden implicar mutaciones con una posible consecuencia funcional, aunque el impacto biológico real de estos eventos depende del contexto genómico concreto y del grado de edición alcanzado en posiciones adyacentes (66). Este comportamiento puede explicarse por el mecanismo del sistema de edición: la unión del ARNg al ADN genera una estructura tipo *R-loop* que expone una región de ADN monocatenario accesible a la desaminasa, permitiendo la modificación simultánea de varias adeninas (51,64). En este contexto, la actividad del editor ABE8e se concentra preferentemente en una región del *protospacer*, entre las posiciones 4 y 8 definidas como el rango óptimo de edición (54,61).

Por otro lado, el análisis de la ventana de edición 8 presentó un patrón diferente, sin detectarse cambios significativos en la conversión de ninguna de las posiciones analizadas. En la base de interés (a8), la edición media fue de un 9,00 % ± 6,86 frente a un 1,50 % ± 0,86 del grupo control (U = 6,00; p = 0,736). A pesar de no alcanzar significación estadística, esta posición presentó los mayores niveles de edición observados dentro de la ventana analizada. Las bases A11 y A13 exhibieron valores inferiores al 2 % (U = 5,00; p = 0,736 y U = 1,50; p = 0,305 respectivamente). Pese a la menor edición observada con respecto a la ventana de edición 5, este perfil sugiere una mayor restricción en la actividad del editor, indicando que el diseño del ARNg 8 es potencialmente más favorable.

En relación a la mutación *SOD1* p.I113T, la edición se caracterizó por un perfil más homogéneo y con mayores niveles globales en comparación con el observado previamente. La base objetivo de mutación (a5) en la ventana de edición 5, mostró un aumento significativo desde un 0,50 % ± 0,50 en el grupo control hasta un 19,90 % ± 4,25 en la condición editada (U = 0,00; p = 0,0060). En línea con este patrón, la posición A9 mostró una edición del 18,60 % ± 4,64 también significativo (U = 0,50; p = 0,0060). En cambio, la posición A2 presentó niveles de edición notablemente inferiores (3,00 % ± 1,29; U = 7,50; p = 0,0889). No obstante, en la ventana de edición 7, volvieron a observarse niveles elevados de edición. La posiciones A3, A4 y a7 alcanzaron hasta un 20,27 % ± 3,26 (U = 0,50; p = 0,0245), 21,00 % ± 3,79 (U = 4,00; p = 0,0577) y 14,46 % ± 2,93 de edición respectivamente (U = 2,00; p = 0,0381).

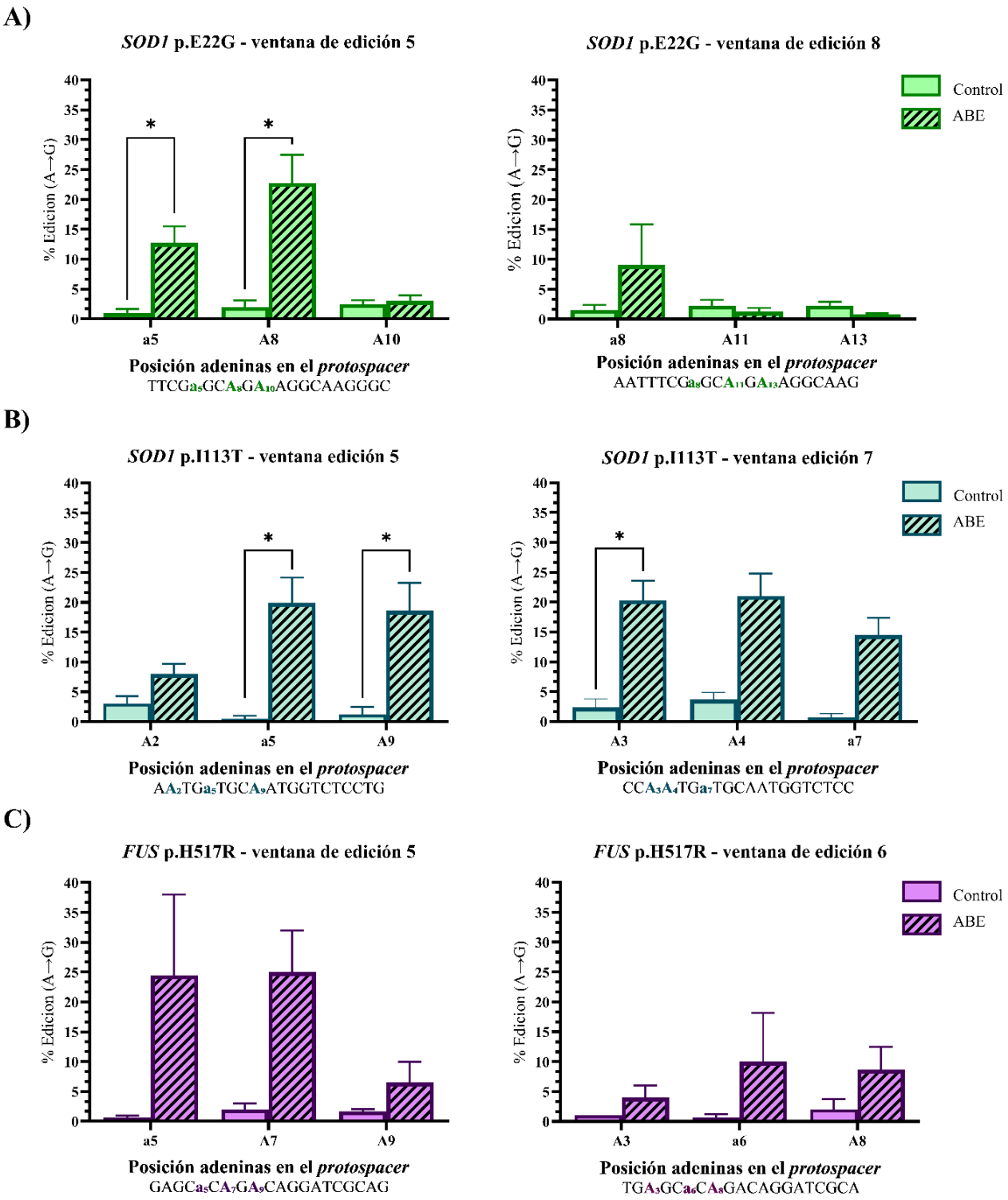

Figura 3. Evaluación de la eficiencia de edición de adeninas a guaninas (A⟶G) en células HEK293T mediante ABE tras lipofección. A) Análisis de la edición de la mutación *SOD1* p.E22G en las ventanas de edición 5 y 8. **B)** Análisis de la edición de la mutación *SOD1* p.I113T en las ventanas de edición 5 y 7. **C)** Análisis de la edición de la mutación *FUS* p.H517R en las ventanas de edición 5 y 6. El eje Y representa el porcentaje de edición (A⟶G) y el eje X las posiciones de adeninas en el *protospacer*. Bajo cada gráfico se muestra la secuencia del *protospacer*, con las adeninas presentes en la ventana de edición resaltadas e indicándose en minúscula la adenina correspondiente a la mutación de interés. Las barras sólidas representan el control y las barras rayadas las muestras tratadas con ABE. En todos los casos se representan los valores medios ± el error estándar de la media (SEM), con un mínimo de n ≥ 3 réplicas independientes por condición. Las comparaciones entre condiciones se realizaron mediante la prueba *t* no apareado (*unpaired t-test*) o test de Mann–Whitney según la distribución de los datos; $p < 0,05$ (*).

Del mismo modo, en la mutación *FUS* p.H517R, la ventana de edición 5 alcanzó niveles de edición de hasta un 24,50 % ± 13,50 en la base diana (a5), con valores similares en A7 (25,00 % ± 7,00). Por el contrario, A9 mostró valores más moderados (6,50 % ± 3,50). En la ventana de edición 6, la adenina relevante alcanzó un 10,00 % ± 4,73 de edición, lo que supone una reducción superior al 50 % con respecto a la ventana de edición 5. Asimismo, las posiciones A3 (4,00 % ± 1,55) y A8 (8,67 % ± 2,18) mostraron niveles incluso más reducidos (U = 0,00; p = 0,2710 en todos los casos).

Las diferencias en la eficiencia de edición entre mutaciones podrían explicarse por características concretas en la arquitectura del *protospacer*. Además de la localización de la adenina diana dentro de la ventana editable, la combinación de las bases que preceden y flanquean a la de interés podría ser relevante. Se ha descrito que la eficiencia de sustitución A→G es mayor cuando la adenina diana está precedida por una timina, mientras que la existencia de una adenina tanto antes como después se vincula con menor eficiencia de conversión. Asimismo, la presencia de una citosina a continuación de la diana parece favorecer la actividad del editor (67). No obstante, al comparar estas tendencias con los resultados obtenidos, se observa que el contexto de secuencia no explica de forma completa los patrones de edición observados. Si bien en algunos casos, como la posición a5 en *SOD1* p.I113T, la presencia de una T dos posiciones antes de la diana se asocia con niveles mayores de edición, en otros contextos esta relación no es consistente. En particular, posiciones como A8 en *SOD1* p.E22G o A5 y A7 en *FUS* p.H517R muestran elevados niveles de edición a pesar de no presentar un contexto flanqueante teóricamente favorable. Estos resultados sugieren que aunque la identidad de las bases adyacentes contribuye a modular la actividad del editor, su efecto no es determinante por sí solo, apuntando a una regulación más compleja (68).

