



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

La Revolución CRISPR.

The CRISPR Revolution.

Autor: D. Darío Herrán de la Gala

Director/es: D.ª Matxalen Llosa Blas

Santander, Junio 2018

ÍNDICE

1. RESUMEN / ABSTRACT	pag.2
2. ÍNDICE DE ABREVIATURAS	pag.3
3. PERSPECTIVA HISTÓRICA	pag.6
4. BASES DE LA INGENIERÍA GENÉTICA Y TERAPIA GÉNICA	pag.8
4.1. Los inicios de la ingeniería genética	pag.8
4.2. La terapia génica	pag.10
4.2.1. <u>Panorama actual de la terapia génica</u>	pag.10
4.2.2. <u>Mecanismos de introducción del material genético en ingeniería genética</u>	pag.11
4.2.2.1. <u>Vectores víricos</u>	pag.11
4.2.2.2. <u>Métodos no virales</u>	pag.14
4.2.3. <u>Edición genómica mediante nucleasas sitio-específicas</u>	pag.15
5. CRISPR-CAS: UN SISTEMA DE INMUNIDAD ADQUIRIDA PROCARIOTA	pag.19
5.1. Introducción a los mecanismos de defensa procariota	pag.19
5.2. Descubrimiento del sistema CRISPR-Cas	pag.20
5.3. Clasificación del sistema CRISPR-Cas	pag.24
5.3.1. <u>CRISPR-Cas Clase I</u>	pag.25
5.3.2. <u>CRISPR-Cas Clase II</u>	pag.26
5.4. Mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas	pag.29
6. VARIANTES DE CRISPR-CAS Y SUS APLICACIONES EN LA EDICIÓN GENÉTICA DE ORGANISMOS SUPERIORES	pag.32
6.1. Ortólogos de Cas	pag.33
6.2. Modificaciones del sistema CRISPR-Cas en laboratorio: versatilidad y plasticidad	pag.35
7. APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LA TECNOLOGÍA CRISPR-CAS	pag.38
7.1. Ensayos en cultivos celulares y células madre	pag.40
7.1.1. <u>Corrección genética de enfermedades monogénicas</u>	pag.40
7.1.2. <u>Cáncer: modelos de estudio y estrategias de curación</u>	pag.42
7.1.3. <u>Prevención de enfermedades infecciosas</u>	pag.43
7.2. Perspectivas de futuro: ensayos en embriones y seres humanos	pag.45
7.3. Inconvenientes relacionados con el uso de las tecnologías CRISPR-Cas	pag.47
8. IMPLICACIONES ÉTICAS DE LA APLICACIÓN DEL SISTEMA CRISPR-CAS	pag.48
9. BIBLIOGRAFÍA	pag.51
10. AGRADECIMIENTOS	pag.65

1. RESUMEN

CRISPR-Cas es ciertamente un regalo de la naturaleza. Constituye un sistema de respuesta inmune adaptativa propio de organismos procariotas. Desentrañar su mecanismo de acción ha servido para provocar una explosión en la investigación de la edición genética. Tan simple como una endonucleasa guiada por RNA, las endonucleasas Cas requieren un sgRNA para producir cortes en la secuencia objetivo. La maquinaria de reparación celular se encarga de añadir las modificaciones genéticas vía NHEJ o HDR. Enfoques recientes han establecido variantes de Cas con diferentes características que abarcan un sinfín de posibilidades en el laboratorio. Este progreso exponencial en el campo de investigación de CRISPR-Cas ha sido vertiginoso. Desde estudios moleculares, pasando por modelos animales, a ensayos *ex vivo* e *in vivo* y, en última instancia, ensayos clínicos. CRISPR-Cas ha demostrado su eficacia y seguridad manteniendo una tasa de éxito elevada. No obstante, han aparecido cuestiones éticas acerca de la edición de embriones o líneas de células madre, dado que esta técnica es fácilmente accesible y obtenible. Ha democratizado la edición genética, estamos viviendo la revolución CRISPR. En esta revisión, intentamos remarcar los hitos relacionados con el descubrimiento, mecanismo de acción, clasificación y aplicaciones de laboratorio y terapéuticas más relevantes del sistema CRISPR-Cas.

Palabras clave: *CRISPR-Cas, nucleasas, edición genética, medicina, ética.*

1. ABSTRACT

CRISPR-Cas system is truly a gift from nature. It constitutes an adaptive immune system found in prokaryotes. Unravelling the mechanistic of the system has served to develop an explosion in gene editing investigation. As simple as an RNA-guided endonuclease can get, Cas endonucleases require a sgRNA to cut the targeted sequence. Native cellular DNA repair machinery leads the genetic modification via NHEJ or HDR. Recent approaches have established Cas variants having different features that can encompass almost unending possibilities in the lab. This exponential progress in the CRISPR-Cas research field has been vertiginous. From molecular studies, through animal models, to *ex vivo* and *in vivo* tests; and, ultimately, to clinical trials, CRISPR-Cas has demonstrated its efficacy and safety and a high rate of success. Nevertheless, ethical issues such as embryonic and stem cell lineage editing have quickly become popular since this technique is so accessible and easily obtainable. It has democratized gene editing, we are truly living a CRISPR revolution. In this review, we try our best to highlight the milestones of CRISPR-Cas discovery, its mechanism of action, classification and major laboratory and therapeutic applications in the CRISPR-Cas field of research.

Key words: *CRISPR-Cas, nucleases, gene editing, medicine, ethics.*

2. INDICE DE ABREVIATURAS

AAV	Virus asociado a adenovirus <i>Adeno-associated virus</i>
bp	Pares de bases <i>Base pairs</i>
BRCA1	<i>Breast cancer 1</i>
Cas	Genes asociados a CRISPR <i>CRISPR Associated</i>
Cascade	Complejo asociado a CRISPR para la defensa antiviral <i>CRISPR-associated complex for antiviral defense</i>
cccDNA	DNA de doble cadena circular cerrado de forma covalente <i>Covalently closed circular DNA</i>
CCR5	<i>C-C chemokine receptor type 5</i>
CFTR	Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator</i>
CPP	Péptidos de penetración celular <i>Cell penetrating peptides</i>
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas regularmente espaciadas y agrupadas <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CRISPRa	<i>CRISPR activation</i>
CRISPRi	<i>CRISPR interference</i>
crRNA	CRISPR RNA
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
Danisco	<i>DuPont Nutrition & Health</i>
dCas9	<i>Deactivated Cas9</i>
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DNA	Ácido desoxirribonucleico <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DSB	Rotura de doble hebra <i>Double-Strand Break</i>
dsDNA	DNA de doble cadena <i>Double strain deoxyribonucleic acid</i>
eCas9	<i>Enhanced Cas9</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FREP1	<i>Fibrinogen-Related Protein 1</i>
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GMO	Organismos Genéticamente Modificados <i>Genetically Modified Organism</i>
GWAS	Estudio de Asociación de Genoma Completo <i>Genome-wide association study</i>
HBB	Gen de la beta-globina humana <i>Human Beta globin</i>

HDR	Reparación dirigida por homología <i>Homology-directed repair</i>
HFCas9	<i>High-fidelity Cas9</i> Cas9 de alta fidelidad
HSF1	Factor de transcripción de choque térmico 1 <i>Human heat-shock transcription factor 1</i>
IDLV	Lentivirus defectivos de integración <i>Integrase-defective lentiviral vectors</i>
iPSC	Células madre pluripotentes inducidas <i>induced Pluripotent Stem Cell</i>
Kb	Kilobases
KRAB	<i>Kruppel associated box</i>
LTR	Secuencia Larga Terminal <i>Long Terminal Sequence</i>
MeSH	<i>Medical Subject Headings</i>
MYBPC3	<i>Cardiac myosin-binding protein C 3</i>
nCas9	<i>Nickase Cas9</i>
NEHJ	Unión de extremos por procedimientos no homólogos <i>Non-homologous end joining</i>
NF-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NUC lobe	Dominio nucleasa <i>Nuclease lobe</i>
p300	Histona acetiltransferasa 300
PAM	Motivo adyacente al protoespaciador <i>Protospacer Adjacent Motifs</i>
RAMP	<i>Repair Associated Mysterious Proteins</i> Proteínas misteriosas asociadas a reparación
REC lobe	Dominio de reconocimiento <i>Recognition lobe</i>
RGEN	Endonucleasa guiada por RNA <i>RNA guided endonuclease</i>
RM	Restricción-Modificación
RNA	Ácido ribonucleico <i>Ribonucleic acid</i>
RPGR	<i>Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator</i>
RVD	Residuos Hipervariables <i>Repeat Variable Di-residues</i>
SaCas9	<i>Staphylococcus aureus Cas9</i>
SAM	Mediador de activación sinérgica <i>Synergistic activation mediator</i>
SCID	Inmunodeficiencia combinada grave <i>Severe Combined ImmunoDeficiency</i>
sgRNA	RNA de guía única <i>Single guide RNA</i>

SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes Cas9</i>
SPIDR	Repeticiones directas intercaladas por espaciadores <i>Spacer Interspersed Direct Repeats</i>
SRSR	Repeticiones cortas regularmente espaciadas <i>Short Regularly Spaced Repeats</i>
ssRNA	RNA de cadena simple <i>Single strain RNA</i>
SunTag	Supernova Tag
TALE	<i>Transcription activator-like effector</i>
TALEN	Nucleasas tipo activador de transcripción <i>Transcription activator-like effector nuclease</i>
TET1	<i>Ten-eleven translocation dioxygenase 1</i>
Tracr-RNA	<i>Trans-activating CRISPR RNA</i> RNA trans activador de CRISPR
VEB	Virus de Epstein-Barr
VHB	Virus de la Hepatitis B
VHS1	Virus Herpes Simple 1
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VP16	Factor de transcripción del virus herpes 16 <i>Herpes Simplex Viral Protein 16</i>
VPH	Virus del Papiloma Humano
ZFN	Nucleasa con dedos de Zinc <i>Zinc Finger Nuclease</i>
ZFP	Proteína con dedos de Zinc <i>Zinc Finger Protein</i>

3. PERSPECTIVA HISTÓRICA

La actividad humana siempre ha estado en estrecha relación con la modificación genética, aunque fuera de modo ignoto. La domesticación animal puede considerarse una modificación genética indirecta que data de miles de años antes de Cristo (1). En cuanto a la agricultura, la selección artificial de plantas ha sido y es un método efectivo de evolución dirigida, en la cual se “moldeaban” a través de generaciones los fenotipos de interés. Sin embargo, a pesar de que estos procesos llegaron a realizarse con maestría, carecían de una base biológica y molecular evidente.

Con el avance de la ciencia y la investigación, se descubrió el ácido desoxirribonucleico (DNA –*Deoxyribonucleic acid*– en inglés). En 1869, el biólogo y médico suizo Friedrich Miescher acuñó el término “nucleína” para definir unas sustancias ricas en fósforo propias de los núcleos de los leucocitos. Sin apenas repercusión científica, el trabajo de Miescher fue reforzado 50 años después por Phoebus Levene, quien describió de forma más precisa la química de los nucleótidos como conjuntos de fosfato, azúcar y base. Fue Erwin Chargaff, en 1950, quien establece que el número total de purinas en una molécula de DNA se corresponde con el número total de pirimidinas. Y sería en 1953 cuando el famoso estudio de Watson y Crick explicó la conformación espacial del DNA como una doble cadena helicoidal complementaria (2) (3). Como culmen del conocimiento del DNA, la secuenciación completa del genoma humano se concluyó en 2001 (4) (5), tras más de 10 años de trabajo. (6)

Los conocimientos sobre la herencia o transferencia de caracteres entre organismos y las moléculas implicadas en estos procesos fue también un campo de investigación paralelo. Cabe descartar el nombre de Gregor Mendel, quien en 1865 describió leyes de herencia entre organismos, pero sin relacionar el DNA con ello (concepto aún desconocido) (7). En 1944, Oswald Avery, Colin McLeod y Maclyn McCarty demostraron experimentalmente que el llamado “principio transformante” (un factor de virulencia que se transmitía de estreptococos muertos a vivos, descrito por Frederick Griffith en 1928 (8)) estaba formado DNA y no por proteínas como se sospechaba en aquella época. (9)

Tras establecer la comprensión de la estructura molecular y la biología hereditaria del DNA, hubo una explosión en el desarrollo del campo de la genética. Siendo el DNA la molécula portadora de las instrucciones ligadas al desarrollo y fisiología de los organismos, no tardó en formularse la hipótesis de poder generar cambios en el DNA que determinasen la adquisición o desaparición de características en las células. El descubrimiento de las enzimas de restricción, enzimas capaces de cortar la hebra de DNA en un punto concreto, a finales de la década de los 60 por Werner Arber, Hamilton Smith y Daniel Nathans, sentó las bases para el nacimiento de lo que se conoce como ingeniería genética (10) (11) (12). Los organismos genéticamente modificados (GMO) no tardaron en aparecer, siendo el primer animal un ratón (Rudolf Jaenisch en 1974) (13) y la primera planta modificada genéticamente la planta de tabaco (Michael W. Bevan, Richard B. Flavell y Mary-Dell Chilton en 1983) (14). Este nuevo campo fue popularizándose a pesar de que estos modelos iniciales de ingeniería genética requerían de una gran inversión económica y temporal, con resultados muchas veces indeseados,

estocásticos o no representativos. La disciplina de esta área tuvo un avance exponencial, pero a costa de estos escollos.

Existen múltiples enfermedades genéticas de herencia mendeliana asociadas a regiones concretas del DNA. Gracias a los métodos de secuenciación o asociación actuales, crecientemente rápidos y accesibles, más genes son relacionados con enfermedades genéticas, susceptibilidad a padecer enfermedades complejas o infecciones. Esta asociación gen-enfermedad ha generado expectación en el campo biomédico. Concretamente, la ingeniería genética habilitó la posibilidad de crear un campo de investigación con intención curativa de estas enfermedades: la terapia génica. Las estrategias actuales de edición genética se basan en la utilización de nucleasas sitio-específicas. Entre ellas caben destacar las nucleasas con dedos de Zinc, las *Transcription activator-like effector nuclease* (TALEN) y el sistema CRISPR-Cas.

El sistema CRISPR-Cas fue descrito ya en el siglo XXI (15), y su aplicación a la edición genética ha supuesto una verdadera revolución en el campo (16). En 2002, se propone el acrónimo CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) para denominar a un grupo de secuencias genéticas repetitivas en células procariotas que se encontraban espaciadas de forma regular (17) (18). Estas secuencias ya eran conocidas. Fueron descubiertas de forma accidental en primera instancia en 1987 durante el estudio del gen *iap* en *Escherichia coli* (19). En el año 2000, Francisco JM. Mojica y su equipo describieron la presencia de dichas secuencias repetitivas en más del 40% de las bacterias secuenciadas y más del 90% de las arqueas. (15)

Tras el progresivo estudio de estas secuencias, se descifró un sistema de proteínas asociado. En 2002 se identificaron los primeros genes Cas (CRISPR associated), que intervenían junto con CRISPR en una función similar a una inmunidad adaptativa de bacterias frente a virus bacteriófagos y otros elementos móviles invasores, utilizando nucleasas (entre otros). Dicho sistema dotaba a los “espaciadores” de las secuencias repetitivas de un papel similar a remanentes de infecciones previas por bacteriófagos. Fueron definidas más funciones de los sistemas CRISPR en la naturaleza, desde mecanismos de patogenicidad bacterianos a cambios fenotípicos guiados por este complejo genético. En 2012, Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier describieron el sistema CRISPR-Cas9, uno de los muchos sistemas CRISPR, como una herramienta fácil, barata y de gran eficacia, con gran potencial de cara a la edición de genomas (20). El mecanismo es tremendamente intuitivo en su forma más simple: con una proteína Cas9 y una secuencia de RNA complementaria a la secuencia objetivo, podríamos cortar la doble hebra de DNA beneficiándonos de la actividad nucleasa de Cas9, eliminando así la secuencia objetivo y usando los mecanismos propios de la célula receptora para la reparación de las roturas de doble hebra.

A partir de ese momento surge una auténtica revolución CRISPR por la que múltiples laboratorios de diversos países comienzan una edición genómica sobre todo tipo de organismos, desde plantas a animales, incluidos embriones humanos. El sistema de edición genética de CRISPR lleva pocos años en el campo, sin embargo ha conseguido monopolizar prácticamente las publicaciones científicas del área. Abarca multitud de campos de interés y gran variedad de posibilidades: desde la elaboración de transgénicos alimentarios, el tipado bacteriano, la creación de antibióticos específicos,

la producción de cultivos agrícolas resistentes a plagas, la visualización al microscopio de genes y regiones cromosómicas... etc. La perspectiva sanitaria del sistema CRISPR-Cas es abrumadora, podría permitir la curación de enfermedades de base genética mediante múltiples mecanismos. Aunque la función más conocida del sistema CRISPR-Cas es la de nucleasa, hoy día puede modificarse dicho complejo molecular para realizar todo tipo de acciones: bloquear la expresión de un gen, sustituir un gen por otro, aumentar la transcripción de una región concreta, realizar modificaciones epigenéticas...

Todo ello ha avanzado más rápido que la legislación, por lo que tal facilidad para la edición genética genera problemas de índole ética. La terapia génica utilizando el sistema CRISPR-Cas es una técnica tremendamente revolucionaria que podría modificar enfermedades y aspectos genéticos de muchas maneras posibles, y así se ha visto en ensayos que han puesto contra las cuerdas a la comunidad científica en cuanto a los límites de dicha aplicación. Dada la fácil accesibilidad por parte de los laboratorios a estas nuevas técnicas rápidas, baratas y altamente eficaces, ya sea por propia producción del sistema CRISPR-Cas o a través de terceras empresas encargadas de su distribución, se ha democratizado y facilitado la ingeniería genética a unos límites nunca vistos.

El futuro augura nuevos usos de CRISPR y mejoras en la técnica, dado que aún no es cien por cien eficaz. Los fenómenos "*off-target*" son menores comparados con otras técnicas de terapia génica, pero dichos fenómenos pueden implicar la acción del sistema CRISPR-Cas en regiones genéticas no deseadas produciendo todo tipo de efectos indeseados, entre ellos la activación tumoral de la célula. Así como el panorama de la edición genética y la terapia génica se encuentran actualmente envueltos en un aura de optimismo, no podemos olvidar los conflictos éticos adyacentes a la manipulación genética indiscriminada o los peligros de que la edición genética se haya popularizado y facilitado tanto.

4. BASES DE LA INGENIERÍA GENÉTICA Y TERAPIA GÉNICA

4.1. Los inicios de la ingeniería genética

La Ingeniería Genética o Tecnología del DNA Recombinante conforma un grupo amplio de técnicas y metodologías que tienen el fin de manipular el DNA y transferirlo a células y organismos pluricelulares. Consiste en la modificación dirigida del genoma de un organismo vivo mediante técnicas tales como la alteración del DNA, la sustitución del material genético por medio de un virus, el trasplante de núcleos enteros... etc. (21)

El empleo de esta tecnología tiene cabida en múltiples esferas científicas, siendo utilizada en la biología, la biomedicina, la biotecnología y con fines industriales por diferentes entes corporativos. El desarrollo de esta ciencia desde 1970 marcó el inicio de una nueva era en la Biología: por primera vez en la historia, los científicos podían manipular moléculas de DNA haciendo posible un sinfín de opciones hasta entonces inverosímiles.