Otro posible enfoque de este comportamiento diferencial podría estar relacionado con la propia naturaleza de ABE. Estos sistemas se basan en una adenosina desaminasa derivada de *Escherichia coli* (TadA, del inglés *transfer RNA adenosine deaminase*), cuya función fisiológica consiste en modificar una adenosina específica del ARN de transferencia (ARNt), generando una inosina (que puede aparearse con C, U o A). Esta modificación permite que un mismo ARNt reconozca distintos codones que codifican para el mismo aminoácido (aa), contribuyendo así a la flexibilidad y eficiencia del proceso de traducción (69,70). Dado que esta enzima está especializada en reconocer estructuras de ARN y no actúa de forma natural sobre el ADN, fue necesario adaptarla (54,64). Su posterior optimización mediante sistemas de

evolución continua asistida por fagos (PACE, del inglés *phage-assisted continuous evolution*) permitió generar la variante ABE8e con mayor actividad catalítica, entre 590 y 1170 veces mayor que la variante anterior ABE7.10, aunque con menor discriminación entre adeninas (61,71), lo que contribuye a explicar la variabilidad observada. Además, el procesamiento de la edición podría verse influido por los mecanismos de reparación celular (72).

Tras la desaminación de A→I, los sistemas ABE generan un desajuste I:T que debe resolverse para consolidar la conversión estable A·T→G·C. En este contexto, nCas9 introduce una rotura monocatenaria en la hebra opuesta no editada, actuando como señal para dirigir la reparación hacia dicha cadena. Se ha propuesto que este proceso involucra principalmente a la ruta de reparación de apareamientos erróneos no canónica (ncMMR, del inglés *non-canonical mismatch repair*), responsable del reconocimiento de desajustes que contienen bases modificadas. Durante esta vía, el complejo de reconocimiento MutSα, formado por las proteínas homólogas de MutS 2 (MSH2, del inglés *MutS homolog 2*) y MutS 6 (MSH6, del inglés *MutS homolog 6*), detecta el desajuste I:T y recluta factores de reparación capaces de procesar la rotura. Entre ellos, la exonucleasa 1 (EXO1, del inglés *exonuclease 1*) puede degradar parcialmente la cadena opuesta al sitio editado, generando una región de ADN monocatenario que posteriormente es resintetizada por las ADN polimerasas δ (*Pol δ*) y ε (*Pol ε*). Dado que la inosina es interpretada funcionalmente como guanina durante la síntesis de ADN, este proceso favorece finalmente la conversión estable del par A·T→G·C. Adicionalmente, la reparación de la rotura monocatenaria inducida por nCas9 también involucra a los mecanismos de reparación de roturas monocatenarias (SSBR, del inglés *single-strand break repair*), en los que participan proteínas como la poli(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1, del inglés *poly(ADP-ribose) polymerase 1*) y la proteína de reparación por complementación de rayos X 1 (XRCC1, del inglés *X-ray repair cross-complementing protein 1*), encargadas de coordinar el reclutamiento de factores de reparación y ligación del ADN. En lesiones complejas, los extremos dañados del ADN requieren un procesamiento previo mediante enzimas como la fosfatasa/quinasa bifuncional de polinucleótidos (PNKP, del inglés *polynucleotide kinase phosphatase*), la tirosil-ADN fosfodiesterasa 1 (TDP1, del inglés *tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1*) o la aprataxina (APTX, del inglés *aprataxin*). Sin embargo, las roturas inducidas por las nucleasas nCas generan extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato "limpios" compatibles con una religación directa, evitando la necesidad de un procesamiento extensivo adicional y favoreciendo potencialmente una reparación más eficiente (72). En conjunto, diferencias locales en la actividad, accesibilidad o eficiencia de estas rutas de reparación podrían contribuir parcialmente a la heterogeneidad de edición observada entre distintas dianas y contextos genómicos.

4.2 Evaluación de la edición en fibroblastos mediante CBE.

Con el objetivo de analizar el potencial de los sistemas CBE para la corrección de mutaciones asociadas a la ELA, se determinó la eficiencia de edición en fibroblastos portadores de las mutaciones *TARDBP* p.I383V y *SOD1* p.N66S **(Figura 4)**.

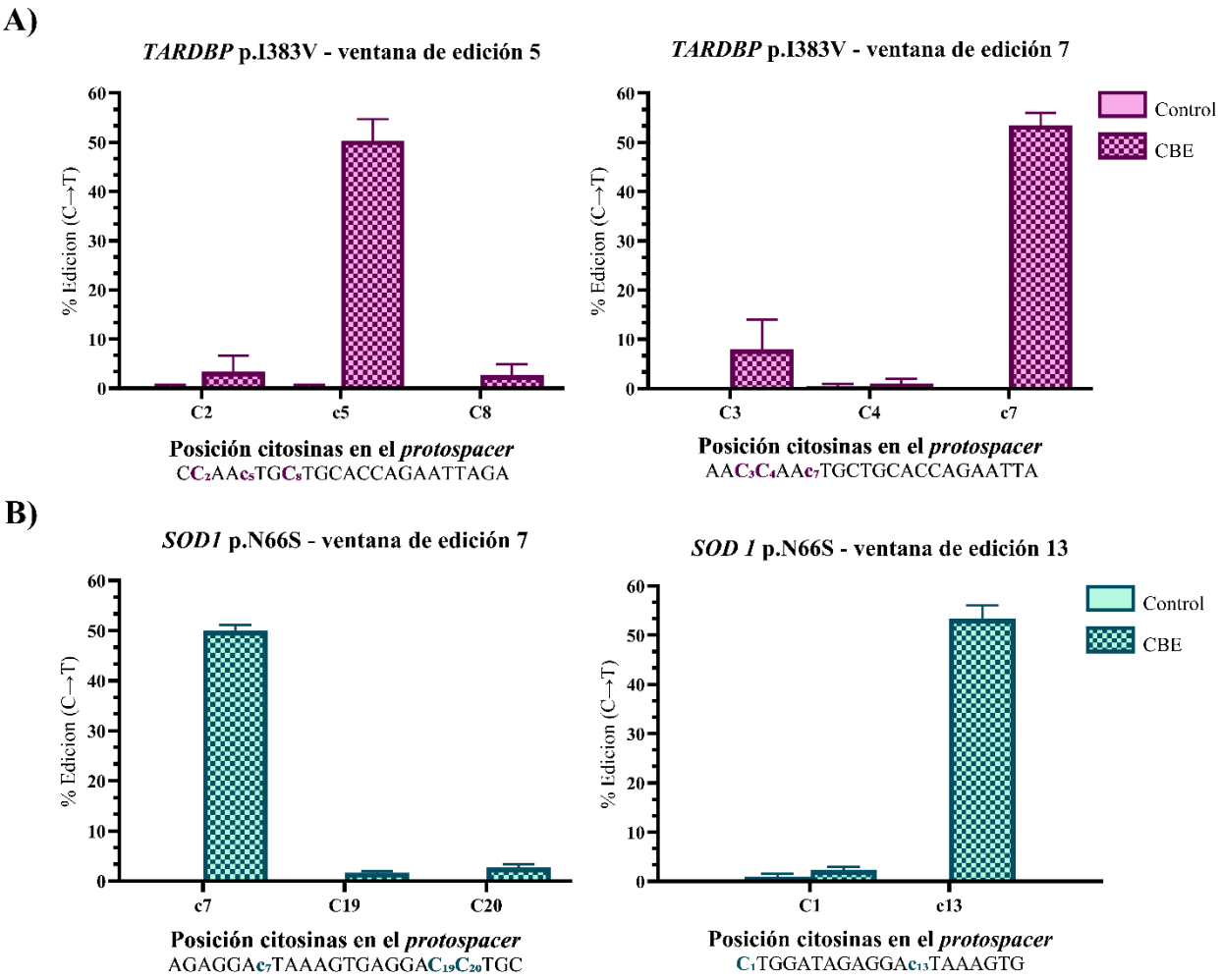

Figura 4. Evaluación de la eficiencia de edición de citosinas a timinas (C⟶T) en fibroblastos derivados de pacientes mediante CBE. A) Análisis de la edición de la mutación *TARDBP* p.I383V las ventanas de edición 5 y 7. **B)** Análisis de la edición de la mutación *SOD1* p.N66S en las ventanas de edición 7 y 13. El eje Y representa el porcentaje de edición (C⟶T) y el eje X las posiciones de las citosinas analizadas en el *protospacer*. Bajo cada gráfico se muestra la secuencia del *protospacer*, con las citosinas presentes en la ventana de edición resaltadas e indicándose en minúscula la citosina correspondiente a la mutación de interés. Las barras sólidas corresponden al control y las rayadas a las muestras tratadas con CBE. En todos los casos se representan los valores medios ± el error estándar de la media (SEM), con un mínimo de n ≥ 2 réplicas independientes por condición. Las comparaciones se realizaron mediante la prueba de U de Mann–Whitney.

En la ventana de edición 5 de *TARDBP* p.I383V, la citosina de interés c5 concentró la mayor eficiencia de edición alcanzando valores del 50,33 % ± 4,33. Por su parte, las posiciones C2 y C8 presentaron niveles de sustitución mínimos con valores del 3,33 % ± 3,33 y del 2,67 % ± 2,18 respectivamente. En la ventana de edición 7, se mantuvo este patrón de distribución con

una marcada actividad en la citosina mutada (c7) que alcanzó valores de hasta el 53,50 % ± 2,50 (U = 0,00; p = 0,703) en las células tratadas. De nuevo, el resto de las posiciones analizadas (C3 y C4) mostraron porcentajes de conversión considerablemente menores (8,00 % ± 6,00; U = 0,00; p = 0,7037 y 1,00 % ± 1,00; U = 1,50; p > 0,9999 respectivamente), sin alcanzar significación estadística.

Para validar la consistencia de este comportamiento, se evaluó la conversión C→T en la mutación *SOD1* p.N66S, extendiendo el análisis a un segundo contexto mutacional. La posición de la mutación (c7) de la ventana de edición 7 mostró una edición del 50,00 % ± 1,15 destacando sobre las posiciones C19 y C20 con niveles de sustitución del 1,67 % ± 0,33 y 2,67 % ± 0,67 respectivamente, indicando una actividad editora residual fuera de la citosina diana (U = 0,00; p = 0,271 en todos los casos). En continuidad con estos resultados, mientras que la posición C1 de la ventana de edición 13 reflejó datos mínimos en la condición editada del 2,33 % ± 0,67 (U = 1,50; p = 0,30), la citosina mutada (c13) mostró niveles de 53,33 % ± 2,67 (U = 0,00; p = 0,19) en células tratadas frente a ausencia de edición en el grupo control.

En conjunto, los sistemas CBE empleados mostraron porcentajes elevados de conversión C→T. En comparación con el perfil previamente observado mediante ABE en células HEK293T, la edición mediada por CBE exhibió una restricción de la actividad sobre la base diana y una conversión limitada en posiciones adyacentes. Este perfil de edición más restringido sugiere diferencias mecanísticas entre los sistemas CBE y ABE. El primer sistema CBE funcional fue desarrollado en 2016 por Komor *et al.* (48) mediante la fusión de una variante nCas9 con desaminasas de citidina pertenecientes a la familia de enzimas editoras de ARN de apolipoproteína B, polipéptido catalítico (APOBEC, del inglés *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide*), un grupo de enzimas capaces de catalizar la conversión de C→U mediante desaminación hidrolítica sobre ácidos nucleicos monocatenarios (73–75). Dentro de esta familia, APOBEC1 fue la primera proteína caracterizada, describiéndose inicialmente por su capacidad de editar el ARNm de la apolipoproteína B (ApoB, del inglés *apolipoprotein B*) (76).

En condiciones fisiológicas, APOBEC1 induce una conversión específica C→U sobre el transcrito de ApoB, generando un codón de parada prematuro que permite la síntesis de una isoforma truncada de la proteína en el intestino (ApoB48), mientras que en el hígado se produce la forma completa ApoB100. Este proceso permite modular la función de la proteína según las necesidades metabólicas de cada tejido, optimizando el transporte y el

procesamiento de lípidos. Asimismo, representa uno de los primeros ejemplos descritos de edición de bases en sistemas biológicos (76,77). Investigaciones posteriores revelaron que distintos miembros de la familia APOBEC, como la desaminasa inducida por activación (AID, del inglés *activation-induced deaminase*) y APOBEC3, poseen actividad fisiológica sobre el ADN monocatenario y desempeñan funciones clave en los mecanismos de defensa inmunitaria (73,75,78,79). En particular, las proteínas de la subfamilia APOBEC3 pueden inducir múltiples desaminaciones sobre el ADN viral durante la replicación de retrovirus, promoviendo una acumulación de mutaciones que limita su propagación (79,80).

Esta capacidad natural de reconocer y modificar ADN monocatenario contribuyó a que las proteínas APOBEC fueran consideradas para el desarrollo de herramientas de edición génica basadas en CRISPR. A diferencia de la adenina desaminasa de ABE (TadA), que requirió procesos de evolución dirigida para adquirir actividad eficiente sobre ADN (61), las proteínas APOBEC ya presentan esa afinidad de manera fisiológica. Esta distinción podría contribuir a que existan menos eventos de *bystander editing* en los resultados obtenidos. No obstante, diversos estudios han demostrado que en los sistemas CBE también se producen dichos fenómenos, especialmente cuando múltiples citosinas se encuentran próximas dentro de la ventana activa (48,64,68). Si bien APOBEC también presenta dependencia del contexto de la secuencia (67), mostrando aparentemente mayor edición cuando las citosinas están precedidas por una T, los presentes resultados evidencian de nuevo la participación de otros factores en cuanto a la regulación de la eficiencia de edición.

En términos mecanísticos, en los sistemas CBE tras la desaminación de C→U, se genera un desajuste U:G que debe resolverse para consolidar la conversión estable de C·G→T·A (48). En condiciones fisiológicas, la presencia de uracilo en el ADN constituye una lesión reconocida principalmente por la vía de reparación por escisión de bases (BER, del inglés *base excision repair*). Durante esta vía, enzimas glicosilasas como la uracilo N-glicosilasa (UNG, del inglés *uracil N-glycosylase*), la uracilo ADN glicosilasa monofuncional selectiva de cadena sencilla 1 (SMUG1, del inglés *single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase 1*), la glicosilasa de ADN de timina (TDG, del inglés *thymine DNA glycosylase*) o la proteína 4 de dominio de unión a metil-CpG (MBD4, del inglés *methyl-CpG binding domain protein 4*) pueden eliminar el uracilo presente en el ADN y revertir la edición introducida. Por ello, muchos sistemas CBE incorporan un inhibidor de la enzima uracilo N-glicosilasa (UGI, del inglés *uracil glycosylase inhibitor*) capaz de bloquear parcialmente la actividad de UNG y favorecer la permanencia del uracilo en la cadena editada. De este modo,

durante los procesos de reparación celular, las ADN polimerasas pueden utilizar la hebra que contiene uracilo como molde e incorporar adenina en la cadena complementaria, debido a la elevada similitud estructural entre uracilo y timina (64,72).

Asimismo, la accesibilidad local de la cromatina y la actividad transcripcional del locus han sido asociadas con diferencias en la eficiencia de edición de sistemas CRISPR-Cas9 y *base editing* (68,81). Los genes transcripcionalmente activos suelen asociarse a una disposición de la cromatina más accesible, modulada por determinadas modificaciones de histonas que reducen el grado de compactación del ADN y facilitan la interacción del complejo Cas9-ARN guía con la región diana (81–84). Esta accesibilidad podría favorecer la formación del R-loop y aumentar la exposición transitoria del ADN monocatenario sobre el que actúan las desaminasas tipo APOBEC, incrementando la eficiencia de conversión de bases. Sin embargo, dado que estos parámetros no fueron evaluados directamente en el presente estudio, su posible contribución a los resultados observados deberá ser confirmada mediante análisis adicionales.

Por último, resulta especialmente llamativo que estos niveles de edición se hayan obtenido en fibroblastos primarios portadores de las mutaciones de la ELA. Mientras que las HEK293T son una línea inmortalizada ampliamente empleada por su elevada eficiencia de transfección y alta permisividad para manipulación genética (85–87), los fibroblastos representan un modelo celular considerablemente más complejo desde el punto de vista experimental. Estas células presentan menor capacidad proliferativa, mayor heterogeneidad biológica y una eficiencia de manipulación genética generalmente inferior (88), lo que hace especialmente destacables los porcentajes de conversión superiores al 50 % observados en este estudio. En conjunto, la elevada eficiencia y especificidad observadas refuerzan el potencial de los sistemas CBE como herramientas de corrección génica de alta precisión en modelos celulares derivados de pacientes, apoyando su posible aplicación futura en estrategias terapéuticas dirigidas a enfermedades neurodegenerativas como la ELA.

4.3 Comparación de estrategias de transfección en la edición de bases.

El rendimiento de las herramientas de edición genética puede verse condicionado por el método de transfección empleado (89). En este contexto, se compararon las estrategias de lipofección y nucleofección en células HEK293T y fibroblastos **(Figura 5)**.