Durante la década de los 60, el descubrimiento y aislamiento de las enzimas de restricción por W. Arber, D. Nathans & H. Smith, marcó un punto de inflexión. Las enzimas de restricción o endonucleasas de restricción son enzimas que cortan DNA de doble cadena (dsDNA) tras reconocer un fragmento específico del mismo (normalmente de entre 4 y 8 pares de bases (bp) generalmente palindrómicas). Dicho hallazgo les fue reconocido con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 1978. (22)

Se atribuye como punto de referencia de la ingeniería genética las publicaciones de 1973 de Herbert W. Boyer y Stanley Cohen. En dichas investigaciones, produjeron *in vitro* plásmidos de DNA a partir de fragmentos de varios plásmidos. Dichos fragmentos fueron conseguidos mediante el uso de enzimas de restricción y cohesionados por la acción de enzimas tipo ligasa. Consiguieron una transmisión de estos plásmidos generados en laboratorio entre *E. coli* de forma satisfactoria, que además se transmitía de forma vertical (23). Subsecuentes experimentos permitieron transferir plásmidos entre diferentes especies bacterianas (de *Staphylococcus* a *E. coli*) (23). Posteriormente, a finales de los 70, la secuenciación de DNA, conjugada con los conocimientos previos sobre el código genético, ayudó a descifrar genomas completos de organismos de forma cada vez más rápida y eficaz según avanzaron las técnicas. El conocimiento de los genomas permitió conocer la biodiversidad del planeta y establecer diferencias inter e intra-especies, así como establecer relaciones filogenéticas entre las mismas.

El campo de la biotecnología es de los primeros en aplicar la ingeniería genética. Si bien las industrias han impulsado el desarrollo de esta disciplina para mejorar sus procesos de fabricación (habitualmente de carácter alimentario), fue *Genentech*, en 1978, quien consiguió engendrar bacterias productoras de hormona del crecimiento e insulina (24) con alta homología a las humanas a través de la introducción de los genes codificantes para dichas proteínas en plásmidos. (25)

La experimentación científica se basa ampliamente en la reproducción de modelos de enfermedad animales. Los organismos genéticamente modificados (GMO) obtenidos de la tecnología del DNA recombinante permitieron elaborar el primer ratón GMO en 1974 (3), sin embargo, el primer ratón transgénico con capacidad para transmitir el material genético modificado a su prole se atribuye a Palmiter y Brinster, en torno a 1981. (26)

Posteriormente, a mediados de los 80, se añade otra herramienta básica de ingeniería genética: la PCR. La ingeniería genética se confirma como un campo de vital interés biomédico, elaborándose la primera vacuna producida por recombinación de DNA: la vacuna contra el virus de la hepatitis B (VHB) (27). En la década de los 90, se comercializó de forma abierta el primer vegetal transgénico (tomate *FlavSavr*) aprobado para su consumo humano por la *Food and Drug Administration* (FDA) de Estados Unidos.

La ingeniería genética engloba múltiples apartados dada su polivalencia y capacidad de aplicación. La base de datos *Medical Subject Headings* (MeSH) organiza jerárquicamente los campos de la **Tabla 1** como subapartados de la ingeniería genética (21). Hoy día, las nuevas técnicas de secuenciación e ingeniería genética son increíblemente más rápidas y costo-eficientes, por lo que el desarrollo de la genética y la ingeniería genética han progresado de forma exponencial en esta última década.

4.2. La terapia génica

4.2.1. Panorama actual de la terapia génica

Se han descrito más de 3000 genes humanos implicados en enfermedades de herencia mendeliana. Gracias a los avances de la secuenciación genética y los estudios de asociación de genoma completo (GWAS), podemos definir gran variedad de genes correlacionados de forma directa o indirecta con la susceptibilidad a padecer enfermedades complejas de carácter poligénico. El número de genes humanos implicados en la patogenia de enfermedades no deja de crecer, por otra parte, la mayoría de estas enfermedades no tienen un tratamiento curativo o directamente no tienen tratamiento efectivo. (28)

Concepto	Definición
Evolución dirigida	Técnicas usadas para generar y seleccionar moléculas que exhiben propiedades que cumplen con la expectativa del experimentador. El objetivo es utilizar mecanismos evolutivos de selección de los clones de más interés.
Barajado de DNA (<i>DNA shuffling</i>)	Uso de la recombinación homóloga de DNA con el fin de obtener una biblioteca genética de genes quiméricos. Dicha biblioteca se obtiene de una población de secuencias genéticas relacionadas, fragmentadas de forma aleatoria.
Ingeniería de proteínas	Procedimientos por los cuales la estructura y la función de las proteínas se modifican o crean <i>in vitro</i> al alterar los genes, o sintetizar nuevos genes estructurales, que dirigen la síntesis de proteínas con las propiedades buscadas.
Edición genética	Técnicas de ingeniería genética que requieren de los mecanismos de reparación de DNA para incorporar modificaciones sitio-específicas en el genoma celular
Terapia génica	Técnicas y estrategias que incluyen el uso de secuencias codificantes u otros medios para transformar o modificar células con el propósito de tratar o revertir situaciones patológicas.
Mejora genética (<i>Genetic enhancement</i>)	Uso de metodologías genéticas con el fin de mejorar las capacidades funcionales de un organismo (sin tener en cuenta la enfermedad)
Preselección sexual	Métodos de control del sexo de la descendencia
Ingeniería metabólica	Métodos y técnicas utilizados generalmente para modificar genéticamente células con el fin de optimizar sus rutas metabólicas y/o desarrollar condiciones para que las células crezcan como biorreactores (ej: biocombustibles)

Tabla 1. Posibles aplicaciones de las técnicas de ingeniería genética (21)

La terapia génica compone el conjunto técnicas y estrategias que buscan, a través de la introducción de material genético, la modificación de células u organismos con el fin de tratar, revertir o prevenir enfermedades. La terapia génica se sirve de un proceso complejo, en el cual debe diseñarse una estrategia específica según el trastorno a tratar, identificando con precisión el gen diana y el resultado deseable. Debe tenerse en cuenta el mecanismo de introducción del material genético (Ver siguiente apartado) así como la forma de acceder al tejido o células diana. Tras todo el estudio, queda el complejo paso de trasladar dichos resultados experimentales a organismos vivos evitando efectos secundarios indeseables.

La terapia génica, que utiliza técnicas de ingeniería genética para modificar células con el propósito de tratar o revertir situaciones patológicas, ha sido el campo de mayor

potencial biomédico para intentar solventar estas enfermedades. Pone de manifiesto un abanico de posibilidades: desde la teórica curación de enfermedades monogénicas al abordaje de enfermedades multifactoriales o incluso sin base genética.

Inicialmente, la introducción del material genético era de forma directa y estocástica, dando lugar a múltiples complicaciones dada la aleatoriedad de su implantación (29). Con el paso del tiempo, la terapia génica se ha nutrido de diferentes hallazgos. Entre ellos se encuentran las nucleasas sitio-específicas (Ver apartado 4.2.3). Esto ha permitido el llamado “*Gene targeting*”: la integración de DNA exógeno en el genoma de un organismo de forma controlada, basándose en el reconocimiento de secuencia, “apuntando” así directamente a un gen diana. (30)

Aunque existen múltiples abordajes desde el punto de vista de la terapia génica de cara a la “curación genética” de enfermedades, son pocos los ejemplos utilizados de forma rutinaria en la práctica o que se encuentren en fases avanzadas de investigación.

4.2.2 Mecanismos de introducción del material genético en terapia génica.

Existen múltiples tácticas por las cuales se busca modificar el gen afecto, ya sea eliminándolo, sustituyéndolo por la variante sana del mismo, aumentando su expresión si fuese defectiva o disminuirla si fuese excesiva. Sin embargo, todas ellas requieren de una forma u otra de la introducción de material genético en las células. Además, las diferentes técnicas de laboratorio limitan el tipo de vehículo (vector) que usamos para introducir el material de edición genética.

La introducción de material genético tiene varios abordajes (**Figura 1**). Podemos actuar sobre material genético aislado artificialmente (*in vitro*), en el interior de células eucariotas aisladas (*ex vivo*), o en un organismo pluricelular (*in vivo*). (31)

Dadas las propiedades de los ácidos nucleicos –tamaño grande, carga negativa y baja habilidad de penetración de membrana– se dificulta mucho la introducción en modelos *in vivo*. (32)

El mecanismo más extendido utiliza como vector un virus con el fin de encapsular el gen deseado en su forma RNA o DNA. Los métodos no virales incluyen métodos físicos y nanomateriales.

4.2.2.1. Vectores víricos

Los vectores víricos utilizados en terapia génica son de muchos tipos. Los más utilizados son: retrovirus, adenovirus y virus asociados a adenovirus (*Adeno-associated virus* - AAVs). Sus principales características se comparan en la **Tabla 2**.

Los retrovirus se replican por transcripción inversa. No son capaces de infectar células que no se dividen (como neuronas o células musculares), por lo que son más apropiados para utilizarlos en estrategias *ex vivo*. Este tipo de virus se integra en el genoma de la célula huésped como parte de su ciclo vital. Sin embargo, tras varios estudios, se apreciaron efectos adversos no deseados derivados de su inserción (mutagénesis) (29) (33) (34). Concretamente, en un estudio que buscaba tratar la inmunodeficiencia

combinada grave (SCID) mediante terapia génica basada en retrovirus (35), se informaron de cuatro casos de leucemia (uno de ellos mortal) derivados de dicho tratamiento (29) (36). Tal hecho conmocionó a la comunidad científica. (37) (38)

Es por ello por lo que, a raíz de entonces, se extendió el uso de los lentivirus defectivos de integración (*Integrase-defective lentiviral vectors* - IDLVs). Los IDLVs no pueden integrarse en el DNA. Como contrapartida, su transfección mantiene el genoma de forma episomal (DNA que funciona sin integrarse en el genoma propio de la célula), y se va perdiendo de forma vertical en divisiones celulares sucesivas. (28) (39)



Figura 1. Mecanismos de entrega de material genético en edición genética. CPPs: *Cell penetrating peptides* (Péptidos de penetración celular). AAV: *adeno-associated virus* (Virus asociado a Adenovirus). IDLV: *integrase-defective lentiviral vector* (Lentivirus defectivos de integración). (28)

Tanto adenovirus como AAVs han sido investigados para terapias *in vitro* y *ex vivo*. Los vectores basados en adenovirus entregan en la célula DNA de cadena doble (dsDNA) haciéndolos útiles para la expresión transitoria de proteínas, dado que no se integran en el genoma. Los AAVs son vectores pequeños, simples y episomales capaces de

transducir material genético tanto en células en división como en células quiescentes. Las ZFNs y los sistemas CRISPR-Cas han conseguido ser vehiculizados en estos dos sistemas *ex vivo* e *in vivo*.

En múltiples ensayos clínicos algunos vectores virales han demostrado una introducción eficiente del gen. Sin embargo, existen reacciones adversas graves a dichas instilaciones (reacciones inflamatorias sistémicas). Como ejemplo, Jesse Gelsinger se convirtió en la primera “víctima” de la terapia génica al fallecer a los 18 años consecuencia de una reacción inmune derivada de la terapia génica basada en adenovirus para la enfermedad que padecía (déficit de ornitina transcarbamilasa). (40) (41)

No obstante, a efectos biomédicos, el abordaje más radical e interesante sería el *in vivo*, mediante la introducción directa del gen en el organismo funcionante. El tamaño y naturaleza de las nucleasas es uno de los principales inconvenientes (28). Los vectores víricos plantean especiales problemas con las TALENs, dado que su tamaño aumenta la complejidad del método y además consigue resultados insatisfactorios. Independientemente de los métodos de producción de TALENs hasta la fecha, estas son más complejas de vehiculizar que las ZFNs. (39)

Virus	Genoma	Capacidad	Duración de la expresión	Inmunogenicidad	Plataformas	Tropismo <i>in vivo</i>
IDLV	RNA de cadena simple (episomal)	~8kb	Transitoria (Depende de la división celular)	Baja	<i>In vitro</i> y <i>ex vivo</i>	No aplicable
AAVs	DNA de cadena simple (episomal)	~5kb	Mucho tiempo (años) en células quiescentes. Menor tiempo en células proliferativas.	Baja	<i>In vitro</i> , <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i>	Depende del serotipo
Adeno-virus	DNA de doble cadena (episomal)	~8-32 kb	Largo tiempo de expresión (semanas a meses)	Alta	<i>In vitro</i> , <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i>	Hígado

Tabla 2. Características de los vectores víricos utilizados en ingeniería genética. IDLV: *Integration-Deficient LentiViruses* (lentivirus defectivos de integración). AAVs: *Adeno-Associated Viruses*. Kb: Kilobases (1000 pares de bases). (28)

Los vectores virales pueden conseguir elevados porcentajes de transducción y expresión a largo plazo, pero vienen acompañados de inconvenientes como la inmunogenicidad, la pobre especificidad de su tropismo, su elevado precio y el tamaño limitado del cargamento. (39)

Concretamente, el sistema CRISPR-Cas ha sido ampliamente estudiado para ser introducido a través de vectores víricos. Los lentivirus, dada su alta capacidad, pueden introducir la mayoría de los genes Cas y RNAs guía (sgRNA). Los adenovirus tienen también una gran capacidad de almacenamiento; no obstante, se han reportado en lo que su administración genera una respuesta inmune importante en modelos animales (42). Los AAVs poseen una limitación: su capacidad de empaquetamiento, la variante de Cas9 del *Staphylococcus aureus* (SaCas9) sí que cabe en su envoltura. Cas9 del

Streptococcus pyogenes (SpCas9), por el contrario, es de mayor tamaño y no puede ser empaquetado, a no ser que introduzca de forma fragmentada en vectores separados. (43)

4.2.2.2. Métodos no virales

Poseen grandes ventajas sobre los modelos víricos en cuanto a volumen genético a introducir o porcentaje de células que integran el gen. Además, se consideran menos tóxicos que los vectores virales. (39)

Dentro de los métodos físicos tenemos la electroporación, en la cual un pulso eléctrico que desestabiliza las membranas celulares permite la entrada de moléculas (desde pequeñas moléculas a macromoléculas) en el citoplasma. Otro método es la deformación mecánica de la célula, en la cual se produce una disrupción transitoria de la membrana celular al hacerla circular por un microfluido, haciendo aparecer poros en su superficie que favorecen la entrada de macromoléculas. Tanto la deformación mecánica como la electroporación se han utilizado de forma exitosa en los sistemas CRISPR-Cas.

Los métodos basados en nanopartículas son utilizados para transfectar células *in vitro* y *ex vivo* mediante moléculas basadas en lípidos o polímeros. Los métodos basados en nanopartículas suelen asociarse a vectores virales para aumentar la eficacia (28). Las nanopartículas basadas en lípidos, o liposomas, también han sido utilizadas *in vivo*, e incluso permiten acceder a células específicas expresando en la superficie del liposoma los antígenos apropiados (44). Como última innovación, la proteína Cas9, junto con un sgRNA y una DNA donante ha conseguido ser vehiculizado a través de nanopartículas de oro. (45)

Los métodos físicos de modificación genética *in vivo* componen la inyección hidrodinámica y la inyección embrionaria. En la inyección hidrodinámica se produce una inyección endovenosa rápida y de altos volúmenes en el organismo diana. Sin embargo, no está exenta de toxicidad y tiene baja eficacia de transducción. Los métodos basados en inyección (tanto hidrodinámica como en células *ex vivo* o embriones) han podido vehiculizar ZFNs, TALENs y sistemas CRISPR-Cas (39). Existe otro método inyectivo, llamado “*gene gun*” o inyección biolística (46), que se basa en la transferencia directa de material genético adherido a metales pesados propulsados a gran velocidad sobre células. (47)

Uno de los métodos no virales más relevantes es la inyección en embriones. Dado el bajo volumen de células que conforman un embrión, modificar sus células aseguraría que cuando éstas repliquen transfieran el gen de forma homogénea por todos los linajes. Sin embargo, la edición de embriones, especialmente embriones humanos (como ya se ha realizado en algunos estudios), (48) ha creado un conflicto ético entre la comunidad científica. (49) (50)

4.2.3. Edición genómica mediante nucleasas sitio-específicas

Actualmente se han desarrollado una serie de nucleasas de DNA programables para realizar edición genética. Las nucleasas son enzimas hidrolasas que rompen los enlaces fosfodiéster que establecen los ácidos nucleicos entre sí. Se consideran programables porque reconocen una secuencia específica de material genético, permitiendo así corregir de forma directa mutaciones en regiones asociadas a patologías (entre otros usos).

Las herramientas más relevantes son (**Tabla 3**):

1. Las nucleasas con dedos de zinc (ZFNs).
2. Las nucleasas tipo activadores de transcripción (*transcription activator-like nucleases*: TALENs).
3. Las nucleasas asociadas a secuencias CRISPR.

Herramientas de edición genómica	Molécula implicada		Origen
	Reconocimiento de secuencia	Rotura de DNA de doble hebra	
Nucleasas con dedos de Zinc	<u>Proteína</u> : Proteína de dedos de Zinc (ZFP) ▪ 1 dedo de Zinc (3 Aminoácidos) → 3 bp	<u>Proteína</u> ▪ Nucleasa Fok1	Artificial
TALEN (Nucleasas tipo activador de transcripción)	<u>Proteína</u> : TAL effector ▪ 2 aminoácidos → 1 bp	<u>Proteína</u> ▪ Nucleasa Fok1	Natural
CRISPR-Cas9	<u>RNA</u> ▪ 1 ribonucleótido → 1 bp	<u>Proteína</u> ▪ Cas9	Natural

Tabla 3. Nucleasas sitio-específicas utilizadas en edición genómica (51)

Las nucleasas utilizadas en la edición genética reconocen regiones específicas del genoma, produciendo rotura de la doble hebra de DNA (*Double-strand breaks*: DSBs) que es reparada por la maquinaria endógena de la célula por dos vías complejas (**Figura 2**):

- *Non-homologous end joining* (NHEJ): unión de extremos por procedimientos no homólogos. Este sistema hace aparecer deleciones o inserciones (*indel mutations*) que buscan crear microhomología con el fin de sellar la DSB de forma rápida. Dichas modificaciones pueden romper la pauta de lectura si la zona diana corresponde a una región codificante, dando lugar a la ausencia de proteína o proteínas no funcionantes. (**Figura 2A**) (52)
- *Homology-directed repair* (HDR): reparación dirigida por homología. Si el sistema de reparación tiene una secuencia heteróloga prefijada a voluntad (DNA donante o *donor DNA* en inglés) con homología a las regiones que flanquean la DSB, dicho DNA donante (o DNA molde) se integra en el punto de rotura permitiendo incorporar la mutación deseada. (**Figura 2B**) (53)

En la mayoría de los casos, el sistema más eficiente que funciona por defecto es el NHEJ, dado que la vía HDR es notoriamente más compleja en su cascada enzimática. HDR requiere, además, la administración exógena de un DNA donante con secuencia homóloga a la DBS. HDR puede ser utilizado para reparar genes defectuosos o añadir un gen (*knock in*) en un locus específico para producir patrones de expresión predecibles (28).

Como podemos ver en la **Tabla 3**, tanto ZFNs como TALENs son nucleasas programables que generan DSBs basadas en el reconocimiento de DNA por proteínas. Ambas tienen dos dominios funcionales: uno de reconocimiento y otro de actividad nucleasa. Son nucleasas modulares y pueden ser generadas en diferentes configuraciones para reconocer según qué regiones del genoma, pero requieren de un elevado coste y tiempo para su ingeniería (54). Las TALENs se unen de forma individual a los nucleótidos, mientras que las ZFNs se unen a tripletes de nucleótidos de DNA (**Tabla 3**). Es por esta razón por la que la especificidad de las ZFNs es más compleja de conseguir en ingeniería de proteínas comparado con las TALENs. (55)

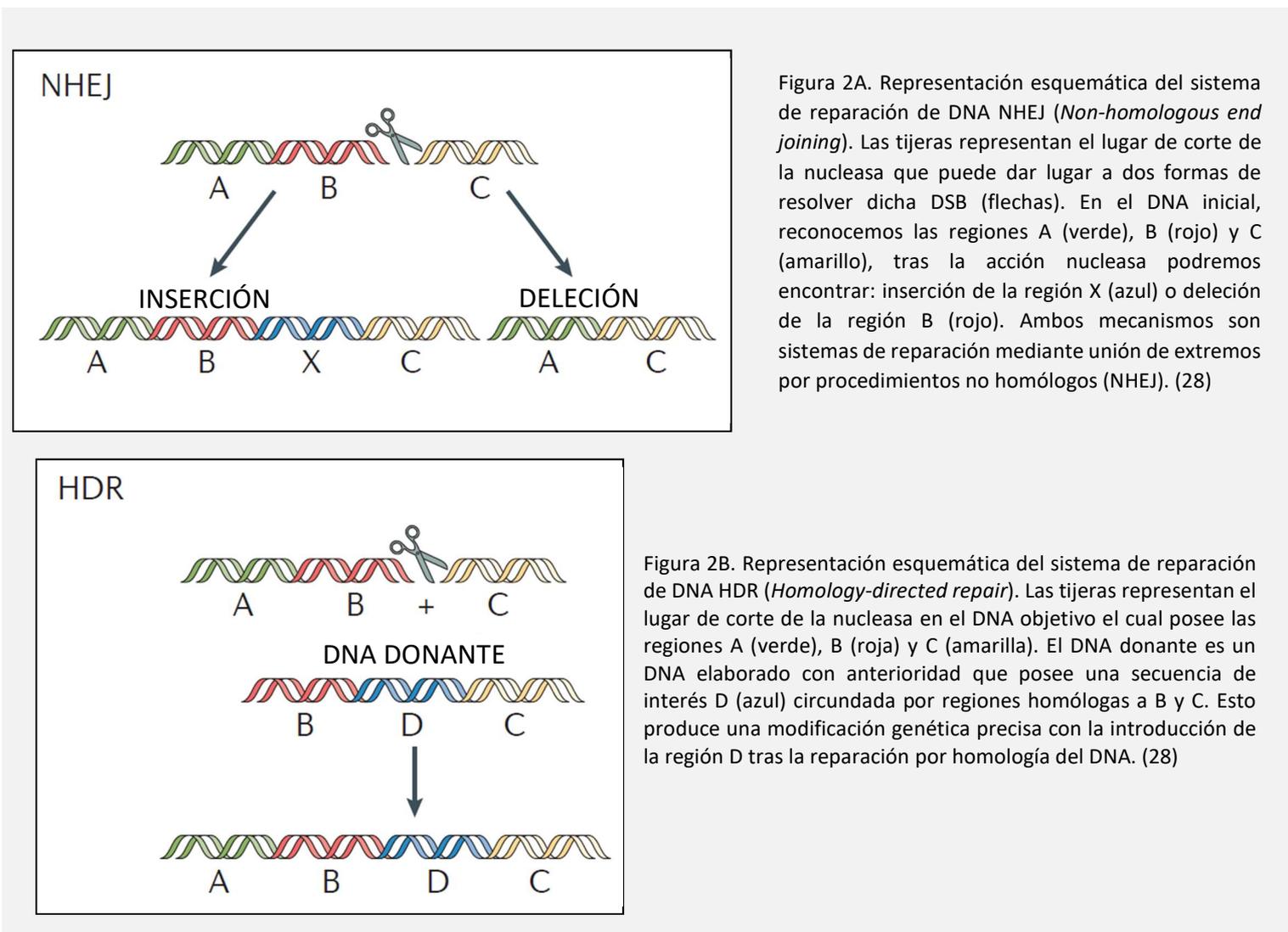


Figura 2A. Representación esquemática del sistema de reparación de DNA NHEJ (*Non-homologous end joining*). Las tijeras representan el lugar de corte de la nucleasa que puede dar lugar a dos formas de resolver dicha DSB (flechas). En el DNA inicial, reconocemos las regiones A (verde), B (rojo) y C (amarillo), tras la acción nucleasa podremos encontrar: inserción de la región X (azul) o deleción de la región B (rojo). Ambos mecanismos son sistemas de reparación mediante unión de extremos por procedimientos no homólogos (NHEJ). (28)

Figura 2B. Representación esquemática del sistema de reparación de DNA HDR (*Homology-directed repair*). Las tijeras representan el lugar de corte de la nucleasa en el DNA objetivo el cual posee las regiones A (verde), B (roja) y C (amarilla). El DNA donante es un DNA elaborado con anterioridad que posee una secuencia de interés D (azul) circundada por regiones homólogas a B y C. Esto produce una modificación genética precisa con la introducción de la región D tras la reparación por homología del DNA. (28)

Figura 2. Mecanismos de reparación de roturas de doble hebra de DNA (DSBs).

Las nucleasas con dedos de Zinc (ZFNs) (**Figura 3**) fueron las primeras nucleasas específicas de secuencias diseñadas para su aplicación en la edición genética. Las ZFNs consisten en:

- a) Un dominio de reconocimiento de DNA compuesto por dedos de zinc (*Zinc Finger Protein* - ZFP). Un dedo de zinc está típicamente formado por aminoácidos de cisteína e histidina (Cys₂-His₂) relacionados con un ion de zinc. Los aminoácidos de la superficie de la estructura alfa-hélice de la proteína de dedo de zinc (ZFP) contactan con tres pares de bases del DNA diana. Con el paso de su uso, las ZFPs han sido desarrolladas para identificar las 64 posibles combinaciones de tripletes de nucleótidos. (56)
- b) Un dominio no específico correspondiente a la nucleasa Fok1 (nucleasa bacteriana típica del *Flavobacterium okeanokoites*). Dicho dominio es el encargado de generar DSBs.

Cada dedo de zinc reconoce entre 3 y 4 bp de DNA. A pesar de su especificidad, las ZFNs pueden producir fenómenos “*off-target*” (fuera de la región diana) dado que Fok1 puede tener acción nucleasa fuera de la diana. (32) (39) (56)

Las nucleasas tipo activadores de transcripción (TALENs) también se componen de la nucleasa Fok1 (**Figura 4**). Difieren con las ZFNs en que, en este caso, el dominio de unión a DNA es un dominio tipo activador de transcripción (TAL *effector* - TALE) de entre 33 y 35 aminoácidos, originario de bacterias patógenas de plantas del género *Xanthomonas*. Dicha secuencia TALE tiene una región de residuos hipervariables (*Repeat-Variable Di-residues* - RVD) en el 12^o y 13^{er} aminoácido que determinan la especificidad de TALE con respecto a los nucleótidos. En el caso de TALE, son 2 los aminoácidos de la RVD los que interactúan con 1 bp, a diferencia de ZFNs que actuaba con tripletes. Dichas variables de RVD son del tipo NN, NI, HD y NG*; reconociendo Guanina, Adenina, Citosina y Timidina, respectivamente. (39) (56)

Las ZFNs inducen tanto deleciones como inserciones, mientras que las TALENs son más efectivas en la deleción que en la inserción. La especificidad de ambas está determinada en base al número de módulos que posean (ZFPs en las ZFNs y RVDs en las TALENs). (39)

Las nucleasas Cas (**CRISPR-associated**) difieren de ZFNs y TALENs en que su homología de secuencia no se basa en proteínas, sino en el apareamiento Watson y Crick (16), que es una unión muy estable. CRISPR-Cas es un sistema que usa, generalmente, una molécula de RNA para actuar como guía de la nucleasa hacia su diana (*RNA guided endonuclease* - RGEN (39)) (28). Esto significa que para abordar una secuencia específica no es necesario rediseñar la nucleasa, basta con añadir el RNA guía apropiado (**Figura 5**). Además, las nucleasas Cas son nucleasas de origen natural que, a diferencia de Fok1, no están circunscritas a un solo género celular, sino que han sido identificadas en un altísimo porcentaje de procariotas (tanto bacterias como arqueas) (15) (31). El funcionamiento preciso del sistema CRISPR-Cas será elaborado más adelante (Ver apartado 5.4).

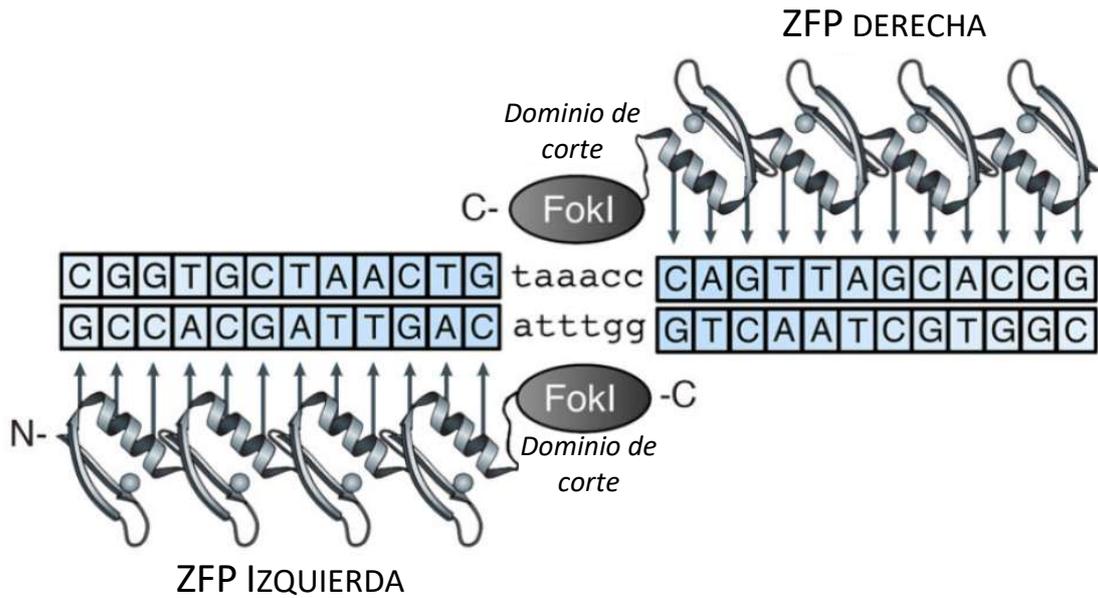


Figura 3. Representación esquemática de un dímero de nucleasas con dedos de zinc en unión a DNA. *Dominio de corte*: lugar de corte de la nucleasa Fok1. *ZFP*: Proteína con dedos de zinc. Podemos ver como cada región alfa hélice interactúa con tres nucleótidos de la cadena (Flechas). Los círculos entre la lámina beta y la alfa hélice en las ZFPs son los iones de zinc. (56) (39)

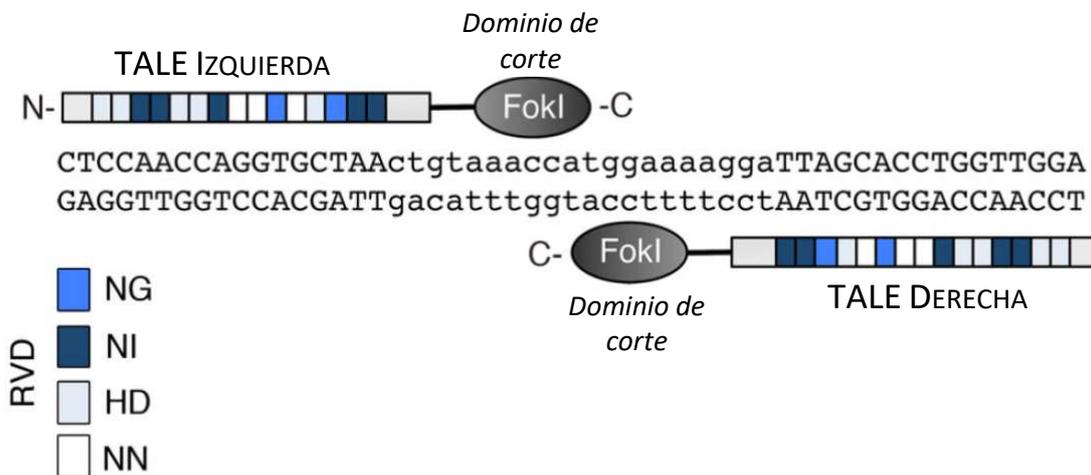


Figura 4. Representación esquemática de un dímero de TALENs en unión a DNA. *Dominio de corte*: lugar de corte de la nucleasa Fok1. RVD: 2 aminoácidos hipervariables. D: Aspartato. H: Histidina. I: Isoleucina. G: Glicina. N: Asparagina. Cada RVD contacta con un solo nucleótido de la cadena de DNA. (56) (39)

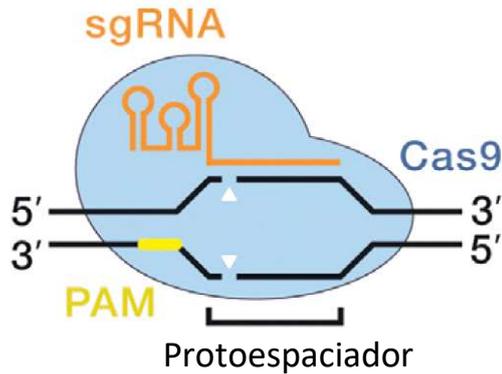


Figura 5. Representación esquemática de Cas9 cortando una doble hebra de DNA. Cas9 realiza DSBs a través de un sgRNA que reconoce una secuencia del DNA diana (protoespaciador) sirviéndose de una secuencia PAM que reconoce en el extremo 3' del protoespaciador. Desarrollado en detalle en el apartado "Mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas". Adaptado de Komor et al. (43)

En general, ZFNs tienen menos eficacia y porcentajes de éxito en cuanto a la sitio-especificidad de su actividad nucleasa a la hora de inducir DSBs. En cambio, TALENs y el sistema CRISPR-Cas tienen en torno a un 80-90% de éxito en su sitio-especificidad en células de mamíferos. Esto significa que los DSBs específicos en regiones asociadas a enfermedades pueden ser más fácilmente abordados, y con mayor porcentaje de éxito, usando TALENs o sistemas CRISPR-Cas. Además, los porcentajes de mutación post-DSB han sido referidos como muy superiores en TALENs y CRISPR-Cas frente a las ZFNs. (28)

5. CRISPR-CAS: UN SISTEMA DE INMUNIDAD ADQUIRIDA PROCARIOTA

5.1. Introducción a los mecanismos de defensa procariota

El dominio procariota engloba tanto a bacterias como arqueas. Son organismos unicelulares cuya característica cardinal consiste en la ausencia de núcleo celular en el que almacenar la información genética. En los procariotas el material genético se encuentra libre en el citoplasma. Dicho material genético está constituido en la mayoría de los casos por un solo cromosoma (una molécula de gran tamaño constituida por una doble cadena de DNA) que contiene la información genética que codifica para elementos de la supervivencia celular y el correcto funcionamiento de todo el conjunto del microorganismo.

Los virus que infectan procariotas (bacteriófagos) son la forma de vida más abundante. Cuando se habla de virus se tiende a pensar en aquellos que dan lugar a patología en animales, no obstante, hay aproximadamente 10^{31} virus que no atacan a organismos pluricelulares de gran tamaño, sino que se propagan entre organismos microscópicos (57). La invasión de un procariota por una partícula vírica puede tener consecuencias nefastas, ya que normalmente provoca la muerte del organismo. Se estima que los bacteriófagos consiguen infectar y eliminar hasta un 40% de los organismos procariotas de los océanos cada día (58) (59) (60). La infección vírica se postula como un control poblacional procariota. (61) (62)

El proceso infeccioso se inicia tras la unión del virus a un componente de la envoltura celular que va seguida de la introducción de su material genético en el citoplasma procariota. El virus, generalmente, se replica utilizando la maquinaria enzimática y los componentes de la célula invadida. Dicha replicación masiva altera la actividad de la célula. Tras haber finalizado la replicación, se generan nuevas partículas víricas completas que finalmente se liberan, por regla general, mediante un proceso denominado lisis, que provoca la destrucción de la célula por rotura de su envoltura. (31)

Con anterioridad al reciente descubrimiento del sistema CRISPR-Cas –paradigma de la respuesta adaptativa inmune bacteriana–, se conocían varios mecanismos innatos de defensa antivírica. La prevención de la unión del bacteriófago a la célula mediante la modificación de las proteínas de membrana que actúan como receptores, o la secreción de polisacáridos que limitan el acceso del virus son dos mecanismos de los que disponen los procariotas. Un sistema bien conocido, que sucede en el medio intracelular, es el sistema de restricción-modificación. La restricción-modificación (RM) se basa en la intervención de una endonucleasa que corta la molécula de DNA vírico en una secuencia determinada de unos pocos pares de bases. Para evitar que la bacteria ataque su propio DNA en este proceso, una metilasa modifica el propio DNA, evitando la degradación de la secuencia del genoma bacteriano. De esta manera, cuando un virus de DNA infecta a un procariota, las endonucleasas podrían degradarlo y abortar la infección (57). Estos sistemas innatos no son perfectos, y los virus son capaces de modificar su material genético para escapar del mecanismo de reconocimiento RM. (31)

5.2. Descubrimiento del sistema CRISPR-Cas

El descubrimiento de CRISPR-Cas nace del estudio exhaustivo del genoma procariota, iniciado por laboratorios especializados en el campo de la genética y la microbiología (Figura 6).