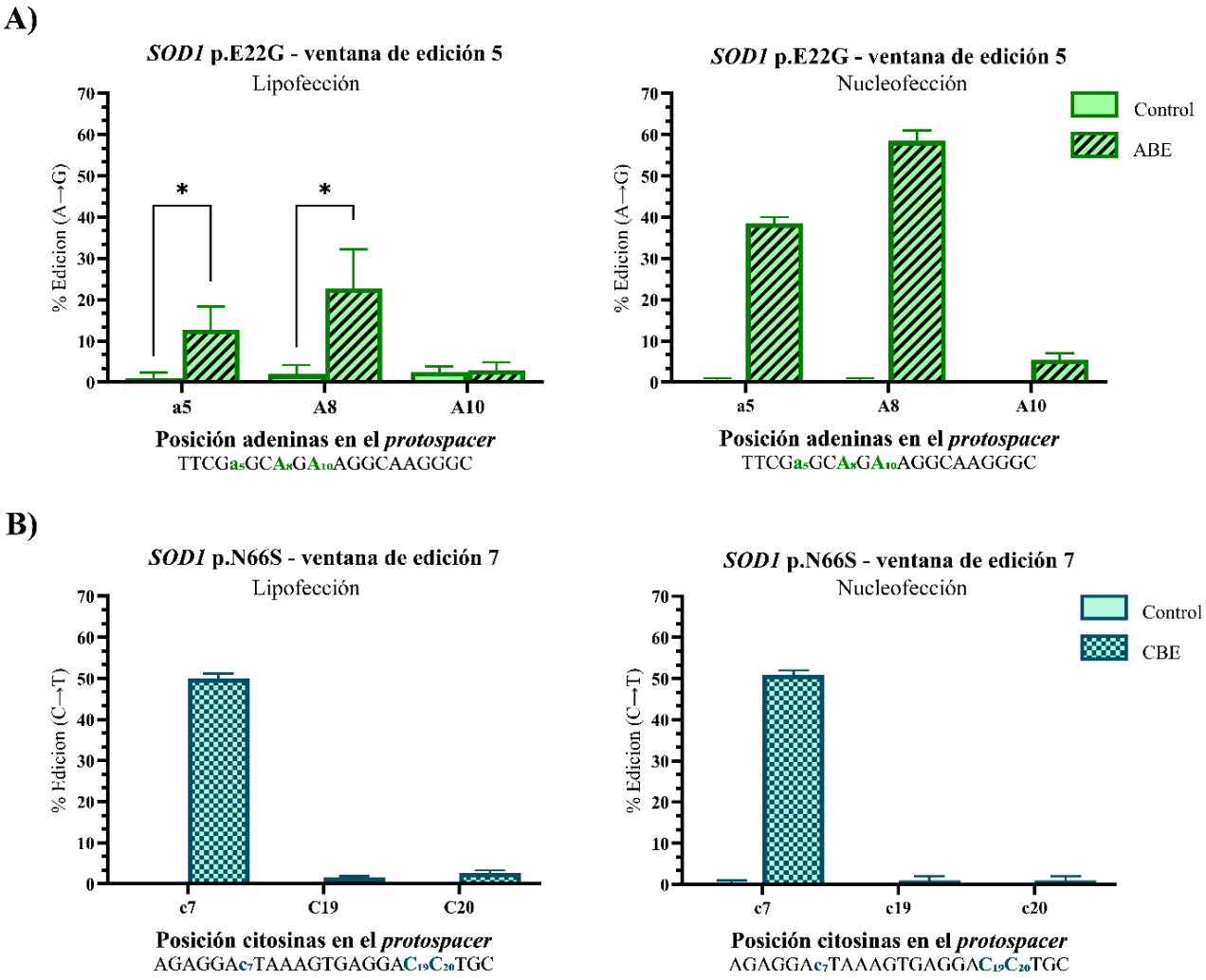

Figura 5. Comparación de la eficiencia de edición de bases en función del método de transfección. A) Análisis de la edición de la mutación *SOD1* p.E22G mediante ABE en células HEK293T utilizando la ventana de edición 5, comparando lipofección y nucleofección. **B)** Análisis de la edición de la mutación *SOD1* p.N66S mediante CBE en fibroblastos derivados de pacientes utilizando la ventana de edición 7, comparando lipofección y nucleofección. El eje Y representa el porcentaje de edición (A>G o C>T) y el eje X las posiciones de adeninas o citosinas analizadas en el *protospacer*. Bajo cada gráfico se muestra la secuencia del *protospacer*, con las bases presentes en la ventana de edición resaltadas e indicándose en minúscula la base correspondiente a la mutación de interés. Las barras sólidas corresponden al control y las barras rayadas a las muestras tratadas con ABE o CBE, según la condición experimental. En todos los casos se representan los valores medios ± el error estándar de la media (SEM), con un mínimo de n ≥ 2 réplicas independientes por condición. Las comparaciones entre condiciones se realizaron mediante el test *t* no apareado (*unpaired t-test*) o el test U de Mann–Whitney según la distribución de los datos; $p < 0,05$ (*).

En HEK293T, la nucleofección se evaluó en las mutaciones *SOD1* p.E22G y p.I113T, así como en *TARDBP* p.M337V. Sin embargo, únicamente se obtuvo una secuenciación interpretable en el caso de *SOD1* p.E22G (ventana de edición 5), lo que limitó el análisis comparativo a esta condición. Del mismo modo, en fibroblastos solo se dispuso de datos válidos para la mutación *SOD1* p.N66S en la ventana de edición 7. La ausencia de secuencias interpretables podría relacionarse con la calidad de los amplicones obtenidos, ya que la

secuenciación Sanger requiere productos de PCR altamente específicos y libres de contaminantes que pueden comprometer la resolución del cromatograma (90–92).

En cuanto a los resultados obtenidos en HEK293T, la nucleofección permitió alcanzar los mayores niveles de conversión A→G sobre la adenina diana (a5) en la mutación *SOD1* p.E22G. Concretamente, se obtuvieron valores del 38,50 % ± 1,50 (U = 0,00; p = 0,703) frente a un 12,75 % ± 2,78 observado mediante lipofección (t = 4,096; p = 0,0156). Por otra parte, en fibroblastos portadores de la mutación *SOD1* p.N66S, la citosina diana (c7) alcanzó porcentajes de conversión C→T del 50 % tanto tras la lipofección (U = 0,00; p = 0,2710) como tras la nucleofección (U = 0,00; p = 0,7037). En ambos casos, el resto de las citosinas presentes en el *protospacer* mostraron niveles mínimos de edición sin aparente relevancia biológica.

Las diferencias de eficiencia observadas se podrían relacionar con los distintos mecanismos de entrega intracelular entre ambas estrategias de transfección (93). En la lipofección, el material genético se incorpora mediante complejos lipídicos catiónicos capaces de interaccionar con la membrana celular y facilitar su internalización principalmente por endocitosis (94). A diferencia de ello, la nucleofección es un método físico por el cual un pulso eléctrico genera poros transitorios en la membrana que permiten la entrada de material genético (95). De hecho, diversos estudios han descrito que este último puede proporcionar una entrega más eficiente en determinados modelos celulares (89), lo que podría justificar la mayor eficiencia de edición con este método en HEK293T. Además, la menor edición en este mismo modelo celular tras la lipofección podría relacionarse con la elevada dependencia de los métodos químicos respecto a factores como el pH de la solución, la estabilidad de la membrana celular, la capacidad endocítica y la proporción entre el material genético y el reactivo lipídico (94). En contraste, los fibroblastos presentaron porcentajes de corrección prácticamente idénticos para ambos métodos. Aunque el número de condiciones analizadas fue muy limitado, este comportamiento es consistente con observaciones previas en la literatura que describen una marcada dependencia del tipo celular sobre el rendimiento de los métodos de transfección, sin que exista una aproximación universalmente superior para todos los contextos experimentales (89). Estos hallazgos refuerzan la necesidad de adaptar las estrategias de transfección al contexto celular y al objetivo experimental de cada aproximación de edición genética.

4.4 Impacto de la viabilidad celular y eficiencia de transfección.

Para caracterizar el impacto de los distintos métodos de transfección sobre la viabilidad celular y la eficiencia, se analizó de forma comparativa su efecto en ambas líneas celulares **(Figura 6)**.

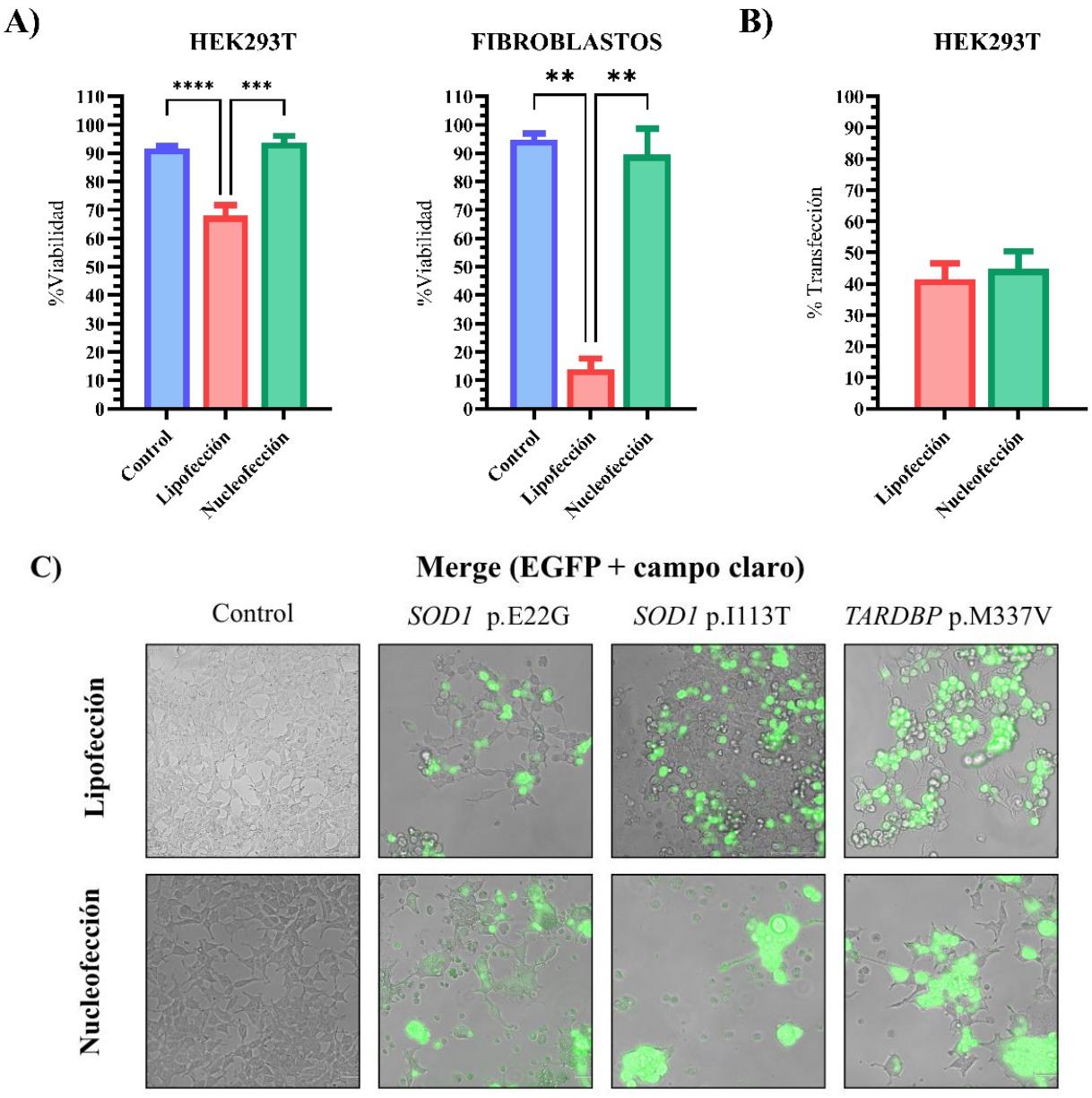

Figura 6. Evaluación de la viabilidad y eficiencia de transfección. A) Comparación de la viabilidad celular (%) entre condiciones control (azul), lipofección (rojo) y nucleofección (verde) en células HEK293T y en fibroblastos. **B)** Cuantificación del porcentaje de células transfectadas mediante lipofección y nucleofección, determinada a partir de la expresión de EGFP en células HEK293T. **C)** Imágenes representativas obtenidas por microscopía en campo claro y con microscopía fluorescencia (merge) de células HEK293T transfectadas con constructos dirigidos a *SOD1* p.E22G, *SOD1* p.I113T y *TARDBP* p.M337V. La señal verde corresponde a la expresión de EGFP. Las imágenes muestran la distribución y eficiencia de transfección para cada método. Los datos se presentan como media ± error estándar de la media (SEM) con un mínimo de $n \geq 3$ réplicas independientes por condición. Las comparaciones entre condiciones se realizaron mediante test de Kruskal–Wallis seguido de comparaciones múltiples; $p < 0{,}01$ (**); $p < 0{,}0001$ (****).