En 1987, Atsuo Nakata y su equipo de la Universidad de Osaka secuenciaron el gen *iap* de la bacteria *Escherichia coli* encontrando secuencias repetitivas separadas de forma regular. Concretamente, una secuencia de 29 pares de bases se repetía varias veces en una misma orientación. Además, dichas secuencias repetitivas se encontraban espaciadas por pequeñas secuencias de en torno a 7 pares de bases de carácter palindrómico. Ya se conocían desde años atrás las secuencias palindrómicas, pero en la literatura nunca había habido referencias acerca de un espaciamiento tan regular. Dejaron constancia de este hecho en su artículo y no hicieron valoraciones profundas acerca del descubrimiento. El equipo de Nakata planteó su posible implicación en la regulación de genes de las inyecciones. Se considera la primera referencia en la literatura a este sistema, aunque fuese de forma involuntaria. (19)

A principios de los 90, Jan D. A. van Embden y su equipo, del Instituto Nacional de Salud Pública y Protección Ambiental de Holanda, analizaron al organismo causante de la tuberculosis: el *Mycobacterium tuberculosis*. En su estudio, hallaron una agrupación de repeticiones directas de 36 pares de bases separadas por espaciadores de entre 35 y 41 pares de bases. Verificaron la presencia de estas repeticiones en diferentes especies de

la misma bacteria. Además, se cercioraron de que existía gran diversidad tanto en el tamaño de la región de las repeticiones como en la secuencia de los espaciadores. Esto sucedía tanto entre especies como en aislados microbianos puros de la misma especie (variabilidad inter-especie). El equipo holandés coincidió con la propuesta del equipo de Corea en el posible papel de estas secuencias en la regulación génica. (63)

En 1993, Francisco J. M. Mojica, del Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología de la Universidad de Alicante, se encontraba trabajando en una tesis doctoral supervisada por Francisco Rodríguez Valera. Ambos trabajaban sobre una arquea halófila extrema (organismo que vive en ambientes con presencia de gran cantidad de sales): *Haloferax mediterranei*. El objetivo inicial de la tesis era identificar mecanismos moleculares que permitían tal capacidad de adaptación a los ambientes de salinidad variante. De modo fortuito, como la mayoría de trabajos a los que hemos hecho referencia anteriormente, al secuenciar el genoma de *H.mediterranei*, encontraron repeticiones (de entre 30-34 pares de bases) espaciadas por secuencias únicas de entre 35-39 pares de bases, en la vecindad de las secuencias objetivo de la tesis. Dichas secuencias eran palindrómicas con una descripción equivalente a la hecha por Embden y Nakata. (15) (31)

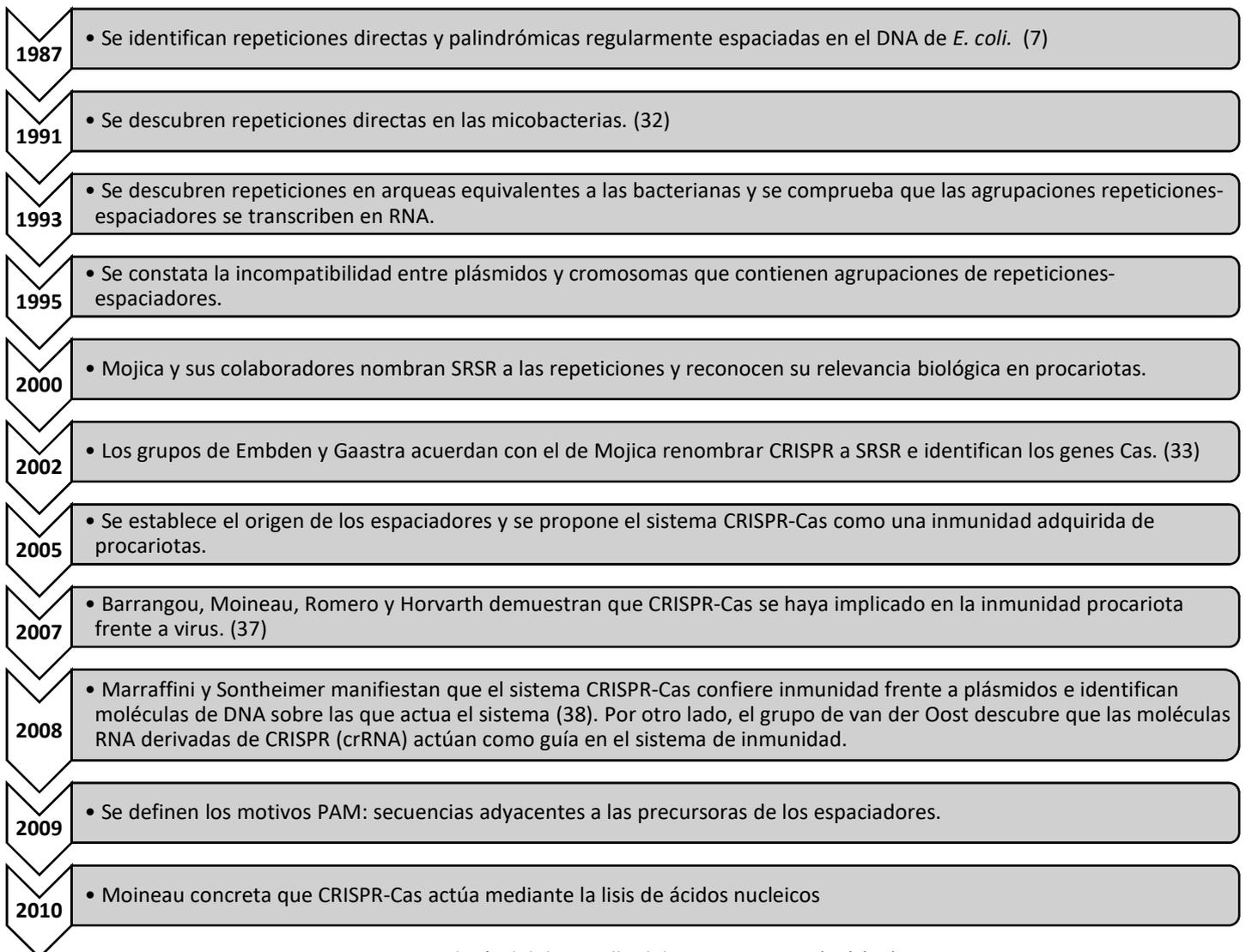


Figura 6. Cronología del desarrollo del campo CRISPR. (31) (18)

Debido a que estas secuencias estaban siendo encontradas tanto en bacterias como arqueas, la hipótesis de la regulación genética perdía fuerza dado que, pese a pertenecer a un mismo dominio, los procariotas entre sí tienen una grandísima variabilidad. Por lo que la función no debía de tener nada que ver con la adaptación al ambiente propuesta por Mojica o la regulación genética, sino con una secuencia filogenéticamente conservada entre procariotas que había evolucionado de forma independiente miles de millones de años. Trabajando en nuevas hipótesis, el equipo de Mojica vio que dichas secuencias, a pesar de estar en regiones no codificantes, se transcribían a RNAs de pequeño tamaño. Dicho patrón se repitió durante el estudio de *H.volcanii*.

Hacia finales de los 90 se identificaron 8 genomas de arqueas y bacterias con regiones similares a las descritas en cuanto a características tamaño y organización. El análisis comparativo de dichas regiones permitió definir las en primer momento como SRSR (*Short Regularly Spaced Repeats* –Repeticiones cortas regularmente espaciadas–). En segunda instancia pasarían a ser llamadas SPIDR (*Spacer Interspersed Direct Repeats* – Repeticiones directas intercaladas por espaciadores–) por Embden y Schouls. (64)

Finalmente, en 2002, tanto el equipo holandés como el español acordaron llamar a estas secuencias CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* - Repeticiones palindrómicas cortas regularmente espaciadas y agrupadas). En dicho artículo se identificaban también cuatro familias de genes Cas (*CRISPR-associated* – genes asociados a CRISPR) seguidos de un número del 1 al 4. (15) (17) (31) (51)

El término CRISPR es muy acertado dado que es un término único y exclusivo de esta rama de investigación y permitía un mejor seguimiento de la futura bibliografía científica (Tabla 4). (18)

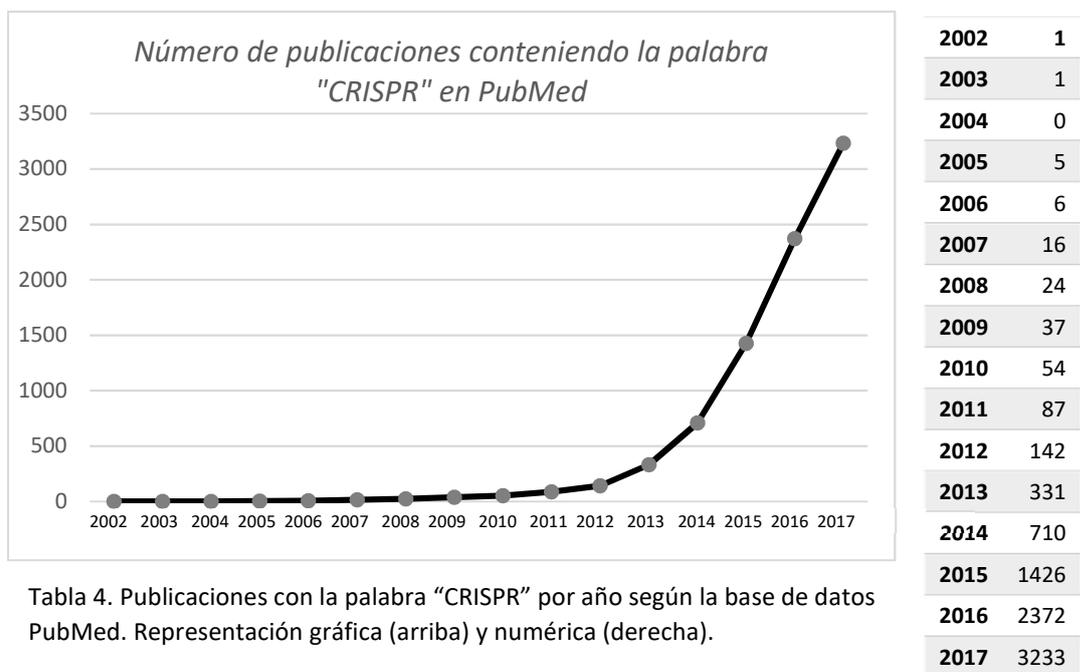


Tabla 4. Publicaciones con la palabra “CRISPR” por año según la base de datos PubMed. Representación gráfica (arriba) y numérica (derecha).

Los genes Cas estaban localizados justo en la vecindad de las secuencias CRISPR. Karen E. Nelson, del Instituto de Investigación Genómica de Estados Unidos, describiría en 2005 hasta 45 familias de proteínas Cas y esto definiría varios subtipos más de los sistemas CRISPR-Cas (65). No obstante, la función de todos estos sistemas seguía siendo un misterio. Básicamente, se conocía que existían unas secuencias repetitivas de entorno a 23-55 pares de bases que flanqueaban unas secuencias de gran variabilidad (espaciadores) de entre 21 y 72 pares de bases, y que en la vecindad de dicho conglomerado había genes asociados (Cas). (18)

En 2003, Mojica y su grupo constataron en procariontes muy dispares que algunos espaciadores de CRISPR tenían origen exógeno: fundamentalmente procedían de ciertos virus y en menor porcentaje de plásmidos. Según la bibliografía consultada por el grupo, los virus y plásmidos tenían en su material genético secuencias que concordaban con los espaciadores (protoespaciadores). Entonces se elaboró la hipótesis de que dichos espaciadores tenían su origen en protoespaciadores virales o de plásmidos. Eran idénticos a los descritos en procariontes y, además, resultaban ineficaces a la hora de infectar a hospedadores poseedores del espaciador correspondiente en la región CRISPR. Existía una incompatibilidad protoespaciador-espaciador al coincidir en una misma célula. (15) (31)

Se llegó a la conclusión de que CRISPR junto con Cas probablemente formaban parte de un sistema de inmunidad adquirida y heredable procarionte. La hipótesis propuesta enunciaba que los espaciadores eran elementos adquiridos previamente a partir de los elementos genéticos transmisibles de virus o plásmidos (protoespaciadores) durante su paso por la célula. La coexistencia de ambos en la célula generaba una interferencia específica de secuencia, evitando la futura propagación de los propios virus o plásmidos. Era una especie de “vacunación genética” transmitida a la descendencia. A partir de este momento, comienza una década explosiva en la que el conocimiento sobre el funcionamiento del sistema CRISPR iba perfilándose de forma precisa.

En el año 2007 hubo una publicación reveladora en la revista *Science*. En ella colaboraban: Rodolphe Barrangou, de la Universidad Estatal de Carolina del Norte; Sylvain Moineau, de la universidad de Laval; y Dennis A. Romero y Philippe Horvarth, ambos de la compañía danesa DuPont Nutrition & Health (Danisco). Supuso el trabajo definitivo que demostró que, al menos, algunas de las proteínas Cas estaban funcionalmente asociadas con CRISPR, y que ambos elementos conferían protección frente a virus a la bacteria *Streptococcus thermophilus*. *S.thermophilus* se tornaba resistente a la infección por virus bacteriófagos si poseía espaciadores con secuencias que correspondían al genoma del virus. (66)

Este mismo mecanismo fue ratificado en 2008 por el equipo de Luciano Marraffini y Erik Sontheimer, quienes comprobaron que la resistencia a la transferencia de plásmidos de un aislado de *Staphylococcus epidermidis* tenía que ver con la interferencia de las regiones CRISPR (67). También en 2008, un grupo liderado por John van der Oost, de la Universidad de Wageningen (Países Bajos), evidenció que unas moléculas de RNA generadas a partir de las regiones CRISPR (crRNA) de *E. coli* actuaban como guías para reconocer las moléculas invasoras. (31)

Dos años después, el grupo de Moineau observó que las secuencias objetivo del elemento invasor sufrían cortes muy precisos. Dicho corte sucedía a una distancia fija de un motivo de secuencia conservada, yuxtapuesto a los protoespaciadores. Esta región, de secuencia y tamaño conservado (de 2 a 5 nucleótidos) conformaba lo que el grupo de Mojica designó “motivo adyacente al protoespaciador” (PAM -*Protospacer Adjacent Motifs*-). Los PAM eran muy variables entre sistemas CRISPR-Cas, incluso entre aquellos pertenecientes al mismo tipo (68), pero tenían una implicación importante en la diferenciación entre secuencias endógenas y elementos exógenos. (69)

En los últimos años, el campo de investigación de los sistemas CRISPR-Cas ha permitido crear diferentes clasificaciones y facilitar la comprensión de sus mecanismos de acción. Se afirma de buena fe que el sistema CRISPR-Cas es un sistema de inmunidad adquirida procariota (bacteriana y arquea) con memoria y herencia Lamarckiana (con herencia de los caracteres adquiridos). A continuación, describiremos las diferentes clasificaciones de los sistemas CRISPR-Cas, así como una aproximación a su acción nativa.

5.3. Clasificación de los sistemas CRISPR-Cas

Hoy en día, el sistema CRISPR ha sido detectado en torno a un 90% de los genomas arquea y un 50% de los genomas bacterianos secuenciados (18) (57) (70). Sin embargo, no todos los sistemas CRISPR son iguales, poseen una elevada diversidad que parece ser debida a una diversificación de los mecanismos de defensa procariota en respuesta a componentes evasores por parte de bacteriófagos.

La clasificación actual de los sistemas CRISPR tiene en cuenta los genes Cas específicos de cada subtipo CRISPR-Cas, la similitud de secuencia entre las proteínas Cas, la filogenia de Cas1 (la proteína Cas mejor conservada), la organización de los genes en los loci CRISPR-Cas y la propia estructura de CRISPR-Cas. La combinación de todos estos aspectos genera dos grandes clases: Clase 1 y Clase 2 (71). Como característica común, los sistemas CRISPR-Cas poseen las proteínas Cas1 y Cas2, de vital importancia en la adquisición de espaciadores (57). A su vez, se diferencian 3 tipos dentro de cada clase anotados con números romanos (I, II, III, IV, V y VI). Finalmente, dentro de cada tipo, tanto en la Clase 1 como en la 2, hay varios subtipos organizados por letras (ej. I-A, I-B, I-C, I-U, I-D... etc.) que poseen pequeñas variaciones entre sí y se atribuyen a especies concretas. Por ejemplo: el subtipo III-A es el sistema CRISPR-Cas del *S.epidermidis*, que interfiere en la conjugación de plásmidos, descrito por Marrafini y Sontheimer y el subtipo II-A corresponde al *S.thermophilus* del estudio de Barrangou et al.

Las clasificaciones de los sistemas CRISPR-Cas están en constante evolución y reorganización con descubrimientos cada vez más complejos sobre sus componentes y funcionamiento. Para entender mejor el funcionamiento del sistema CRISPR-Cas, tenemos que introducir cierta nomenclatura para facilitar la comprensión (**Tabla 5**).

Concepto	Definición
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> (En español: Repeticiones palindrómicas cortas regularmente espaciadas y agrupadas). Sistema de inmunidad adquirida procariota (bacteriano y arquea) basado en la adquisición de espaciadores para la defensa frente a material genético extracelular (bacteriófagos o plásmidos). Su estructura consiste en repeticiones palindrómicas (de 23 a 55 pares de bases) que se encuentran separadas por espaciadores (de 21 a 72 pares de bases).
Locus de CRISPR	El locus de CRISPR o loci de CRISPR comprende la región cromosómica correspondiente al CRISPR <i>array</i> , la secuencia guía (<i>leader</i>) y los genes Cas.
CRISPR <i>array</i>	Región genética procariota correspondiente a los complejos repeticiones-espaciadores que se encuentran dentro del loci de CRISPR.
Espaciadores	Secuencias de origen exógeno presentes entre las repeticiones de la región CRISPR. Varían entre 21 y 72 pares de bases de longitud, siendo la mayoría de entre 30-40 pares de bases.
Pre-crRNA	Los loci de CRISPR se transcriben en largos fragmentos de RNA que después deben ser procesados en forma de crRNA para interactuar con la molécula diana
crRNA	RNA CRISPR. Posterior al procesamiento del pre-crRNA, se obtienen moléculas de RNA de un espaciador concreto que genera homología con su protoespaciador correspondiente.
Pre-espaciador	Secuencia correspondiente a un fragmento de material genético exógeno tributario a convertirse en espaciador durante una primera exposición.
Protoespaciador	Material genético diana complementario al espaciador del crRNA. De origen exógeno.
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motifs</i> (Motivo adyacente al protoespaciador). Secuencia de entre 2 a 5 nucleótidos inmediatamente adyacente al protoespaciador. Es condición <i>sine qua non</i> para la actividad nucleasa en algunos tipos de CRISPR. Se considera un sistema de discriminación con el fin de evitar la respuesta autoinmune frente a los espaciadores.
tracr-RNA	<i>Trans-activating CRISPR RNA</i> (RNA trans activador de CRISPR). Pequeña molécula de RNA necesaria en algunos sistemas CRISPR que interactúa con el crRNA. Suele ser complementaria a las repeticiones de las regiones del loci de CRISPR.
sgRNA	<i>Single guide RNA</i> (RNA de guía única). RNA elaborado a partir de la fusión de un tracr-RNA y un crRNA.
Genes Cas	<i>CRISPR associated genes</i> . Genes situados en la vecindad de las secuencias CRISPR que transcriben para numerosas proteínas de igual nomenclatura implicadas en los fenómenos de inmunidad (adaptación), expresión y procesamiento e interferencia.

Tabla 5. Nomenclatura y definiciones en el sistema CRISPR

5.3.1. CRISPR-Cas Clase 1

Los sistemas CRISPR-Cas Clase 1 son los más abundantes (90%) del total de loci de CRISPR-Cas identificados en arqueas y bacterias. Se caracterizan en poseer módulos efectores consistentes en múltiples subunidades (**Figura 7A**). Los sistemas Clase 1 tiene como diana tanto DNA como RNA (72). Son más complejos que los sistemas de Clase 2, dado que intervienen un mayor número de proteínas en ellos.

Dentro de la Clase 1 tenemos los tipos I, III y IV que a su vez se dividen en subtipos (en torno a 12, con algunas variantes) (71). El sistema tipo I es el más común y extendido. El sistema tipo III es más común en arqueas y el sistema tipo IV es rudimentario y menos conocido.