El análisis mediante Kruskal–Wallis reveló diferencias significativas en la viabilidad celular entre los grupos de las HEK293T (H = 26,95; p < 0,0001). La lipofección produjo una marcada reducción de la viabilidad celular en comparación con el control (67,97 % ± 3,72 frente a 91,70 % ± 0,99; p < 0,0001 respectivamente). Por el contrario, las células nucleofectadas mantuvieron valores comparables a los del grupo control (93,80 % ± 2,31; p > 0,9999). En fibroblastos se observó una tendencia similar (H = 14,59; p < 0,05). La lipofección redujo drásticamente la viabilidad celular respecto al control (13,92 % ± 3,75 frente a 94,83 % ± 2,04; p = 0,0020), mientras que la nucleofección conservó niveles de viabilidad elevados y cercanos al control (89,50 % ± 9,18; p > 0,9999).

Por otro lado, la eficiencia de transfección se determinó a partir de la expresión de EGFP como marcador fluorescente. No obstante, este análisis se restringió a células HEK293T, dado que el constructo utilizado en fibroblastos carecía de este reportero, imposibilitando su evaluación entre condiciones. La transfección fue comparable entre ambos métodos, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre lipofección y nucleofección (t = 0,43; p = 0,6746). En términos descriptivos, la nucleofección mostró un valor medio ligeramente superior (44,77 % ± 5,63) en comparación con la lipofección (41,59 % ± 4,88).

La citotoxicidad asociada a los reactivos lipídicos empleados en la transfección química ha sido ampliamente documentada en distintos modelos celulares (96,97). Estos compuestos forman complejos electrostáticos con los ácidos nucleicos facilitando su internalización celular. Sin embargo, se ha demostrado que estos complejos también pueden alterar la integridad de la membrana plasmática, inducir estrés endosomal y favorecer la producción de ROS. El aumento de ROS se relaciona con la activación de las vías de señalización asociadas al estrés celular, particularmente de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, del inglés *mitogen-activated protein kinases*), como p38 y la quinasa N-terminal de c-Jun (JNK, del inglés *c-Jun N-terminal kinase*), proteínas implicadas en la regulación de respuestas inflamatorias, la apoptosis y la adaptación celular frente al daño (98). En este contexto, Iwaoka *et al*. demostraron que liposomas catiónicos inducen una activación sostenida de p38 dependiente de ROS, promoviendo posteriormente la activación de caspasa-8 y la escisión del agonista de muerte con dominio de interacción BH3 (Bid, del inglés *BH3-interacting domain death agonist*), una proteína proapoptótica de la familia Bcl-2 cuya forma truncada favorece la liberación mitocondrial de citocromo c y la activación de las vías apoptóticas dependientes de caspasas (96). Este mecanismo podría contribuir a explicar la marcada disminución de viabilidad observada tras la lipofección, especialmente en fibroblastos, ya que estos presentan el contexto

fisiopatológico de la enfermedad. En contraste, ambos métodos de transfección mostraron una eficiencia similar en células HEK293T, resultado que muestra coherencia con la bibliografía existente sobre la elevada permisividad y facilidad de transfección descrita para esta línea celular (89).

En conjunto, los resultados obtenidos ponen de manifiesto el potencial de las herramientas de *base editing* para modelar y revertir mutaciones asociadas a la ELA. Del mismo modo, evidencian la influencia crítica de factores como el contexto de secuencia, el tipo celular y las estrategias de entrega empleadas sobre la eficiencia y estabilidad del proceso de edición. Asimismo, las diferencias observadas entre modelos celulares resaltan la importancia de optimizar las condiciones experimentales en función del contexto biológico, especialmente en aproximaciones dirigidas a células derivadas de pacientes. Estos hallazgos contribuyen a ampliar el conocimiento sobre la aplicabilidad de la edición de bases en modelos de la ELA y refuerzan el interés de estas estrategias como aproximaciones dentro de la medicina de precisión.

4.5 Limitaciones del estudio.

El presente estudio presentó algunas limitaciones que deben considerarse en la interpretación de los resultados. En primer lugar, determinadas condiciones experimentales contaron con un número reducido de réplicas biológicas, lo que limita la robustez estadística de algunos análisis. Además, la baja pureza de algunas muestras afectó a la calidad de las secuenciaciones Sanger obtenidas, dando lugar a cromatogramas no interpretables y dificultando la evaluación de la edición en las mutaciones objeto de estudio. Asimismo, la validación de la edición se realizó únicamente mediante secuenciación Sanger, lo que permitió confirmar modificaciones a nivel genético, pero no evaluar posibles consecuencias funcionales derivadas de las mutaciones introducidas. En este sentido, técnicas complementarias como Western blot o estudios de localización subcelular mediante inmunofluorescencia habrían permitido profundizar en las posibles consecuencias funcionales asociadas a dichas variantes.

Por otro lado, aunque las células HEK293T constituyen un modelo fácilmente manipulable y ampliamente utilizado en estudios de edición genética, se trata de una línea celular inmortalizada y alejada del contexto neuronal en el que se desarrolla la ELA, lo que limita su capacidad para reproducir de forma fiel la complejidad fisiopatológica de la enfermedad.

4.6 Proyección al futuro.

Los resultados obtenidos plantean continuar explorando el potencial de las herramientas de *base editing* para la generación de modelos celulares asociados a la ELA. Tras demostrar la capacidad de los sistemas ABE para introducir mutaciones relacionadas con la enfermedad en células HEK293T, una posible línea futura sería la generación de líneas celulares estables que mimeticen estas variantes mediante aislamiento clonal. La obtención de estos modelos permitiría disponer de poblaciones celulares homogéneas y reproducibles para futuros estudios funcionales relacionados con la ELA. Además, esta estrategia resultaría especialmente relevante debido a la disponibilidad limitada de fibroblastos de pacientes, proporcionando una alternativa experimental estable para el estudio de mutaciones asociadas a la enfermedad y la validación de futuras estrategias terapéuticas.

4.7 Integración en los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

El presente trabajo se alinea principalmente con el ODS 3: Salud y Bienestar, al centrarse en el desarrollo de estrategias de edición genética aplicadas a la ELA, una enfermedad neurodegenerativa grave y actualmente sin cura. Mediante la optimización de herramientas de *base editing* en modelos celulares relevantes, este estudio contribuye al avance de la medicina de precisión y al desarrollo de potenciales aproximaciones terapéuticas. Asimismo, el trabajo se relaciona con el ODS 9: Industria, Innovación e Infraestructura, al promover tecnologías biomédicas innovadoras basadas en edición genética y con el ODS 10: Reducción de las Desigualdades, debido al potencial futuro de las terapias personalizadas en enfermedades raras como es la ELA.

5. CONCLUSIONES.

- La aplicación de estrategias de edición de bases en fibroblastos derivados de pacientes con la ELA permitió corregir mutaciones patogénicas con elevados niveles de edición sobre las bases diana.
- La evaluación de ABE8e-SpRY mediante distintos ARN guías sintéticos permitió introducir mutaciones asociadas a la ELA en células HEK293T, evidenciando la influencia del contexto de secuencia y de la posición de la adenina sobre la eficiencia de edición.
- La comparación entre lipofección y nucleofección sugirió que el método de transfección influye sobre la eficiencia de edición y la viabilidad celular, mostrando la nucleofección mayores niveles de viabilidad celular que la lipofección.

6. BIBLIOGRAFÍA.

1. Goetz CG. Amyotrophic lateral sclerosis: early contributions of Jean-Martin Charcot. Muscle Nerve. 2000 Mar;23(3):336–43. doi:10.1002/(sici)1097-4598(200003)23:3%3C336::aid-mus4%3E3.0.co;2-l PubMed PMID: 10679709.

2. Yazdani S, Seitz C, Andersson J, Ingre C, Fang F, Lovik A. Methodological considerations in the analysis of survival data in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler Front Degener. 2026 Apr 3;27(3–4):445–56. doi:10.1080/21678421.2026.2615111 PubMed PMID: 41619791.

3. Al-Chalabi A, Hardiman O, Kiernan MC, Chiò A, Rix-Brooks B, Berg LH van den. Amyotrophic lateral sclerosis: moving towards a new classification system. Lancet Neurol. 2016 Oct 1;15(11):1182–94. doi:10.1016/S1474-4422(16)30199-5 PubMed PMID: 27647646.