Los módulos efectores de los sistemas CRISPR-Cas Clase 1 están formados por varias proteínas. Para el tipo I, la maquinaria proteica se conoce por el nombre de Cascade (*CRISPR-associated complex for antiviral defense* –Complejo asociado a CRISPR para la defensa antiviral–) (16) (73) (74) y para el tipo III como RAMP (*Repair Associated Mysterious Proteins* –Proteínas misteriosas asociadas a reparación–) (71) (75), aunque esta nomenclatura en los sistema tipo III se está abandonando. (69)

La maquinaria Cascade es un complejo efector formado por varias proteínas Cas; cabe destacar entre ellas: Cas5, Cas6, Cas7, Cas8 y Cas11 (69). Cas3 es la piedra angular de la acción nucleasa en los sistemas tipo I (69) (71). El reconocimiento de la secuencia PAM del DNA invasor por parte del complejo efector, recluta a Cas3 (una helicasa-nucleasa) (57) (72) cuyo dominio HD es responsable de la rotura del DNA invasor (72). Cas6 posee un dominio de reconocimiento de RNA y actúa como ribonucleasa (RNasa) en el procesamiento final del pre-crRNA para dar lugar a cr-RNAs. (57) (71)

El sistema CRISPR-Cas tipo I requiere de la presencia de una secuencia PAM en la molécula diana (DNA) para ejercer su función inmune. La secuencia PAM permite hacer una distinción entre el espaciador propio del procarionota y el DNA invasor viral complementario al espaciador. Una distinción interesante dentro de la Clase 1 de CRISPR-Cas, es que el tipo III no necesita de secuencia PAM para ejercer su acción nucleasa. (69)

5.3.2. CRISPR-Cas Clase 2

La diferencia más radical de los sistemas CRISPR-Cas Clase 2, es que constan de módulos efectores únicos, grandes y con varios dominios. Las proteínas efectoras de los sistemas Clase 2 más conocidas son Cas9 y Cpf1 (ahora designada Cas12a (69)), las cuales han sido utilizadas de forma exitosa en ingeniería genética (76). Es un sistema efector mucho más simple que se caracteriza generalmente por poseer nucleasas tipo RuvC (llamadas así por su homología a nucleasas conocidas).

De la misma forma que en la Clase 1, la Clase 2 subclasifica en tres tipos: II, V y VI. Sus loci son mucho más uniformes que los de la Clase 1. El tipo más reconocido de la Clase 2 es el tipo II, que posee como nucleasa efectora la proteína Cas 9. El tipo V contiene, entre otros, la proteína Cpf1 (también denominada Cas12a), una nucleasa guiada por RNA que no requiere de material adicional (tracrRNA) para su activación.

El tipo II es el que más interés ha suscitado en investigación debido a la multifuncionalidad de la proteína efectora Cas9. Al igual que en los sistemas CRISPR-Cas tipo I, aquí también es necesaria la presencia de secuencia PAM para el reconocimiento inmune (57) (76). Cas9 reconoce secuencias PAM en su extremo 3' ricas en Guanina y Citosina (ver apartado "*Ortólogos de nucleasas Cas*"). En cuanto al procesamiento de pre-crRNA, en los sistemas tipo II, está catalizado por una enzima ubicua codificada fuera de locus de CRISPR-Cas: una RNasa III (71). Para ejercer el corte de cadena, el tipo II (y

el subtipo V-B) requieren de un RNA trans-activador de CRISPR (tracr-RNA –*Trans-activating CRISPR RNA*–) (16) (57) (76). El tracr-RNA es una estructura secundaria que se asocia a Cas9 y es complementaria a las repeticiones de la región CRISPR. (57)

El avance sobre el conocimiento de la estructura de las nucleasas de los sistemas tipo II ha sido espectacular (**Figura 7B y 8**). En la actualidad se sabe que la proteína efectora Cas9 posee dos “lóbulos” o regiones: una de reconocimiento (REC lobe –*Recognition lobe*–) y otra de actividad nucleasa (NUC lobe –*Nuclease lobe*–) (16) (71). Dentro del NUC lobe, se distinguen una región HNH y una RuvC. El dominio RuvC de la nucleasa Cas9 posee una estructura RNasa H (Ribonucleasa H) (71). Al dominio RuvC, a su vez, se le reconocen tres regiones RuvC I, RuvC II y RuvC III. RuvC II y III se encuentran flanqueando al dominio HNH y RuvC I se encuentra en la región N-terminal de Cas9 (16). Un puente de estructura helicoidal (bridge helix), rico en Arginina, conecta el REC lobe con el heteroduplex formado por el RNA que contiene el espaciador y su DNA diana (16). Otros estudios también lo han relacionado con la interacción con el tracr-RNA. (76)

El dominio HNH corta la cadena de DNA complementaria al crRNA y el dominio RuvC corta la otra hebra de DNA, de forma casi simultánea (20). A nivel experimental, el crRNA y tracrRNA pueden ser combinados de forma artificial en el laboratorio dando lugar a un RNA de guía única (sgRNA –*single guide RNA*–). (16)

Los sistemas CRISPR-Cas tipo V son reconocidos por su proteína Cpf1 (en estudios más actuales es llamada de forma indistinta como Cas12a y compone una subfamilia de proteínas dentro del tipo V conocidas como Cas12), concretamente los sistemas V-A (71). Una distinción especial que posee Cpf1 es que no requiere tracr-RNA para iniciar el corte de cadena (**Figura 7C**). Al igual que el tipo II, el DNA de doble cadena (dsDNA - *double strain DNA*-) es la diana del sistema. Existe también un dominio RuvC que de nuevo está flanqueado por otro dominio, al cual no se ha atribuido una arquitectura tipo HNH, sino que aún se desconoce (71). La secuencia PAM, al contrario que los sistemas tipo II, es identificada en su extremo 5' en una región rica en Adenina y Timina (ver apartado “*Ortólogos de nucleasas Cas*”). El corte de cadena realizado por Cpf1 se produce de forma escalonada. (69)

Por último, los sistemas tipo VI tiene como diana RNA de cadena simple (ssRNA), aunque se ha demostrado su afinidad por DNA en algunos estudios. Sus efectores (Cas13) poseen dos dominios HEPN. Recientemente, los sistemas tipo VI han relacionado la inmunidad mediada por CRISPR con la muerte celular programada. (71)

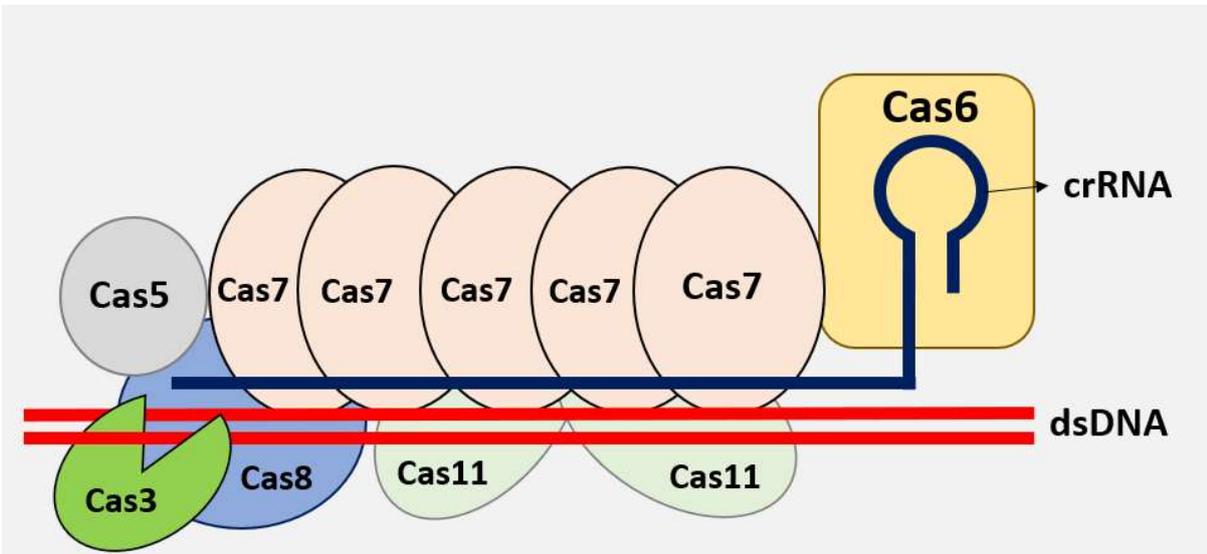


Figura 7A. CRISPR-Cas Clase 1, tipo I. Complejo Cascade: son complejos multiproteicos formados por varias subunidades de Cas7 y Cas11. Cas5 y Cas8 componen la “cola” del sistema. Cas6 queda unida al crRNA (azul oscuro) tras su procesamiento. Tras el reconocimiento del dsDNA diana (rojo) por parte del crDNA, Cas3 (verde), la nucleasa del sistema, ejerce el corte. Modificado de Hille et al. (69)

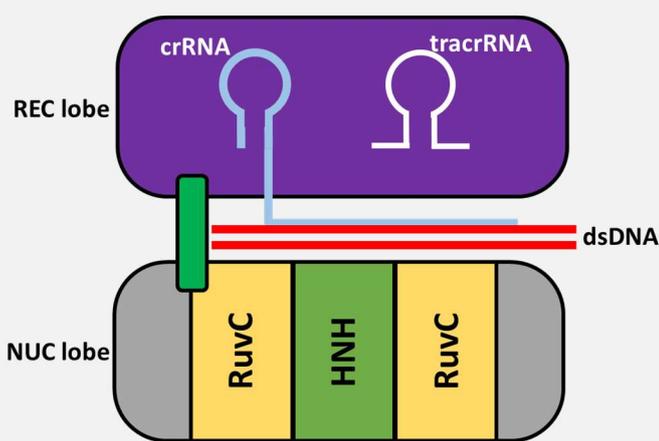


Figura 7B. CRISPR-Cas Clase 2, tipo II. Proteína Cas9. Vemos como el sistema Cas9 requiere de un tracrRNA (blanco). El crRNA (azul) se une a su diana complementaria (dsDNA en rojo). Los dominios RuvC y HNH ejercen la acción nucleasa.

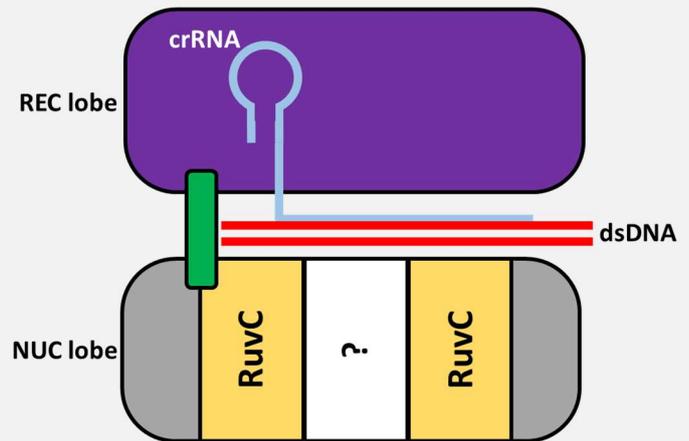


Figura 7C. CRISPR-Cas Clase 2, tipo V. Proteína Cpf1 (Cas12a). Se requiere de la sola presencia de crRNA (azul) para la unión a su diana (dsDNA en rojo). Los dominios RuvC y un dominio nucleasa de tipo desconocido ejercen la acción nucleasa.

REC lobe: dominio de reconocimiento (morado). *NUC lobe*: dominio nucleasa. crRNA: CRISPR RNA (azul). tracrRNA: *Trans-activating CRISPR RNA* (blanco). dsDNA: DNA de doble cadena. El rectángulo verde que une el REC lobe con el NUC lobe en ambas figuras es el *bridge hélix*. Ambas figuras modificadas de Hsu et al. (16)

Figura 7. Representación esquemática de algunos de los módulos efectores de los sistemas CRISPR-Cas

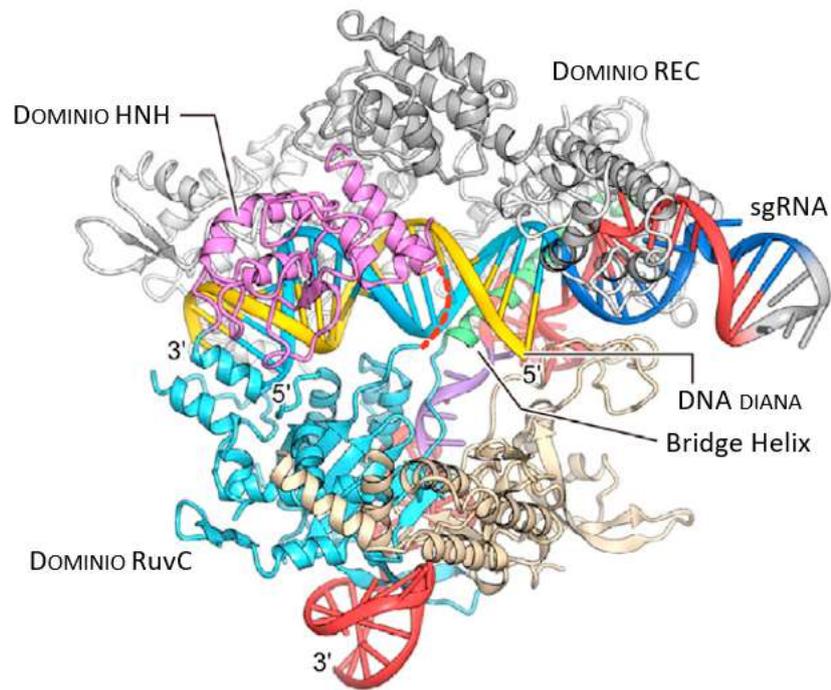


Figura 8. Estructura 3D de Cas9 del *Streptococcus Pyogenes* (SpCas9). Tomada de Nishimasu et al. (77)

5.4. Mecanismo de acción de CRISPR-Cas

El sistema CRISPR-Cas requiere de varios pasos para ejercer su inmunidad. El mecanismo de acción se basa en las proteínas que conforman los sistemas que, como hemos visto, son muy variables. Las fases del mecanismo de acción (esquematisadas en la **Figura 9**) se pueden resumir en:

1. Adaptación: Sucede cuando un elemento genético móvil –un virus o un plásmido– ataca por primera vez a un procarionta. Un complejo de proteínas Cas transfiere un fragmento (protoespaciador) del ácido nucleico vírico a un extremo de la agrupación CRISPR. En este proceso implica la duplicación de la repetición adyacente, generando un nuevo espaciador. (31)
2. Expresión: Supone la transcripción íntegra del *array* de CRISPR dando lugar a un RNA precursor (pre-crRNA) (74). Dicho pre-crRNA es procesado en moléculas de RNA derivadas de CRISPR (crRNA) constituidas por la secuencia de un solo espaciador y fragmentos de las repeticiones adyacentes (las repeticiones de CRISPR), las cuales se unen a otras proteínas Cas para formar complejos efectores.
3. Interferencia: En una exposición futura, un complejo efector se une, a través del espaciador, a una secuencia complementaria diana; ello provoca que la proteína Cas asociada corte el ácido nucleico del virus, frenando la proliferación. (31)

Las proteínas Cas1 y Cas2 han demostrado ser las principales proteínas implicadas en la adquisición de espaciadores en todos los sistemas CRISPR-Cas. (57) (70) (74) (78)

Además, dichas proteínas están conservadas filogenéticamente. Los mecanismos concretos de adquisición de espaciadores son complejos y de reciente descubrimiento. El complejo Cas1-Cas2 está formado por un dímero central de Cas2 circundado por dos dímeros de Cas1 (complejo Cas1₄-Cas2₂, de ahora en adelante referido como Cas1-Cas2) (70). Cas1 posee actividad nucleasa, esencial para la obtención de pre-espaciadores. Otras proteínas, como Cas3 y Cas4, intervienen también en los sistemas tipo I para la adaptación (72). Asimismo, la presencia de un PAM en la primera exposición al dsDNA aumenta la afinidad del complejo Cas1-Cas2, pero no es un requisito absoluto (70). En los sistemas tipo III-B, la adquisición de espaciadores originarios de RNA requiere de una transcriptasa inversa unida a Cas1. (72)

Antes de añadir el material genético al *array* de CRISPR se requiere del procesamiento del pre-espaciador. Dicho procesamiento requiere del dominio de reconocimiento de PAM de Cas1, que asegura la integración. Posteriormente, la integración en el *array* de CRISPR es similar a la integración retroviral y también está mediada por el complejo Cas1-Cas2. (57) (70)

Cómo reconoce la célula el material genético extracelular y qué le guía para escoger los pre-espaciadores sigue siendo motivo de estudio. Se han identificado varios métodos, entre ellos el *priming*. Dado que las mutaciones en las regiones PAM pueden causar la evasión al sistema inmune CRISPR-Cas (15) (57) y, en ocasiones, varios espaciadores específicos de una secuencia diana son necesarios para generar inmunidad (70), el *priming* consiste en el reconocimiento de discordancias de secuencia (*mismatches*) en la molécula diana. Por lo que un espaciador existente, con homología a una secuencia diana que ha evadido la respuesta, dirige el reconocimiento. El *priming* desencadena un *feedback* positivo que estimula la adquisición de nuevos espaciadores en puntos que flanquean a la secuencia inicial. (78)

Los sistemas tipo I utilizan el *priming* para ejercer una respuesta inmune rápida en cuanto a la adquisición de espaciadores. El reconocimiento del material genético extraño se facilita mediante espaciadores preexistentes en la inmunidad celular adquirida que generan una unión crRNA-DNA de una cierta estabilidad (70). El cr-RNA efector recluta a la proteína Cas3 (en los sistemas tipo I), cuya actividad helicasa da lugar a la adquisición de un nuevo espaciador distal a la inicial. Además, cuando Cas3 actúa, genera fragmentos que pueden servir de sustrato para la adquisición de espaciadores. (78)

En los sistemas CRISPR-Cas tipo II se ha demostrado que Cas9 y una secuencia tracrRNA, junto al complejo Cas1-Cas2, desempeñan un rol en la adquisición de espaciadores (57) (76) (78). Cas9 posee un dominio sensible a las secuencias PAM y se ha manifestado como una proteína esencial para la adquisición de espaciadores (70) (78). En el tipo II-A se ha demostrado que otras proteínas, como Csn2, son necesarias para la adaptación. (70) (71)

En la fase de expresión, la producción de pre-crRNA y su posterior procesamiento a unidades de cr-RNA ha sido atribuida a muchas nucleasas. Podemos desgranar: Cas6 en los tipos I y III (72), Cas5 en el tipo I-C (72), La RNasa III en el tipo II (76), Cas12 en el tipo V y Cas13 en el tipo VI. (78)

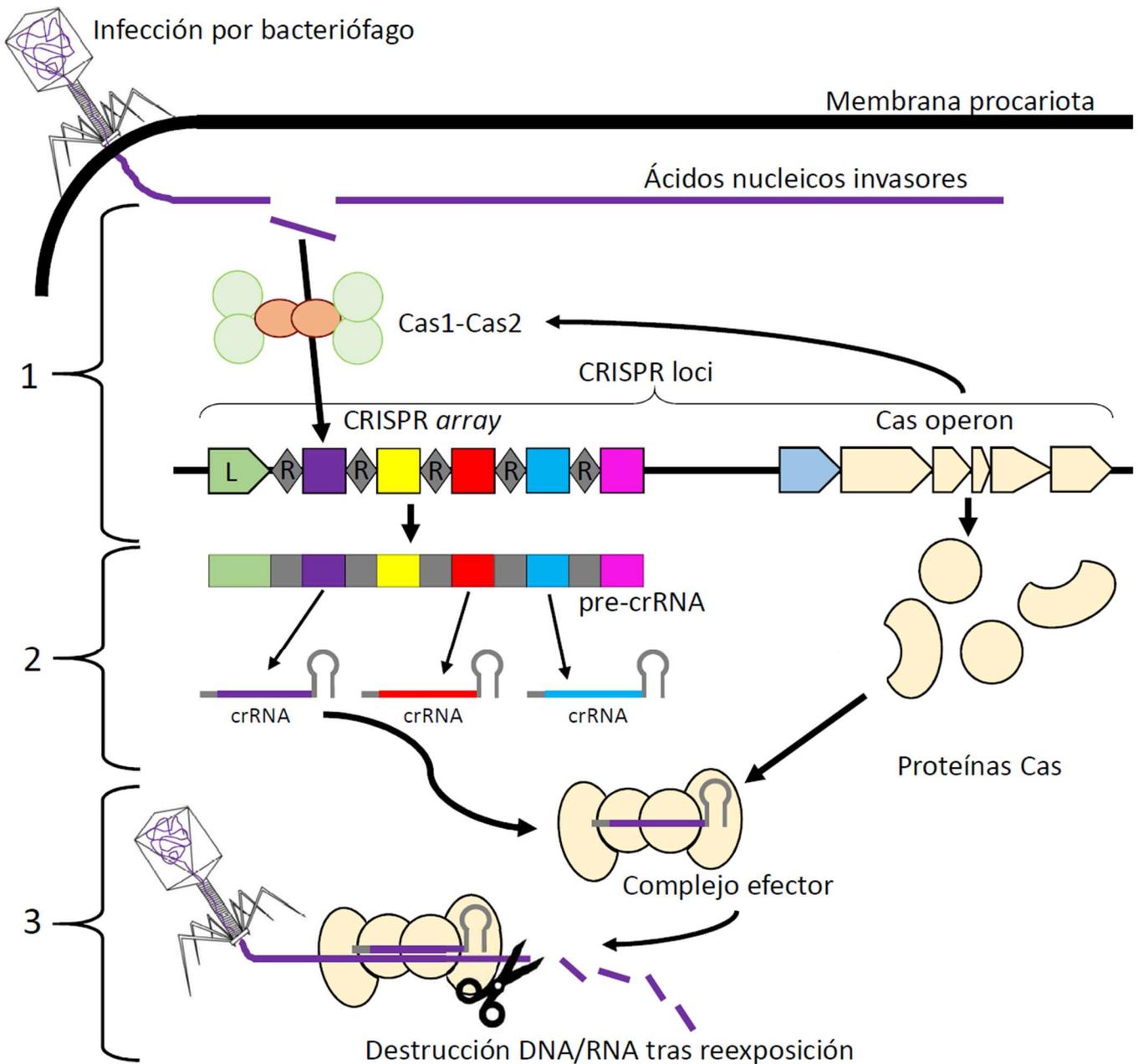


Figura 9. Esquema de los sistemas CRISPR-Cas a través de la infección de un procarionte por un bacteriófago. 1) Adaptación: ante un material genético extraño, el complejo Cas1-Cas2 integra en el CRISPR loci el nuevo espaciador. 2) Expresión: el CRISPR array se transcribe a un pre-crRNA que acto seguido (a través de proteínas Cas no representadas) es procesado a crRNAs complementarios a secuencias de protoespaciadores. 3) Interferencia: El complejo efector formado por proteínas Cas y crRNA (entre otros), en una futura exposición a la secuencia complementaria al espaciador (protoespaciador), corta el DNA o RNA evitando la proliferación vírica. El CRISPR array se encuentra representado con su secuencia guía (líder) como la L en el pentágono verde. Los rombos con R suponen las repeticiones del CRISPR array que separan los espaciadores (cuadrados de colores). Modificada de Jackson et al. (70)

En los sistemas tipo I, la interferencia está mediada por el complejo efector que contiene Cas8, el cual reconoce la diana y recluta a Cas3, que con su acción helicasa-nucleasa degrada la diana (72) (78). En los sistemas tipo II, como explicamos previamente, Cas9 es la proteína más paradigmática y de mayor interés en investigación. Los sistemas tipo III se parecen en sus complejos efectores al tipo I excepto por la proteína Cas10 y su asociación a proteínas como Csm3 o Cmr4 (ambas de la familia de Cas7 –ver apartado “*CRISPR-Cas Clase 1*”–) para cortar RNA de cadena simple (78). En los sistemas tipo V, las proteínas de la familia de Cas12 (entre ellas Cpf1, también llamada Cas12a) ejercen la acción nucleasa (16). Cas13 es la nucleasa de interferencia en los sistemas tipo VI, que tienen por diana RNA (76). El rol de las nucleasas del sistema CRISPR-Cas lo encontramos esquematizado en la **Tabla 6**.

Proteína	Rol	Tipo
Cas1	Adaptación	I, II, III, V, VI
Cas2	Adaptación	I, II, III, V, VI
Cas3	Adaptación/Interferencia	I
Cas4	Adaptación	I, II, V
Cas5	Expresión	I, III, IV
Cas6	Expresión	I, III, IV
Cas7	Interferencia	I, III, IV
Cas8	Interferencia	I, IV
Cas9	Interferencia / Adquisición	II
Cas10	Interferencia	III
Cas12	Expresión / Interferencia	V
Cas13	Expresión / Interferencia	VI

Tabla 6. Nucleasas del sistema CRISPR-Cas, su papel en las fases de inmunidad y tipos donde han sido identificadas. Modificada de Leon et al. (78)

6. VARIANTES DE CRISPR-CAS Y SUS APLICACIONES EN LA EDICIÓN GENÉTICA DE ORGANISMOS SUPERIORES

A pesar de que el sistema CRISPR-Cas llevaba varios años en la literatura científica, hasta 2012 no hubo referencia de sus posibles aplicaciones en edición genética. Fue un estudio del equipo de Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier el que encendió la mecha. Además de desgranar el funcionamiento molecular de Cas9, en sus conclusiones

resaltaron que Cas9 es una endonucleasa que puede ser programada con sgRNA para complementar una secuencia DNA objetivo y cortar el dsDNA (20). Las herramientas que requiere CRISPR-Cas para realizar cambios en los genomas son más accesibles comparadas con sus alternativas hasta la fecha (ZFNs y TALENs). ZFNs y TALENs requieren de un proceso de diseño y producción complejo y específico para cada nueva diana del genoma. Todo este asunto se simplifica gracias a la unión sgRNA:DNA diana a través del apareamiento Watson y Crick que proporciona el sistema CRISPR-Cas.

La accesibilidad del sistema CRISPR-Cas ha hecho que muchos autores hayan definido este fenómeno como la “democratización” de la edición genética (79) (80). Además, los múltiples avances en el campo han permitido obtener diferentes variantes de Cas9, así como de otras nucleasas del sistema. Esta “carrera de armas” de la edición genética ha permitido acuñar el término “*CRISPR craze*” (La locura CRISPR) (81). Cabe destacar que las nucleasas Cas tienen como diana el material genético, no obstante, la edición genética como tal depende de mecanismos intrínsecos celulares (**Figura 2**).

6.1. Ortólogos de Cas

Cas9 no es idéntico entre especies bacterianas, sino que posee diferentes ortólogos. Los ortólogos constituyen genes en diferentes especies que evolucionan de un gen ancestral común. Aunque su función es idéntica, el tamaño molecular, la longitud del protoespaciador y la región PAM difiere entre ortólogos. Por ejemplo, Cas9 del *Streptococcus Pyogenes* (SpCas9), uno de los ortólogos de Cas9 más ampliamente utilizados, posee unos 1368 aminoácidos y reconoce un PAM NGG* en el extremo 3' del protoespaciador (**Figura 10A**). Dicho PAM se repite aproximadamente cada 8-12 pares de bases en el genoma humano (82) (43). La elevada frecuencia de repetición del PAM de SpCas9 no limita en gran medida la edición genética a través de mecanismos HDR o NHEJ; sin embargo, abordajes de alta resolución, como puede ser el reconocimiento de una sola base para su edición (*base editing*), pueden verse limitados por las secuencias PAM. Otra nucleasa utilizada es Cas9 del *Staphylococcus aureus* (SaCas9), de menor tamaño (≈ 1054 aminoácidos) y con un PAM más complejo (NNGRRT*) (83). Ocasionalmente, el tamaño de la proteína puede ser limitante a la hora de elaborar métodos de introducción de esta en las células.

Dentro de los sistemas clase 2, las nucleasas Cpf1 (Cas12a) y C2c2 (Cas13a) han sido utilizadas en edición genética (84). Concretamente, Cpf1 del *Acidaminococcus sp.* (AsCpf1) y del *Lachnospiraceae bacterium* (LbCpf1) también ha sido utilizada para edición genética en mamíferos (85). En contraste a lo descrito con respecto a los PAM de Cas9, el PAM de Cpf1 está en el extremo 5' del protoespaciador diana. Cpf1, no necesita de tracrRNA para cortar DNA, se sirve únicamente de un crRNA para ejercer su acción nucleasa (**Figura 10B**) (86). Cpf1 forma un complejo con sgRNA y corta dsDNA a 18-23 bases del PAM.

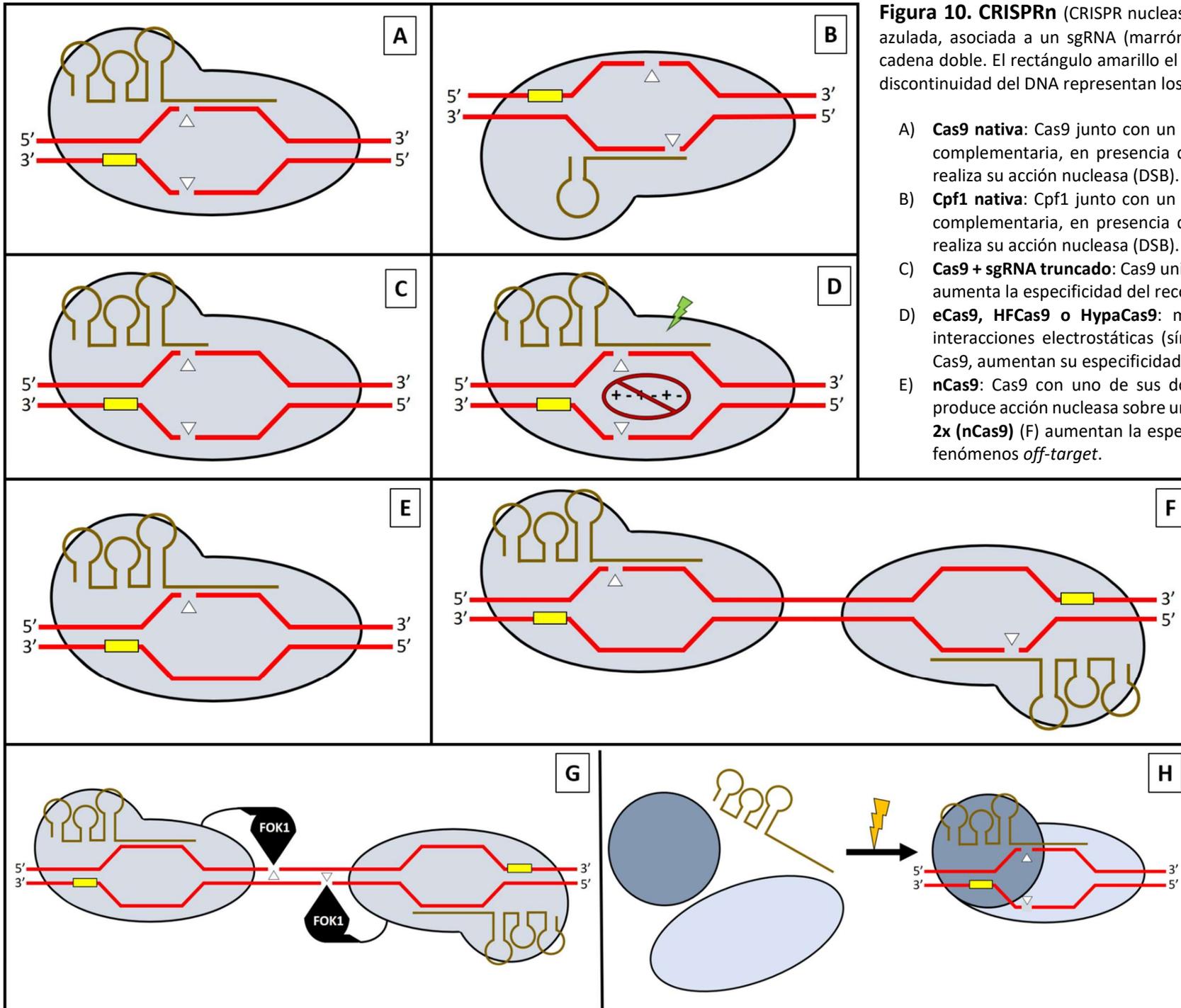


Figura 10. CRISPRn (CRISPR nucleasa). Cas9 se presenta como una figura gris-azulada, asociada a un sgRNA (marrón). Las líneas rojas representan dsDNA de cadena doble. El rectángulo amarillo el segmento PAM. Los triángulos blancos y la discontinuidad del DNA representan los puntos de acción nucleasa.

- A) **Cas9 nativa:** Cas9 junto con un sgRNA reconoce una secuencia del dsDNA complementaria, en presencia de una secuencia PAM en el extremo 3' y realiza su acción nucleasa (DSB).
- B) **Cpf1 nativa:** Cpf1 junto con un crRNA reconoce una secuencia del dsDNA complementaria, en presencia de una secuencia PAM en el extremo 5' y realiza su acción nucleasa (DSB).
- C) **Cas9 + sgRNA truncado:** Cas9 unido a un sgRNA de menos de 20 nucleótidos aumenta la especificidad del reconocimiento del dsDNA.
- D) **eCas9, HFCas9 o HypaCas9:** mutaciones (rayo verde), que alteran las interacciones electrostáticas (símbolo de +/-) de la acción enzimática de Cas9, aumentan su especificidad.
- E) **nCas9:** Cas9 con uno de sus dominios nucleasa anulados (HNH o RuvC) produce acción nucleasa sobre una sola hebra del dsDNA. Combinaciones de **2x (nCas9)** (F) aumentan la especificidad del reconocimiento y reducen los fenómenos *off-target*.

- G) **2x (dCas9+Fok1):** otra estrategia para reducir los fenómenos *off-target* es unir una Cas9 inactiva (dCas9) a dos nucleasas Fok1.
- H) **Cas9 inducible:** Cas9 puede dividirse en diferentes porciones (círculo azul oscuro y óvalo gris-azulado) que, tras un estímulo determinado una vez la célula diana, se unifican en una Cas9 funcional.

Modificado de Komor et al. (43)

6.2. Modificaciones del sistema CRISPR-Cas en laboratorio: versatilidad y plasticidad

Uno de los principales objetivos de la investigación en edición genética es evitar los fenómenos “*off-target*”, con lo cual se han elaborado estrategias para aumentar la especificidad de la acción de los sistemas CRISPR-Cas. De forma natural, Cpf1 parece ser más específica que SpCas9 (87). Muchos cambios leves en el sistema CRISPR-Cas9 permiten aumentar su precisión: el mero hecho de reducir el sgRNA de SpCas9 a menos de 20 nucleótidos parece aumentar su especificidad con respecto al DNA diana en varios órdenes de magnitud (**Figura 10C**) (88). Otra forma de aumentar la especificidad de Cas9, es introduciendo 3-4 mutaciones que neutralizan las interacciones electrostáticas del complejo efector, aumentando la especificidad (eCas9 –*enhanced Cas9*– o HFCas9 –*High-fidelity Cas9*–) (**Figura 10D**) (89). Otros estudios han realizado mutaciones en el complejo de reconocimiento (*REC lobe*) de Cas9, aumentando su precisión (HypaCas9). (90)

Existen variantes de Cas9, llamadas Cas9 inducibles (**Figura 10H**), cuya unión a la diana depende de la activación a través de una molécula pequeña accesoria, cambios de temperatura o irradiación de luz (91). Otras alternativas son la fragmentación de Cas9 en dos o más fragmentos para su mejor introducción en organismos vivos, dimerizando dentro de la célula diana una vez transfectada. (43)

Se han conseguido en laboratorio variantes de Cas9 “programables” para edición genética (**Tabla 7**). *Nickase* Cas9 (nCas9) corresponde a una proteína Cas9 modificada que tiene inactivado uno de sus dominios nucleasa (HNH o RuvC) de tal manera que solo corta una hebra del DNA diana (**Figura 10E**). Por lo tanto, se requeriría de dos nCas9 y dos sgRNA diferentes (cada uno con una diana en cada hebra del dsDNA) para ejercer el efecto deseado (**Figura 10F**). Esta cualidad permite aumentar la especificidad y precisión de la edición genética, reduciendo mucho los fenómenos *off-target* mientras se mantiene la actividad diana. (92)

Cas9 desactivada (dCas9 –*deactivated Cas9*–) es una variante de Cas9 con ambos dominios nucleasa inhabilitados, por lo que se une a la secuencia diana sin ejercer función alguna a no ser que se le asocien otros componentes (**Figura 11A**). dCas9 puede obtener acción nucleasa si se le suma la acción de Fok1 (enzima utilizada en TALENs y ZFNs). Dos dCas9, cada una unida a una nucleasa Fok1, con dos SgRNA diferentes, dimerizan de forma similar a nCas9 para ejercer su acción nucleasa. Esta última combinación tenía por objetivo aumentar la especificidad de la acción nucleasa (**Figura 10G**). (93) (94)

Con dCas9, a través de su capacidad de unión a una secuencia específica, podemos bloquear la transcripción de determinados genes (CRISPRi –*CRISPR interference*–) (**Figura 11**) o aumentarla (**Figura 12**) (CRISPRa –*CRISPR activation*–).

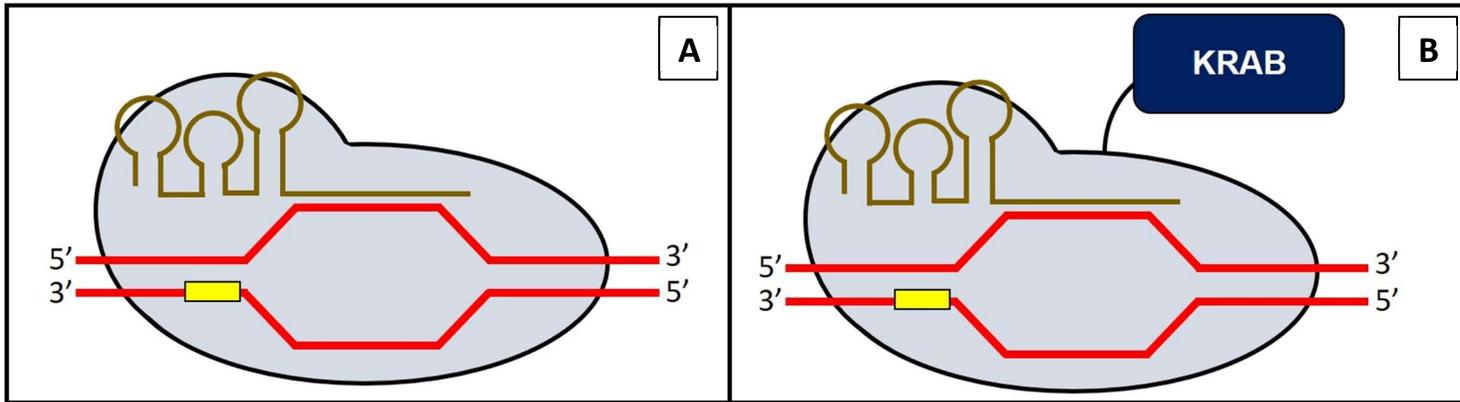


Figura 11. CRISPRi (CRISPR interference).

- A) **dCas9:** compone una nucleasa Cas9 con ambos dominios nucleasa inhabilitados, de tal forma que reconoce una secuencia y únicamente se une a ella por complementariedad de sgRNA.
- B) **dCas9 + KRAB:** dCas9 unido a KRAB (a través de un dominio proteico -representado- o en un aptámero de sgRNA -no representado-) actúa como represor transcripcional.

Aunque no representado, dCas9 + SID4X se comportaría de forma similar a dCas9 + KRAB.