4. Rowland L. Amyotrophic Lateral Sclerosis | New England Journal of Medicine [Internet]. 2001 [cited 2026 Apr 24]. Available from: https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200105313442207

5. Zarei S. A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis [Internet]. 2015 May 18 [cited 2026 Apr 24]. Available from: https://surgicalneurologyint.com/surgicalint-articles/a-comprehensive-review-of-amyotrophic-lateral-sclerosis/

6. Moreno-Jiménez L, Benito-Martín MS, Sanclemente-Alamán I, Matías-Guiu JA, Sancho-Bielsa F, Canales-Aguirre A, et al. Modelos experimentales murinos en la esclerosis lateral amiotrófica. Puesta al día. Neurología. 2024 Apr 1;39(3):282–91. doi:10.1016/j.nrl.2021.07.007

7. The New England Journal of Medicine [Internet]. [cited 2026 Apr 24]. Amyotrophic Lateral Sclerosis | NEJM. Available from: https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra1603471

8. Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, Corr EM, Logroscino G, Robberecht W, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. Nat Rev Dis Primer. 2017 Oct 5;3(1):17071. doi:10.1038/nrdp.2017.71

9. ¿Qué es la ELA? - Esclerosis Lateral Amiotrófica | La Asociación de ELA [Internet]. [cited 2026 Apr 24]. Available from: https://www.als.org/understanding-als/what-is-als

10. Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. Lancet. 2011 Mar 12;377(9769):942–55. doi:10.1016/S0140-6736(10)61156-7 PubMed PMID: 21296405.

11. Gordon PH, Cheng B, Katz IB, Pinto M, Hays AP, Mitsumoto H, et al. The natural history of primary lateral sclerosis. Neurology. 2006 Mar 14;66(5):647–53. doi:10.1212/01.wnl.0000200962.94777.71 PubMed PMID: 16534101.

12. Ramirez C, Piemonte MEP, Callegaro D, Da Silva HCA. Fatigue in amyotrophic lateral sclerosis: frequency and associated factors. Amyotroph Lateral Scler Off Publ World Fed Neurol Res Group Mot Neuron Dis. 2008 Apr;9(2):75–80. doi:10.1080/17482960701642502 PubMed PMID: 17924237.

13. Stambler N, Charatan M, Cedarbaum JM. Prognostic indicators of survival in ALS. ALS CNTF Treatment Study Group. Neurology. 1998 Jan;50(1):66–72. doi:10.1212/wnl.50.1.66 PubMed PMID: 9443459.

14. Leigh PN, Abrahams S, Al-Chalabi A, Ampong MA, Goldstein LH, Johnson J, et al. The management of motor neurone disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2003 Dec;74 Suppl 4(Suppl 4):iv32–47. doi:10.1136/jnnp.74.suppl_4.iv32 PubMed PMID: 14645465; PubMed Central PMCID: PMC1765641.

15. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Science. 2006 Oct 6;314(5796):130–3. doi:10.1126/science.1134108 PubMed PMID: 17023659.

16. Talbot K. Motor neuron disease: the bare essentials. Pract Neurol. 2009 Oct;9(5):303–9. doi:10.1136/jnnp.2009.188151 PubMed PMID: 19762894.

17. Le Gall L, Anakor E, Connolly O, Vijayakumar UG, Duddy WJ, Duguez S. Molecular and Cellular Mechanisms Affected in ALS. J Pers Med. 2020 Aug 25;10(3):101. doi:10.3390/jpm10030101 PubMed PMID: 32854276; PubMed Central PMCID: PMC7564998.

18. Wu Y, Wang J, Zhao Q. Advancements in TDP-43 research: Towards biomarkers and therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. Aging Health Res. 2025 Mar 1;5(1):100215. doi:10.1016/j.ahr.2024.100215

19. Xu Z, Yang C. TDP-43—The key to understanding amyotrophic lateral sclerosis. Rare Dis. 2014 Oct 30;2(1):e944443. doi:10.4161/21675511.2014.944443 PubMed PMID: 26942097; PubMed Central PMCID: PMC4755248.

20. McGurk L, Rifai OM, Bonini NM. TDP-43, a protein central to amyotrophic lateral sclerosis, is destabilized by tankyrase-1 and -2. J Cell Sci. 2020 Jun 23;133(12):jcs245811. doi:10.1242/jcs.245811 PubMed PMID: 32409565; PubMed Central PMCID: PMC7328137.

21. Babazadeh A, Rayner SL, Lee A, Chung RS. TDP-43 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases: Focusing on motor neuron disease and frontotemporal dementia. Ageing Res Rev. 2023 Dec;92:102085. doi:10.1016/j.arr.2023.102085 PubMed PMID: 37813308.

22. Mitra J, Guerrero EN, Hegde PM, Liachko NF, Wang H, Vasquez V, et al. Motor neuron

disease-associated loss of nuclear TDP-43 is linked to DNA double-strand break repair defects. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Mar 5;116(10):4696–705. doi:10.1073/pnas.1818415116 PubMed PMID: 30770445; PubMed Central PMCID: PMC6410842.

23. Yu CH, Davidson S, Harapas CR, Hilton JB, Mlodzianoski MJ, Laohamonthonkul P, et al. TDP-43 Triggers Mitochondrial DNA Release via mPTP to Activate cGAS/STING in ALS. Cell. 2020 Oct 29;183(3):636-649.e18. doi:10.1016/j.cell.2020.09.020 PubMed PMID: 33031745; PubMed Central PMCID: PMC7599077.

24. Deng H, Gao K, Jankovic J. The role of FUS gene variants in neurodegenerative diseases. Nat Rev Neurol. 2014 Jun;10(6):337–48. doi:10.1038/nrneurol.2014.78 PubMed PMID: 24840975.

25. Zu T, Gibbens B, Doty NS, Gomes-Pereira M, Huguet A, Stone MD, et al. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jan 4;108(1):260–5. doi:10.1073/pnas.1013343108 PubMed PMID: 21173221; PubMed Central PMCID: PMC3017129.

26. Taylor JP, Brown RH, Cleveland DW. Decoding ALS: from genes to mechanism. Nature. 2016 Nov 10;539(7628):197–206. doi:10.1038/nature20413 PubMed PMID: 27830784; PubMed Central PMCID: PMC5585017.

27. Tan W, Pasinelli P, Trotti D. Role of mitochondria in mutant SOD1 linked amyotrophic lateral sclerosis. Biochim Biophys Acta. 2014 Aug;1842(8):1295–301. doi:10.1016/j.bbadis.2014.02.009 PubMed PMID: 24568860; PubMed Central PMCID: PMC4074562.

28. Morales-Valero SF. Esclerosis lateral amiotrófica: avances evidentes, soluciones pendientes. Médicas UIS [Internet]. 2010 Jul 27 [cited 2026 Apr 24];23(2). Available from: https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistamedicasuis/article/view/1435

29. Bozzo F, Mirra A, Carrì MT. Oxidative stress and mitochondrial damage in the pathogenesis of ALS: New perspectives. Neurosci Lett. 2017 Jan 1;636:3–8. doi:10.1016/j.neulet.2016.04.065 PubMed PMID: 27150074.

30. Kikuchi H, Almer G, Yamashita S, Guégan C, Nagai M, Xu Z, et al. Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Apr 11;103(15):6025–30. doi:10.1073/pnas.0509227103 PubMed PMID: 16595634; PubMed Central PMCID: PMC1458691.

31. Kelekar A, Thompson CB. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. Trends Cell Biol. 1998 Aug;8(8):324–30. doi:10.1016/s0962-8924(98)01321-x PubMed PMID: 9704409.

32. Pasinelli P, Belford ME, Lennon N, Bacskai BJ, Hyman BT, Trotti D, et al. Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. Neuron. 2004 Jul 8;43(1):19–30. doi:10.1016/j.neuron.2004.06.021 PubMed PMID: 15233914.

33. Pedrini S, Sau D, Guareschi S, Bogush M, Brown RH, Naniche N, et al. ALS-linked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2. Hum Mol Genet. 2010 Aug 1;19(15):2974–86. doi:10.1093/hmg/ddq202 PubMed PMID: 20460269; PubMed Central PMCID: PMC2901139.

34. Hodge T, Colombini M. Regulation of metabolite flux through voltage-gating of VDAC channels. J Membr Biol. 1997 Jun 1;157(3):271–9. doi:10.1007/s002329900235 PubMed PMID: 9178614.

35. Norat P, Soldozy S, Sokolowski JD, Gorick CM, Kumar JS, Chae Y, et al. Mitochondrial dysfunction in neurological disorders: Exploring mitochondrial transplantation. NPJ Regen Med. 2020 Nov 23;5(1):22. doi:10.1038/s41536-020-00107-x PubMed PMID: 33298971; PubMed Central PMCID: PMC7683736.

36. Laslo P, Lipski J, Nicholson LF, Miles GB, Funk GD. GluR2 AMPA receptor subunit expression in motoneurons at low and high risk for degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. Exp Neurol. 2001 Jun;169(2):461–71. doi:10.1006/exnr.2001.7653 PubMed PMID: 11358459.

37. Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. N Engl J Med. 1994 Mar 3;330(9):585–91. doi:10.1056/NEJM199403033300901 PubMed PMID: 8302340.

38. Teglutik (riluzole) oral [Internet]. [cited 2026 Apr 24]. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/209080Orig1s000Lbl.pdf

39. Research C for DE and. FDA Approves Oral Form for the treatment of adults with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). FDA [Internet]. 2022 Jun 16 [cited 2026 Apr 24]. Available from: https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-oral-form-treatment-adults-amyotrophic-lateral-sclerosis-als

40. Abe K, Aoki M, Tsuji S, Itoyama Y, Sobue G, Togo M, et al. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Neurol. 2017 Jul 1;16(7):505–12. doi:10.1016/S1474-4422(17)30115-1 PubMed PMID: 28522181.