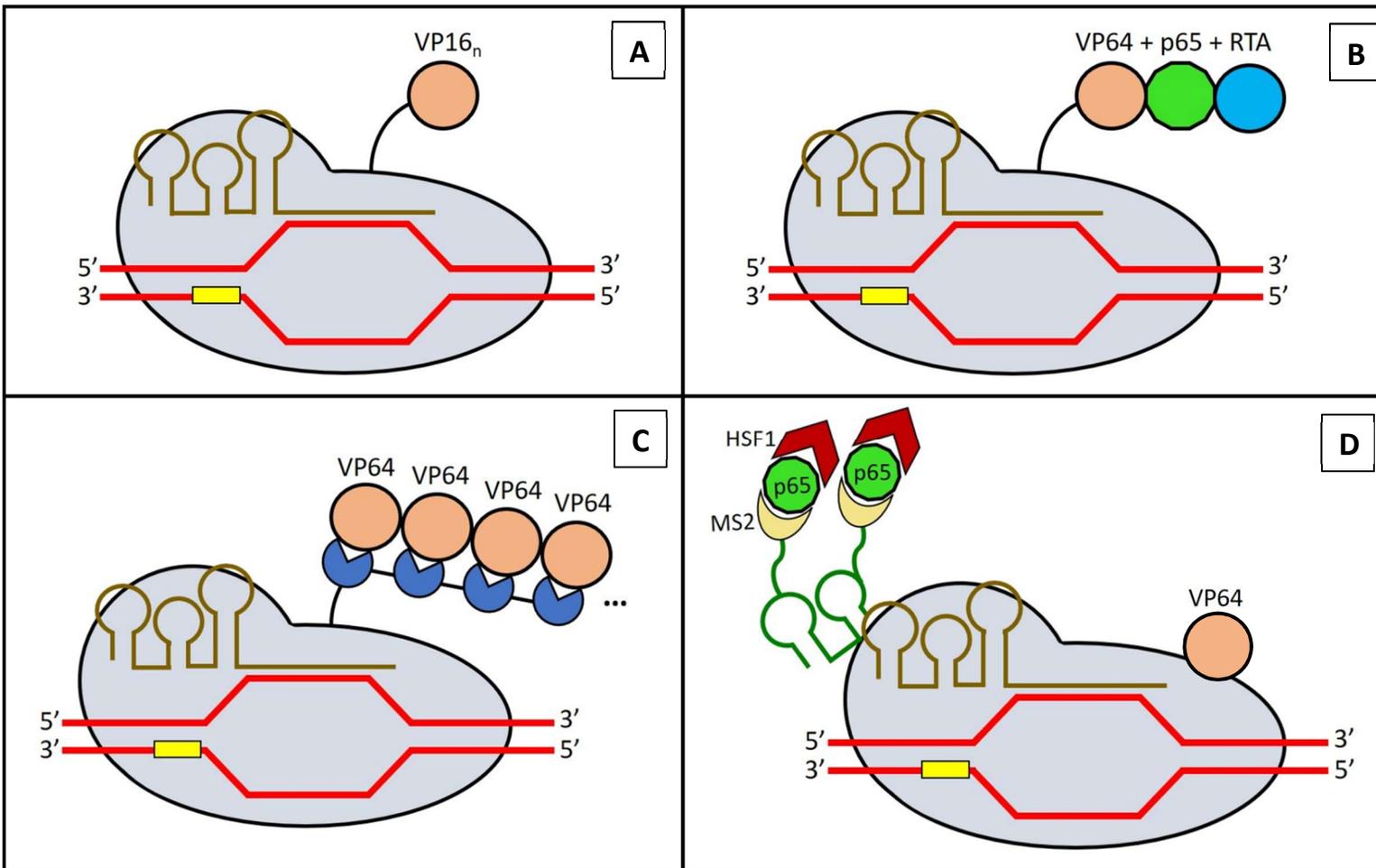


Figura 12. CRISPRa (CRISPR activation).

- A) **dCas9 + (VP16)_n:** dCas9 unido a “n” repeticiones (VP16, VP64, VP160 o VP192) del factor de transcripción del virus herpes (VP16) aumenta la transcripción en la región complementaria al DNA diana. Aunque no está representado, VP16 también puede unirse a un aptámero sgRNA.
- B) **dCas9 VPR:** supone un complejo formado por VP64, p65 y RTA unidos a dCas9.
- C) **dCas9 SunTag:** dCas9-SUPerNova Tag es un activador de la expresión genética que se sirve de una cadena repetitiva de péptidos que recluta numerosas unidades de VP64.
- D) **dCas9 SAM:** dCas9 unido a SAM (*Synergistic activation mediator*) se sirve de un sgRNA que incorpora dos aptámeros de MS2 (cadena verde unida al sgRNA) que reclutan un complejo activador proteico MS2 + p65 + HSF1. Además, dCas9 se encuentra unido a VP64.

Aunque no representado, dCas9 unido de forma independiente a p65 se comportaría de forma similar a dCas9 + (VP16)_n.

Ambas figuras modificadas de Komor et al. (43)

SISTEMA	CRISPRn	CRISPRi	CRISPRa	Epigenética		Edición de Bases
MECANISMO DE ACCIÓN	Actividad nucleasa	Interferencia con la transcripción	Activación de la transcripción	Facilitación de la expresión	Silenciamiento de la expresión	Sustitución de bases nucleicas
HERRAMIENTAS	<i>Cas9</i>	<i>dCas9</i>	<i>dCas9</i> + (<i>VP16</i>) _n	<i>dCas9</i> + <i>p300</i>	<i>dCas9</i> + <i>LSD1</i>	<i>dCas9</i> + <i>citidina</i> <i>deaminasa</i>
	<i>nCas9</i>	<i>dCas9</i> + <i>KRAB</i>	<i>dCas9</i> o <i>sgRNA</i> + <i>VP64</i>	<i>dCas9</i> + <i>TET1</i>	<i>dCas9</i> + <i>DNMT3</i>	
	<i>dCas9</i> + <i>Fok1</i>	<i>sgRNA</i> + <i>KRAB</i>	<i>dCas9</i> + <i>p65</i>			
	<i>Cas9</i> inducible	<i>dCas9</i> + <i>SID4X</i>	<i>dCas9</i> + <i>VPR</i>			
	<i>eCas9</i> , <i>HFCas9</i> o <i>HypaCas9</i>		<i>dCas9 SunTag</i> <i>SAM</i>			

Tabla 7. Aplicaciones del sistema CRISPR-Cas9 y variantes de Cas9. CRISPRn: CRISPR nucleasa. CRISPRi: CRISPR *interference*. CRISPRa: CRISPR *activation*. nCas9: *nickase Cas9*. dCas9: Cas9 desactivada. eCas9: *enhanced Cas9*. HFCas9: *High-Fidelity Cas9*. dCas9 SunTag: dCas9-SUPerNova Tag [dCas9+(VP64)_n]. SAM: *Synergistic activation mediator* [(sgRNA+MS2+p65+HSF1) + (dCas9+VP64)].

Con respecto a CRISPRi, dCas9 *per se* ha demostrado ser un represor transcripcional eficiente, evitando la transcripción por conflicto de espacio de la secuencia promotora a la que se encuentra ligada (95). El sistema CRISPRi basado en dCas9 es eficiente si se dirige a una secuencia de un promotor (en el DNA) o a una región de unión a ribosoma (en el transcrito de mRNA). Da igual a que cadena de la doble hebra se una, dCas9 inhibe el promotor con la misma eficiencia. Para mayor represión de genes, un dominio asociado a Kruppel (KRAB –*Kruppel associated box*–) potencia esta acción ya sea fusionado a dCas9 o a aptámeros de sgRNA (Figura 11B) (96) (97). Otro ejemplo de CRISPRi es el dCas9-SID4X basado en cuatro copias del dominio interactor de mSin3 (complejo proteico modificador de la cromatina que contiene deacetilasas) (98). Ambos sistemas dCas9-KRAB y dCas9-SID4x han demostrado ser útiles en la represión de genes en organismos eucariota.

Las tecnologías basadas en CRISPRa usan sgRNA complementario a promotores o potenciadores de genes combinados con dCas9 unida a activadores de la transcripción.

Para este abordaje se han utilizado diversos activadores de transcripción. Uno de ellos es VP16 (factor de transcripción del virus herpes –*Herpes Simplex Viral Protein 16*–), el cual puede ser repetido en tándem para aumentar su función activadora: VP64 (4 copias), VP160 (10 copias) y VP192 (12 copias) (Figura 12A). Otro activador utilizado es p65 (activador de NF-κB –factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas–).

Múltiples activadores combinados pueden mejorar el resultado. Existen complejos llamados dCas9-SUPerNova Tag (dCa9-SunTag) con repeticiones en tándem de un péptido sintético que permite reclutar múltiples VP64 (Figura 12C) (99). Puede incluso

crearse un activador tripartito (dCas9-VPR) formado por VP64, p65 y RTA (un transactivador derivado del Virus de Epstein-Barr) (**Figura 12B**). (43)

Incluso los sgRNA han sido programados para ser activadores *per se* en forma de aptámeros de RNA (oligonucleótidos capaces de reconocer de forma específica y con alta afinidad a varios tipos de moléculas diana). Un ejemplo de esta combinación de activadores es el complejo SAM (Mediador de activación sinérgica –*Synergistic activation mediator*–). Dicho complejo consiste en una dCas9 unida a VP64 que asocia un sgRNA unido a dos aptámeros de RNA MS2 que reclutan un complejo proteico formado por MS2 (una proteína de bacteriófagos), p65 y HSF1 (factor de transcripción de choque térmico 1 –*Human heat-shock transcription factor 1*–) (**Figura 12D**). Dicha combinación incrementa la transcripción hasta 10 veces más, con alta especificidad. (100)

De todos los ejemplos citados, SunTag, VPR y SAM han demostrado ser los activadores CRISPRa más eficientes (82). Mientras que la tecnología CRISPRa ha demostrado ser eficiente en la activación de genes expresados de manera episomal, la activación de genes endógenos en eucariotas superiores es más modesta. (82)

La versatilidad de Cas9 ha servido incluso para regular la epigenética celular (**Figura 13**). La regulación epigenética se puede dar por cambios en la conformación de la cromatina según la interacción de ésta con las histonas, facilitando la transcripción o silenciado determinados genes. A nivel activación de genes, la histona acetiltransferasa p300 unida a dCas9 (dCas9-p300) consigue la acetilación del residuo 27 de lisina de la histona H3 aumentando la transcripción (**Figura 13A**) (101). Por otra parte, dCas9 unido a una demetilasa de DNA (TET1 –*ten-eleven translocation dioxygenase 1*–) también aumenta la expresión (**Figura 13B**) (102). En cuanto a la represión transcripcional, dCas9 unido a la demetilasa LSD1 (induce la desmetilación del residuo 4 de lisina de la histona H3) y dCas9 unida a metiltransferasas de DNA (DNMT3a y DNMT3L) han demostrado reprimir la expresión de genes (**Figura 13C y 13D**). (43) (103) (104)

Por último, la edición de bases (“*base editing*”), permite introducir mutaciones puntuales que no requieren de HDR o NHEJ, sino que son reacciones enzimáticas (deaminación) que permiten cambiar una base de DNA por otra. Generalmente, esta reacción requiere de dCas9 unido a una deaminasa de citidina (**Figura 14**). (43)

7. APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LA TECNOLOGÍA CRISPR-CAS

Las posibilidades de actuación que ha permitido la tecnología CRISPR son muy amplias y accesibles. Muchas de las funciones mencionadas previamente (acción nucleasa (*knock-out* o *knock-in*), represión de la transcripción (*knock-down*), aumento de la transcripción, modificaciones epigenéticas) tienen aplicación directa en edición genética con fines médicos, que será el tema que desarrollaremos en profundidad en este apartado.

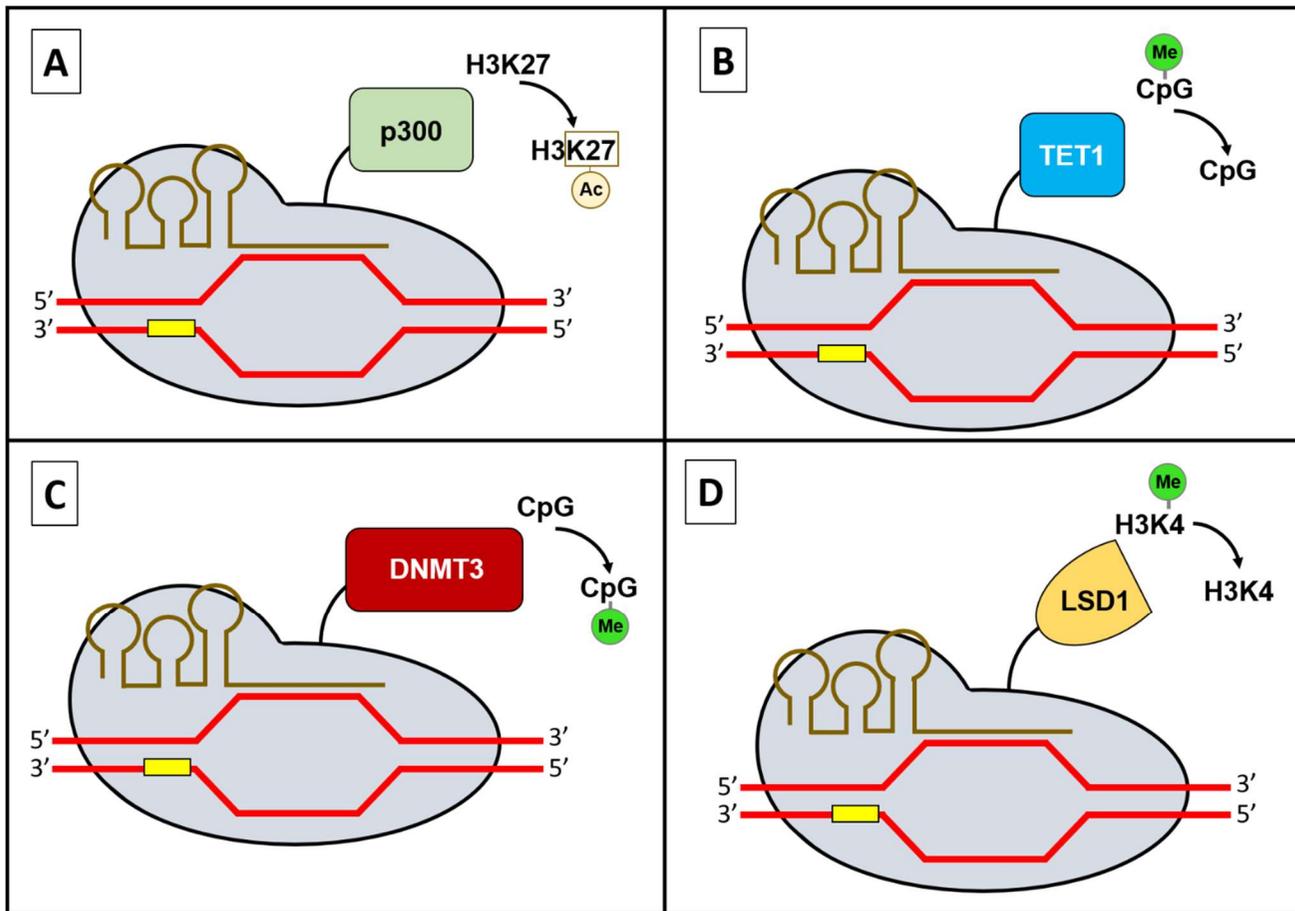


Figura 13. Modificaciones epigenéticas de CRISPR

Facilitación de la expresión

- A) **dCas9 + p300:** dCas9 unido a la acetilasa p300 acetila al residuo 27 de lisina (K27) de la histona 3 (H3) facilitando la exposición de la región diana.
- B) **dCas9 + TET1:** dCas9 unido a demetilasa de DNA TET1, demetila regiones CpG (islas del genoma ricas en citosina y guanina, habitualmente asociada a promotores), exponiéndolas y facilitando la expresión de las regiones asociadas.

Silenciamiento de la expresión

- C) **dCas9 + DNMT3:** dCas9 unida a DNMT3 realiza la acción opuesta a dCas9 + TET1, metilando regiones CpG y silenciando la expresión de las regiones de DNA asociadas.
- D) **dCas9 + LSD1:** dCas9 unido a la demetilasa LSD1 induce la demetilación del residuo 4 de lisina (K4) de la histona 3 (H3), Disminuyendo la expresión de las regiones asociadas.

Modificado de Komor et al. (43)

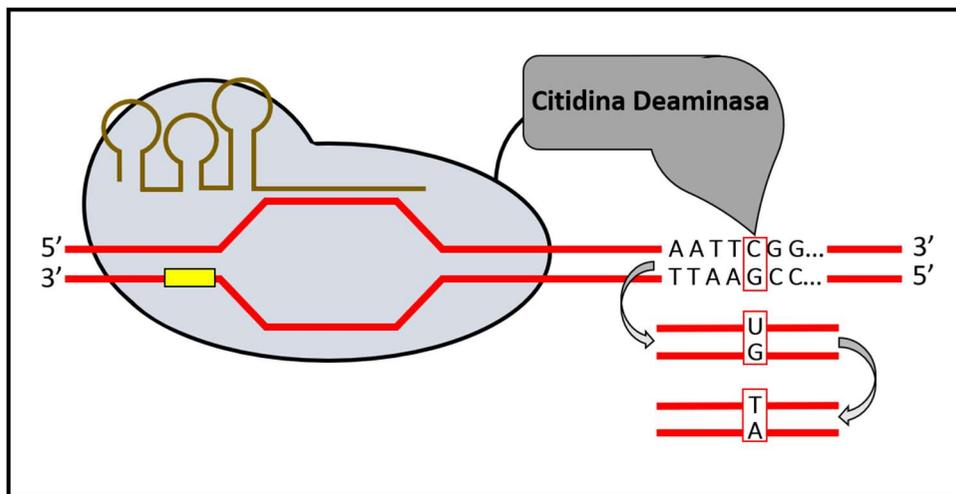


Figura 14. Edición de bases con Cas9

dCas9 + Citidina Deaminasa: dCas9 reconoce una secuencia complementaria al sgRNA. Una citidina deaminasa unida a dCas9 realiza su acción enzimática (elimina el residuo NH₂ de la Citidina, tornándose Uracilo). Este nuevo emparejamiento Uracilo-Guanina es reconocido por la maquinaria endógena celular y transformado en un apareamiento Timina-Adenina.

Modificado de Komor et al. (43)

Existen otras diversas aplicaciones de la metodología CRISPR-Cas, que no analizaremos, pero sí mencionaremos: técnicas de imagen (CRISPR asociado a proteínas de fluorescencia) (105), elaboración de antibióticos/fármacos (106), estudio de poblaciones celulares (107), generación de modelos animales de laboratorio, modelos computacionales de interacción (108)... etc.

A continuación, enumeraremos algunos de los estudios más relevantes de edición genética con fines terapéuticos.

7.1. Ensayos en cultivos celulares y células madre

Una de las herramientas más valiosas para la edición genética son las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs –*induced Pluripotent Stem Cells*–), las cuales son células madre pluripotentes generadas a partir de células somáticas adultas (109). Las células de un organismo pueden ser aisladas y posteriormente ser genéticamente modificadas con la tecnología CRISPR-Cas o cualquier otra técnica de edición genética.