41. Tzeplaeff L, Wilfling S, Requardt MV, Herdick M. Current State and Future Directions in the Therapy of ALS. Cells. 2023 May 31;12(11):1523. doi:10.3390/cells12111523 PubMed PMID:

37296644; PubMed Central PMCID: PMC10252394.

42. Radicava, INN-edaravone [Internet]. [cited 2026 Apr 24]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/medicine-qa/questions-and-answers-withdrawal-marketing-authorisation-application-radicava-edaravone_en.pdf

43. Research C for DE and. FDA approves treatment of amyotrophic lateral sclerosis associated with a mutation in the SOD1 gene. FDA [Internet]. 2024 Sep 8 [cited 2026 Apr 24]. Available from: https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-treatment-amyotrophic-lateral-sclerosis-associated-mutation-sod1-gene

44. Rilutek | Agencia Europea de Medicamentos (EMA) [Internet]. 2017 [cited 2026 Apr 24]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/rilutek

45. Union Register of medicinal products [Internet]. [cited 2026 Apr 24]. Public Health - European Commission. Available from: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/h1783.htm

46. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 | Science [Internet]. [cited 2026 Apr 24]. Available from: https://www.science.org/doi/10.1126/science.1258096

47. Lim CKW, Gapinske M, Brooks AK, Woods WS, Powell JE, Zeballos C MA, et al. Treatment of a Mouse Model of ALS by In Vivo Base Editing. Mol Ther J Am Soc Gene Ther. 2020 Apr 8;28(4):1177–89. doi:10.1016/j.ymthe.2020.01.005 PubMed PMID: 31991108; PubMed Central PMCID: PMC7132599.

48. Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Nature. 2016 May;533(7603):420–4. doi:10.1038/nature17946

49. Porto EM, Komor AC, Slaymaker IM, Yeo GW. Base editing: advances and therapeutic opportunities. Nat Rev Drug Discov. 2020 Dec;19(12):839–59. doi:10.1038/s41573-020-0084-6 PubMed PMID: 33077937; PubMed Central PMCID: PMC7721651.

50. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. Science. 2013 Feb 15;339(6121):823–6. doi:10.1126/science.1232033 PubMed PMID: 23287722; PubMed Central PMCID: PMC3712628.

51. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 2012 Aug 17;337(6096):816–21. doi:10.1126/science.1225829 PubMed PMID: 22745249; PubMed Central PMCID: PMC6286148.

52. Thuronyi BW, Koblan LW, Levy JM, Yeh WH, Zheng C, Newby GA, et al. Continuous evolution of base editors with expanded target compatibility and improved activity. Nat Biotechnol. 2019 Sep;37(9):1070–9. doi:10.1038/s41587-019-0193-0 PubMed PMID: 31332326; PubMed Central PMCID: PMC6728210.

53. Zhang E, Neugebauer ME, Krasnow NA, Liu DR. Phage-assisted evolution of highly active cytosine base editors with enhanced selectivity and minimal sequence context preference. Nat Commun. 2024 Feb 24;15(1):1697. doi:10.1038/s41467-024-45969-7

54. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. Nature. 2017 Nov 23;551(7681):464–71. doi:10.1038/nature24644 PubMed PMID: 29160308; PubMed Central PMCID: PMC5726555.

55. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. Cell. 2014 Jun 5;157(6):1262–78. doi:10.1016/j.cell.2014.05.010 PubMed PMID: 24906146; PubMed Central PMCID: PMC4343198.

56. 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. 2014 Feb 27;156(5):935–49. doi:10.1016/j.cell.2014.02.001 PubMed PMID: 24529477; PubMed Central PMCID: PMC4139937.

57. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. Science. 2013 Feb 15;339(6121):819–23. doi:10.1126/science.1231143 PubMed PMID: 23287718; PubMed Central PMCID: PMC3795411.

58. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc. 2013 Nov;8(11):2281–308. doi:10.1038/nprot.2013.143

59. Hu JH, Miller SM, Geurts MH, Tang W, Chen L, Sun N, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. Nature. 2018 Apr;556(7699):57–63. doi:10.1038/nature26155

60. Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. Nature. 2014 Mar;507(7490):62–7. doi:10.1038/nature13011

61. Richter MF, Zhao KT, Eton E, Lapinaite A, Newby GA, Thuronyi BW, et al. Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity. Nat Biotechnol. 2020 Jul;38(7):883–91. doi:10.1038/s41587-020-0453-z

62. Alves CRR, Ha LL, Yaworski R, Sutton ER, Lazzarotto CR, Christie KA, et al. Optimization of base editors for the functional correction of SMN2 as a treatment for spinal muscular atrophy. Nat Biomed Eng. 2024 Feb;8(2):118–31. doi:10.1038/s41551-023-01132-z PubMed PMID: 38057426; PubMed Central PMCID: PMC10922509.

63. Walton RT, Christie KA, Whittaker MN, Kleinstiver BP. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants. Science. 2020 Apr 17;368(6488):290–6. doi:10.1126/science.aba8853 PubMed PMID: 32217751; PubMed Central PMCID: PMC7297043.

64. Rees HA, Liu DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. Nat Rev Genet. 2018 Dec;19(12):770–88. doi:10.1038/s41576-018-0059-1 PubMed PMID: 30323312; PubMed Central PMCID: PMC6535181.

65. Doman JL, Raguram A, Newby GA, Liu DR. Evaluation and Minimization of Cas9-Independent Off-Target DNA Editing by Cytosine Base Editors. Nat Biotechnol. 2020 May;38(5):620–8. doi:10.1038/s41587-020-0414-6 PubMed PMID: 32042165; PubMed Central PMCID: PMC7335424.

66. Perrotta RM, Vinke S, Ferreira R, Moret M, Mahas A, Chiappino-Pepe A, et al. Engineered base editors with reduced bystander editing through directed evolution. Nat Biotechnol. 2025 Dec 18;1–10. doi:10.1038/s41587-025-02937-w

67. Pallaseni A, Peets EM, Koeppel J, Weller J, Vanderstichele T, Ho UL, et al. Predicting base editing outcomes using position-specific sequence determinants. Nucleic Acids Res. 2022 Mar 14;50(6):3551–64. doi:10.1093/nar/gkac161 PubMed PMID: 35286377; PubMed Central PMCID: PMC8989541.

68. Arbab M, Shen MW, Mok B, Wilson C, Matuszek Ż, Cassa CA, et al. Determinants of Base Editing Outcomes from Target Library Analysis and Machine Learning. Cell. 2020 Jul 23;182(2):463-480.e30. doi:10.1016/j.cell.2020.05.037 PubMed PMID: 32533916.

69. Gerber AP, Keller W. An adenosine deaminase that generates inosine at the wobble position of tRNAs. Science. 1999 Nov 5;286(5442):1146–9. doi:10.1126/science.286.5442.1146 PubMed PMID: 10550050.

70. Crick FHC. Codon—anticodon pairing: The wobble hypothesis. J Mol Biol. 1966 Aug 1;19(2):548–55. doi:10.1016/S0022-2836(66)80022-0

71. Lapinaite A, Knott GJ, Palumbo CM, Lin-Shiao E, Richter MF, Zhao KT, et al. DNA capture by a CRISPR-Cas9 guided adenine base editor. Science. 2020 Jul 31;369(6503):566–71. doi:10.1126/science.abb1390 PubMed PMID: 32732424; PubMed Central PMCID: PMC8598131.

72. Gu S, Bodai Z, Cowan QT, Komor AC. Base Editors: Expanding the Types of DNA Damage Products Harnessed for Genome Editing. Gene Genome Ed. 2021 Jun;1:100005. doi:10.1016/j.ggedit.2021.100005 PubMed PMID: 34368792; PubMed Central PMCID: PMC8341163.

73. Conticello SG. The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. Genome Biol. 2008;9(6):229. doi:10.1186/gb-2008-9-6-229 PubMed PMID: 18598372; PubMed Central PMCID: PMC2481415.

74. Navaratnam N, Morrison JR, Bhattacharya S, Patel D, Funahashi T, Giannoni F, et al. The p27 catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme is a cytidine deaminase. J Biol Chem. 1993 Oct;268(28):20709–12. doi:10.1016/S0021-9258(19)36836-X

75. Harris RS, Dudley JP. APOBECs and virus restriction. Virology. 2015 May;479–480:131–45. doi:10.1016/j.virol.2015.03.012 PubMed PMID: 25818029; PubMed Central PMCID: PMC4424171.

76. Teng B, Burant CF, Davidson NO. Molecular Cloning of an Apolipoprotein B Messenger RNA Editing Protein. Science. 1993 Jun 18;260(5115):1816–9. doi:10.1126/science.8511591

77. Blanc V, Davidson NO. APOBEC-1 MEDIATED RNA EDITING. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2010;2(5):594–602. doi:10.1002/wsbm.82 PubMed PMID: 20836050; PubMed Central PMCID: PMC3086428.

78. Salter JD, Bennett RP, Smith HC. The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. Trends Biochem Sci. 2016 Jul;41(7):578–94. doi:10.1016/j.tibs.2016.05.001 PubMed PMID: 27283515; PubMed Central PMCID: PMC4930407.

79. Harris RS, Petersen-Mahrt SK, Neuberger MS. RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. Mol Cell. 2002 Nov;10(5):1247–53. doi:10.1016/s1097-2765(02)00742-6 PubMed PMID: 12453430.

80. Green AM, Landry S, Budagyan K, Avgousti DC, Shalhout S, Bhagwat AS, et al. APOBEC3A damages the cellular genome during DNA replication. Cell Cycle. 2016 Feb 26;15(7):998–1008. doi:10.1080/15384101.2016.1152426 PubMed PMID: 26918916; PubMed Central PMCID: PMC4889253.

81. Yuan T, Wu L, Li S, Zheng J, Li N, Xiao X, et al. Deep learning models incorporating endogenous factors beyond DNA sequences improve the prediction accuracy of base editing outcomes. Cell Discov. 2024 Feb 20;10(1):20. doi:10.1038/s41421-023-00624-1

82. Horlbeck MA, Witkowsky LB, Guglielmi B, Replogle JM, Gilbert LA, Villalta JE, et al.

Nucleosomes impede Cas9 access to DNA in vivo and in vitro. eLife. 5:e12677. doi:10.7554/eLife.12677 PubMed PMID: 26987018; PubMed Central PMCID: PMC4861601.

83. Isaac RS, Jiang F, Doudna JA, Lim WA, Narlikar GJ, Almeida R. Nucleosome breathing and remodeling constrain CRISPR-Cas9 function. eLife. 5:e13450. doi:10.7554/eLife.13450 PubMed PMID: 27130520; PubMed Central PMCID: PMC4880442.

84. Yarrington RM, Verma S, Schwartz S, Trautman JK, Carroll D. Nucleosomes inhibit target cleavage by CRISPR-Cas9 in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Sep 18;115(38):9351–8. doi:10.1073/pnas.1810062115 PubMed PMID: 30201707; PubMed Central PMCID: PMC6156633.

85. Bae DH, Marino M, Iaffaldano B, Fenstermaker S, Afione S, Argaw T, et al. Design and Testing of Vector-Producing HEK293T Cells Bearing a Genomic Deletion of the SV40 T Antigen Coding Region. Mol Ther Methods Clin Dev. 2020 Jul 9;18:631–8. doi:10.1016/j.omtm.2020.07.006 PubMed PMID: 32775497; PubMed Central PMCID: PMC7397404.

86. Lin S, Staahl BT, Alla RK, Doudna JA. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. eLife. 3:e04766. doi:10.7554/eLife.04766 PubMed PMID: 25497837; PubMed Central PMCID: PMC4383097.

87. Stepanenko AA, Dmitrenko VV. HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. Gene. 2015 Sep 15;569(2):182–90. doi:10.1016/j.gene.2015.05.065 PubMed PMID: 26026906.

88. Lee M, Chea K, Pyda R, Chua M, Dominguez I. Comparative Analysis of Non-viral Transfection Methods in Mouse Embryonic Fibroblast Cells. J Biomol Tech JBT. 2017 Jul;28(2):67–74. doi:10.7171/jbt.17-2802-003 PubMed PMID: 28507462; PubMed Central PMCID: PMC5410126.

89. Maurisse R, De Semir D, Emamekhoo H, Bedayat B, Abdolmohammadi A, Parsi H, et al. Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages. BMC Biotechnol. 2010 Feb 8;10:9. doi:10.1186/1472-6750-10-9 PubMed PMID: 20144189; PubMed Central PMCID: PMC2830169.

90. Crossley BM, Bai J, Glaser A, Maes R, Porter E, Killian ML, et al. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc. 2020 Nov;32(6):767–75. doi:10.1177/1040638720905833 PubMed PMID: 32070230; PubMed Central PMCID: PMC7649556.

91. Ellard S, Charlton R, Wallace A, Ramsden S. Practice Guidelines for Sanger Sequencing Analysis and Interpretation. 2006 Jan 1.

92. Al-Shuhaib MBS, Hashim HO. Mastering DNA chromatogram analysis in Sanger sequencing for reliable clinical analysis. J Genet Eng Biotechnol. 2023 Dec 1;21(1):115. doi:10.1186/s43141-023-00587-6

93. Chong ZX, Yeap SK, Ho WY. Transfection types, methods and strategies: a technical review. PeerJ. 2021 Apr 21;9:e11165. doi:10.7717/peerj.11165 PubMed PMID: 33976969; PubMed Central PMCID: PMC8067914.

94. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. Anal Bioanal Chem. 2010;397(8):3173–8. doi:10.1007/s00216-010-3821-6 PubMed PMID: 20549496; PubMed Central PMCID: PMC2911531.

95. Inoue T, Krumlauf R. An impulse to the brain—using in vivo electroporation. Nat Neurosci. 2001 Nov 1;4(11):1156–8. doi:10.1038/nn1101-1156

96. Iwaoka S, Nakamura T, Takano S, Tsuchiya S, Aramaki Y. Cationic liposomes induce apoptosis through p38 MAP kinase–caspase-8–Bid pathway in macrophage-like RAW264.7 cells. J Leukoc Biol. 2006;79(1):184–91. doi:10.1189/jlb.0405181

97. Filion MC, Phillips NC. Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. 1997 Oct 23;1329(2):345–56. doi:10.1016/S0005-2736(97)00126-0

98. Kamata H, Honda S ichi, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive Oxygen Species Promote TNFα-Induced Death and Sustained JNK Activation by Inhibiting MAP Kinase Phosphatases. Cell. 2005 Mar 11;120(5):649–61. doi:10.1016/j.cell.2004.12.041 PubMed PMID: 15766528.

7. ANEXOS.

7.1 Tabla suplementaria 1: Mutaciones y diseño de *protospacers*.

Modelo celular	gen	mutación	Ventana de edición	*protospacer*
HEK293T	*SOD1*	E22G	Secuencia contexto	AGTTATGGCGACGAAGGCCG
			5	TTCGaGCAGAAGGCAAGGGC
			8	AATTTCGaGCAGAAGGCAAG
		I113T	Secuencia contexto	CATATCCTTTTATGAAAACT
			5	AATGaTGCAATGGTCTCCTG
			7	CCAATGaTGCAATGGTCTCC
	TARDBP	M337V	Secuencia contexto	AGGCAGCACTACAGAGCAGT
			2	GaTGGGCATGTTAGCCAGCC
			10	TGGGGTATGaTGGGCATGTT
	FUS	H517R	5	GAGCaCAGACAGGATCGCAG
			6	TGAGCaCAGACAGGATCGCA
			7	GTGAGCaCAGACAGGATCGC
			11	ATCCTGTCTGtGCTCACCCC
FIBROBLASTOS	*SOD1*	E101G	6	AATCTcCAATAGACACATCGGCC
			8	AGAATCTcCAATAGACACAT
		N66S	2	AcTAAAGTGAGGACCTGCAC
			7	AGAGGAcTAAAGTGAGGACCTGC
			13	CTGGATAGAGGAcTAAAGTG
	TARDBP	I383V	5	CCAAcTGCTGCACCAGAATTAGA
			7	AACCAAcTGCTGCACCAGAATTA

7.2 Tabla Suplementaria 2: Materiales clave del estudio.

Kits	Casa comercial/fuente	Identificador
Ensayos comerciales (KITS)		
PureLink™ Genomic DNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific	K182001
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific	K0702
BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific	4337455
BigDye™ XTerminator™ Purification Kit	Thermo Fisher Scientific	4376486
Lipofectamine™ 3000	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)	L3000015
P2 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Kit	Lonza	V4XP-2024
pmaxGFP™ Vector	Lonza	VDF-1001
Reactivos de cultivo celular y otros		
DMEM	Thermo Fisher Scientific	11965092
FBS	Thermo Fisher Scientific	10270106
PBS	Thermo Fisher Scientific	10010023
Tripsina-EDTA	Thermo Fisher Scientific	10010023
Azul tripán	Thermo Fisher Scientific	25200056
DMSO	Sigma-Aldrich	D2650
Q5® High-Fidelity 2X Master Mix	New England Biolabs	M0492
Plásmidos		
pCMV-T7-ABE8e-nSpRY-P2A-EGFP	Addgene	#185912
eNme2C-CBE6b	Addgene	#215830
EE-BE4max	Addgene	#138158
ARN guías		
HEK2	Diseño in silico (Benchling)	Life Technologies S.A.
Context sequence *SOD1* E22G	Diseño in silico (Benchling)	Life Technologies S.A.
Context Sequence *SOD1* I113T	Diseño in silico (Benchling)	Life Technologies S.A.
Context sequence TARDBP M337V	Diseño in silico (Benchling)	Life Technologies S.A.
FUS H517R E5	Diseño in silico (Benchling)	Life Technologies S.A.
FUS H517R E6	Diseño in silico (Benchling)	Life Technologies S.A.
FUS H517R FW E7	Diseño in silico (Benchling)	Life Technologies S.A.
FUS H517R FW E11	Diseño in silico (Benchling)	Life Technologies S.A.
SOD1 E22G E5	Diseño in silico (Benchling)	Life Technologies S.A.

SOD1 E22G E8	Diseño in silico (Benchling)	Life Technologies S.A.
SOD1 I113T E5	Diseño in silico (Benchling)	Life Technologies S.A.
SOD1 I113T E7	Diseño in silico (Benchling)	Life Technologies S.A.
TARDBP M337V E2	Diseño in silico (Benchling)	Life Technologies S.A.
TARDBP M337V E10	Diseño in silico (Benchling)	Life Technologies S.A.
Modelos experimentales: líneas celulares		
HEK293T	Cytion (Alemania)	-
Fibroblastos primarios	Hospital Universitario	-
Equipos		
NanoDrop™ One Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific	ND-ONE-W
SimpliAmp™ Thermal Cycler	Applied Biosystems	A24811
Sistema de electroforesis en gel de agarosa	Bio-Rad	Según disponibilidad
4D-Nucleofector™ X Unit	Lonza	AAF-1003X
Secuenciador capilar	Applied Biosystems	Según disponibilidad
Centrífuga	Eppendorf	5418R
Software y análisis		
Benchling	Benchling Inc.- Herramienta web	-
BioRender	Herramienta web	-
EditR	Herramienta web	-
GraphPad Prism	GraphPad Software	Versión 10.4.1
Microsoft Excel	Microsoft	-