7.1.1. Corrección genética de enfermedades monogénicas

Xie et al. realizaron un estudio en 2014 en el que obtuvieron iPSCs a partir de fibroblastos de un paciente con beta-talasemia. Sobre dichas iPSCs realizaron técnicas de edición genética basadas en Cas9 con reparación del corte mediante HDR. Aquello permitió corregir el estado heterocigoto de la mutación de las células del paciente, con el resultado de la ausencia de consecuencias clínicas. En este estudio, concretamente, se utilizó junto a CRISPR-Cas9 el transposón *PiggyBac* para la recombinación homóloga y la corrección sitio-específica de la mutación. Concluyeron que dichas modificaciones restauraban la correcta expresión de la proteína sin apreciar fenómenos *off-target* (Figura 15). Además, la diferenciación posterior a eritroblastos mantenía esta corrección genética. (110)

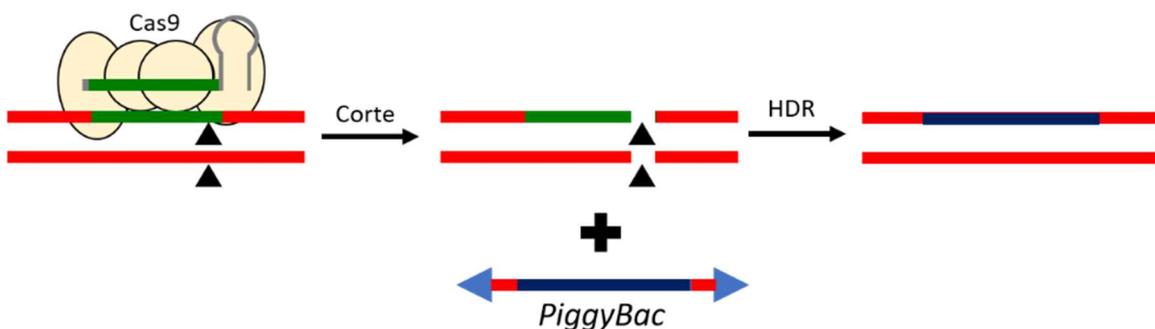


Figura 15. Representación esquemática del estudio de Xie et al. (110). Cas9 con un sgRNA dirigido hacia la mutación heterocigota de la beta-talasemia (verde) realiza su acción nucleasa, produciendo DSB. Tras esto, el transposón *PiggyBac* (que contiene la secuencia de DNA donante para corregir la mutación) se incorpora a las zonas de corte de Cas9 con ayuda de una transposasa (no representada) que cataliza el movimiento del transposón *PiggyBac* a su nuevo locus. Tras los mecanismos de HDR, la nueva secuencia queda incorporada al genoma.

La fibrosis quística es una enfermedad grave y prevalente, que empeora notablemente la calidad de vida del paciente que la padece y consume muchos recursos médicos. Se asocia a la mutación del gen CFTR (CFTR: regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística –*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*–). Schwank et al. (2013) consiguieron la corrección de la patología con alta especificidad en organoides basados en células madre intestinales. Para ello se valieron de Cas9 con un sgRNA diana frente al gen mutado y añadiendo el gen CFTR nativo como DNA donante para su incorporación por HDR (111). Firth et al. posteriormente (2015) desarrollaron un modelo celular iPSC *in vitro* de un paciente con fibrosis quística homocigoto para la mutación CFTR. Utilizaron un plásmido que codificaba para la proteína Cas9, un sgRNA y un DNA donante para corregir la mutación mediante HDR. Además, Firth et al. consiguieron la posterior diferenciación de las iPSCs a epitelio pulmonar exhibiendo la corrección de la función del gen CFTR. (112)

Las enfermedades neuromusculares han sido uno de los mayores objetivos de la terapia génica (113). Concretamente, la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) ha sido una de las más exploradas, con la dificultad añadida de estar asociada a un amplio espectro mutacional (deleciones, duplicaciones, mutaciones puntuales...) (114). Li et al. (2015) combinaron en un estudio técnicas basadas en TALENs y en CRISPR-Cas9 sobre iPSCs derivadas de fibroblastos de un paciente con DMD. Tras tres modificaciones genéticas diferentes (salto de exón –*exon skipping*–, cambios del marco de lectura –*frameshifts*– y *knock-in* de exones) y la posterior diferenciación a células musculoesqueléticas, pudieron detectar la correcta expresión de la distrofina (proteína ausente en la DMD) (115). Otro grupo consiguió restablecer la expresión de distrofina en células de un paciente con DMD mediante una edición genética multiplex (varios sgRNAs con diferentes dianas) usando CRISPR-Cas9. Además, al trasplantar dichas células modificadas a ratones inmunodeficientes, la expresión de distrofina se mantenía. (116)

Bassuk et al. (2016) corrigieron la retinitis pigmentosa en iPSCs derivadas de un paciente con esta enfermedad. Mediante Cas9, repararon el gen RPGR (*Retinitis pigmentosa GTPase regulator*) usando HDR generando un 13% de células corregidas (estudios previos sin las tecnologías CRISPR-Cas se describían tasas de corrección del 1% o menores). (117)

Chang et al. (2015), usando iPSCs de un paciente con Inmunodeficiencia Combinada Grave (SCID –*Severe Combined Immunodeficiency*–) lograron corregir la mutación de JAK3 (causante de la enfermedad por deficiencia) mediante HDR vía CRISPR-Cas9. (118)

Todos estos estudios han puesto en el centro de la diana a CRISPR-Cas como herramienta preferente para corregir defectos genéticos puntuales, especialmente enfermedades que, en muchos casos, carecen de otro tipo de terapia. CRISPR-Cas ha permitido un *gene targeting* de alta eficiencia.

7.1.2. Cáncer: modelos de estudio y estrategias de curación

El cáncer es una enfermedad compleja, raramente relacionada con la afectación de un solo gen. Sin embargo, diversos oncogenes y genes supresores de tumores son conocidos en la literatura científica y pueden suponer una diana modificadora de enfermedad.

El sistema CRISPR-Cas tiene elevada utilidad en la generación de modelos de experimentación para estudiar los procesos cancerígenos. El primer estudio que avaló esta práctica fue de Xue et al. (2014), quienes crearon un modelo murino de cáncer de hígado usando CRISPR-Cas9 introducido por inyección hidrodinámica con el fin de mutar los genes supresores de tumores Pten y p53 (119). Matano et al. (2014) y Drost et al. (2015 y 2017) consiguieron generar modelos de enfermedad de cáncer de colon humano a través de la aplicación de CRISPR-Cas sobre células madre intestinales cultivadas, ampliando el horizonte sobre el conocimiento de las rutas metabólicas y los genes causantes de dicha patología (120) (121) (122). Algunos de los modelos de enfermedad oncológica conseguidos en laboratorio son muy complejos, un ejemplo de ello fue la obtención de reordenamientos entre cromosomas gracias a CRISPR-Cas9 tal y como los que suceden en el carcinoma pulmonar no microcítico. (123)

Choudhury et al. (2016), basándose en un sistema dCas9-Tet1, demostraron que la inducción de la metilación del promotor del gen supresor de tumores BRCA1 daba lugar a un aumento en la expresión del mismo (que se encuentra silenciado en diversos cánceres) (102). Han et al. (2015) se sirvieron de células madre cancerígenas que expresaban CD44 (marcador de metástasis, entre otros) para generar un *knock-out* mediante acción nucleasa de Cas9 reparada por NHEJ sobre este gen. Dicho *knock-out* ayudó a elucidar que CD44 es un factor importante en el mantenimiento de la indiferenciación celular de los tumores malignos. (124)

Por otra parte, es de esperar que la tecnología CRISPR-Cas acompañe a la creciente tendencia en terapia génica de abordar la modificación genética de las células con fines terapéuticos, sin que necesariamente se dirija a la corrección de un error genético. Cualquiera de los múltiples abordajes de terapia génica contra el cáncer, basados en introducir toxinas en células tumorales o antígenos que atraigan al sistema inmune, son susceptibles de incorporar la tecnología CRISPR-Cas para mejorar la eficiencia y especificidad de la modificación genética perseguida.

Por ejemplo, la inmunoterapia celular para el tratamiento del linfoma difuso de células B grandes utilizando células T quiméricas autólogas generadas con la tecnología CRISPR-Cas9 se encuentra actualmente en fase I de ensayo clínico. Consiste en la administración de linfocitos T que expresan un antígeno (anti-CD19) quimérico que reconoce a las células B malignas que expresan CD19. De los 15 pacientes enrolados en el estudio, 8 han conseguido remisión total y 4 remisión parcial. (125)

7.1.3. Prevención de enfermedades Infecciosas

En los últimos años, diversas estrategias basadas en la edición genética dirigida mediante el sistema CRISPR-Cas se han enfocado hacia la prevención de enfermedades infecciosas de alta prevalencia y morbilidad, mediante la inactivación de genes del propio agente infeccioso o de la célula huésped que se requieren para completar el ciclo infeccioso.

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) sigue siendo una amenaza para la salud pública, a pesar de los avances tanto en tratamiento como en medidas preventivas (126). Las estrategias en el punto de mira de la investigación actual se centran en el control de la infección latente y el reservorio (127). Una de las aplicaciones de CRISPR-Cas en este ámbito es la delección o interrupción de los receptores de los linfocitos T humanos para el VIH (CXCR4 y CCR5).

Hou et al. (2015) consiguieron alterar el gen CXCR4 de manera que las células se tornaban resistentes a la infección por VIH. Además, no se evidenciaron fenómenos *off-target* (128). Ye et al. (2014) lograron producir células CCR5 Δ 32 (resistentes a VIH) a partir de iPSCs utilizando CRISPR-Cas9, alcanzando la homocigosis para CCR5 Δ 32 en un 33% de las células (129). Mandal et al. (2014) obtuvieron la inactivación del gen CCR5 en células CD34+ precursoras hematopoyéticas, que conservaron esta característica en su posterior diferenciación. (130)

En cuanto al abordaje de la eliminación de la infección latente, Kaminsky et al. (2016) erradicaron las copias integradas en el genoma de linfocitos T CD4+ humanos, inhibieron la capacidad de infección primaria por VIH e impidieron la replicación del virus *ex vivo*. Todo ello fue mediante el reconocimiento por parte del sistema CRISPR-Cas9 de LTR (Secuencia Larga Terminal –*Long Terminal Sequence*–), una secuencia típica de retrovirus, posicionada de forma próxima al promotor del VIH, integrada en el genoma hospedador (131). Este estudio ha inspirado experimentos *in vivo* con ratones con objetivo de la erradicación de la infección por VIH, como el reciente estudio de Yin et al. (2017) esquematizado en la **Figura 16**. (132)

El Virus de Epstein-Barr (VEB) es una diana interesante, no por la infección vírica en sí, sino por las consecuencias de ésta al encontrarse en coexistencia con diversos tumores como el linfoma de Burkitt, el linfoma de Hodgkin o el cáncer nasofaríngeo. El linfoma de Burkitt con infección concomitante por Virus de Epstein-Barr prolifera con mucha más agresividad. Wang et al. (2014) utilizaron células neoplásicas derivadas de un paciente con linfoma de Burkitt que padecía infección latente por VEB. Al usar CRISPR-Cas con sgRNA diana para el VEB, se redujo sustancialmente la carga vírica y la proliferación tumoral. (133)

No obstante, el VEB no es el único virus asociado a tumores, el Virus del Papiloma Humano (VPH) está en estrecha relación con el cáncer de cérvix. Un estudio de 2014 se basó en el genotipo VPH-16 (de alto riesgo de desarrollo de cáncer) para realizar *knock-out* sobre los genes de mal pronóstico E6 y E7 mediante CRISPR-Cas. Dichos genes se encargan de resistir los mecanismos de muerte celular y, al ser anulados, se inducía la apoptosis de las células infectadas y el crecimiento cancerígeno. (134)

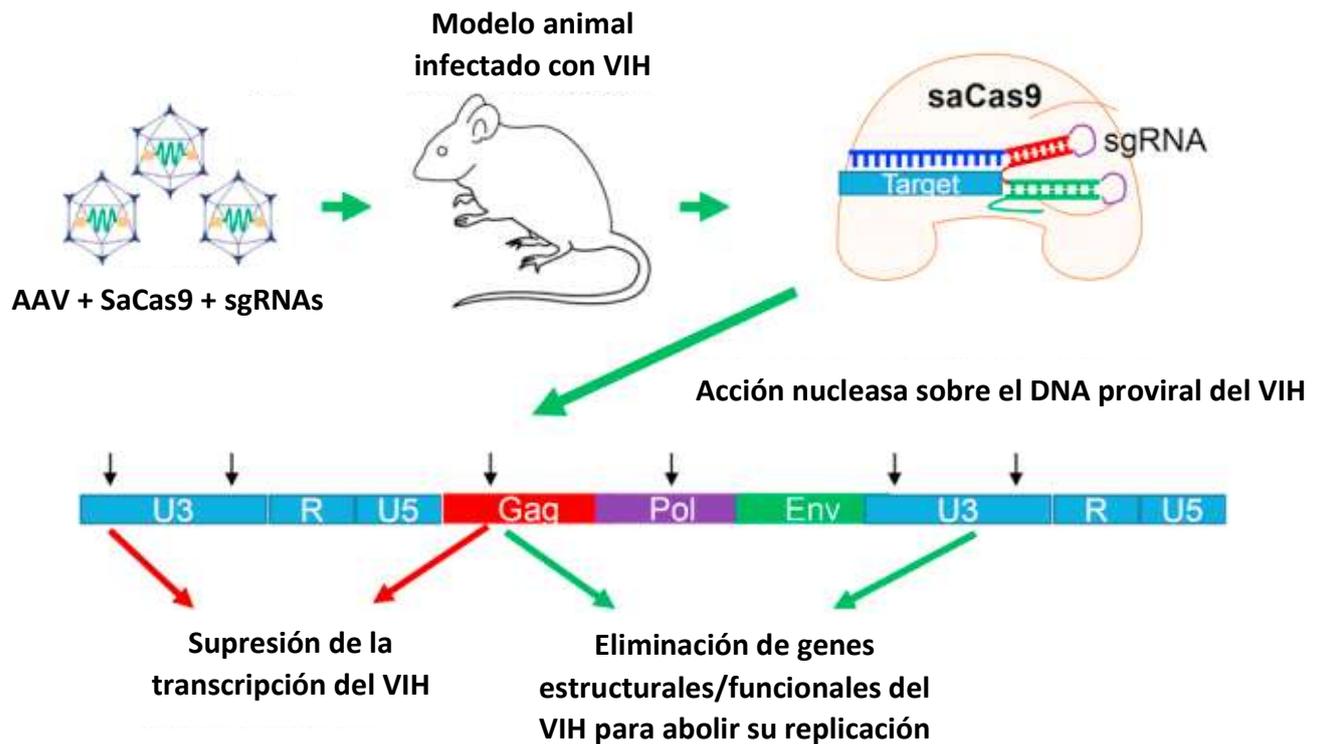


Figura 16. Representación esquemática del estudio de Yin et al. (132). Virus asociados a adenovirus (AAVs), que contenían Cas9 del *Staphylococcus aureus* (SaCas9) y múltiples sgRNA, sirvieron como vectores para introducir estos componentes en modelos animales murinos infectados por el VIH. SaCas9 en ayuda del sgRNA reconocía secuencias diana (*Target*) y ejercía su acción nucleasa (flechas negras) sobre varias regiones clave (U3, Gag, Pol... etc.) del DNA proviral, que es el DNA del VIH integrado en el genoma de la célula infectada. Esto causó una supresión en la transcripción del virus e imposibilitó la transcripción de genes implicados en su replicación.

El Virus Herpes Simple 1 (VHS1) tiene una elevada prevalencia de infección en la población. Su infección es menos grave, pero puede ir asociado a ciertas complicaciones. Un estudio de van Diemen et al. (2016) demostró que el sistema CRISPR-Cas9 frente a genes esenciales del VHS1 generaban fibroblastos resistentes a la infección por VHS1. Sin embargo, se podían crear mutantes de escape que eludían la actividad nucleasa de Cas9. Estas cepas resistentes fueron controladas usando dos sgRNAs frente a dos genes esenciales del VHS1 (135). De forma similar, en ese estudio se pudo limitar la replicación del Citomegalovirus (CMV) y el VEB. (135)

El Virus de la Hepatitis B (VHB) es causante de hepatitis aguda y crónica; pudiendo incluso llegar a desarrollar cirrosis y/o hepatocarcinoma. A pesar de que existen vacunas eficaces contra este virus, la infección crónica sigue siendo un reto clínico. La diana principal de los estudios que utilizan CRISPR-Cas sobre modelos de infección por VHB es el DNA de doble cadena circular cerrado de forma covalente (cccDNA) que se forma en el núcleo de las células tras la infección por este virus, y es clave en el desarrollo de la infección crónica. Lin et al. (2014) consiguieron limitar la infección por VHB *in vitro* e *in vivo*: elaboraron sgRNA contra el VHB, reduciendo la expresión de las proteínas derivadas de la replicación del mismo (136). Tras esto, mediante inyección hidrodinámica en un modelo murino, observaron la reducción de los antígenos del virus en suero (136). De forma similar, un estudio de 2015 reafirmó esta técnica de inyección

hidronámica de sgRNA+Cas9 en ratones con diana contra el VHB, dando como resultado un consecuente descenso de los niveles de cccDNA y menor replicación del virus. (137)

Por último, requiere una mención especial la malaria, una enfermedad infecciosa causada por un parásito (*Plasmodium*) transmitida por insectos, concretamente diversas especies del mosquito del género *Anopheles*. La malaria supone un campo de investigación interesante, tanto por la prevalencia de su enfermedad en África y zonas de Sudamérica como por la capacidad de actuar sobre sus vectores. Un estudio de marzo de 2018 basado en CRISPR-Cas9 consiguió inactivar el gen FREP1 (*Fibrinogen-Related Protein 1*) reduciendo significativamente las tasas de infección por *Plasmodium*. (138)

Como aplicación diferente a las explicadas previamente, estudios han mostrado que, mediante el uso de *gene drives* (modelos de herencia Mendeliana forzada), puede provocarse la esterilidad de los mosquitos vectores de la malaria, pudiendo controlar la población de los mismos (**Figura 17**) (139). Sin embargo, eliminar toda una especie de mosquitos podría acarrear problemas medioambientales.

7.2. Perspectivas de futuro: ensayos en embriones y seres humanos

Desde el descubrimiento de las posibilidades terapéuticas de CRISPR, se ha soñado con su aplicación en humanos de forma controlada. Esto ha creado una importante competencia entre entidades por el desarrollo de ensayos clínicos basados en la aplicación de la tecnología CRISPR-Cas. De hecho, la prensa no científica utiliza términos como “2018: el año de CRISPR en humanos”. (140) (141)

Uno de los puntos más controvertidos de las aplicaciones del sistema CRISPR-Cas es su capacidad para editar genéticamente embriones. El primer estudio sobre embriones humanos fue llevado a cabo por Liang et al. en 2015. En él, editaron el gen humano de la beta-globina (HBB), el cual está relacionado con la beta-talasemia y la anemia falciforme. Diseñaron tres sgRNAs complementarios a diferentes regiones del gen HBB. Durante el experimento detectaron fenómenos *off-target* significativos, además de una preferencia por los mecanismos de reparación NHEJ (48). El gen HBB fue también editado, junto con el gen G6PD (deficitario en el favismo o déficit de G6PD), en un estudio de Tang et al. vía HDR en embriones humanos (142). De nuevo, en 2017, se consiguió corregir un gen mutante causante de la beta-talasemia mediante *base editing* (Cas9 unido a citidina deaminasa) de embriones humanos (143). Otro estudio de ese mismo año conseguía también corregir el gen MYBPC3 (asociado a miocardiopatía hipertrófica) vía HDR en embriones humanos con alta precisión. (144)

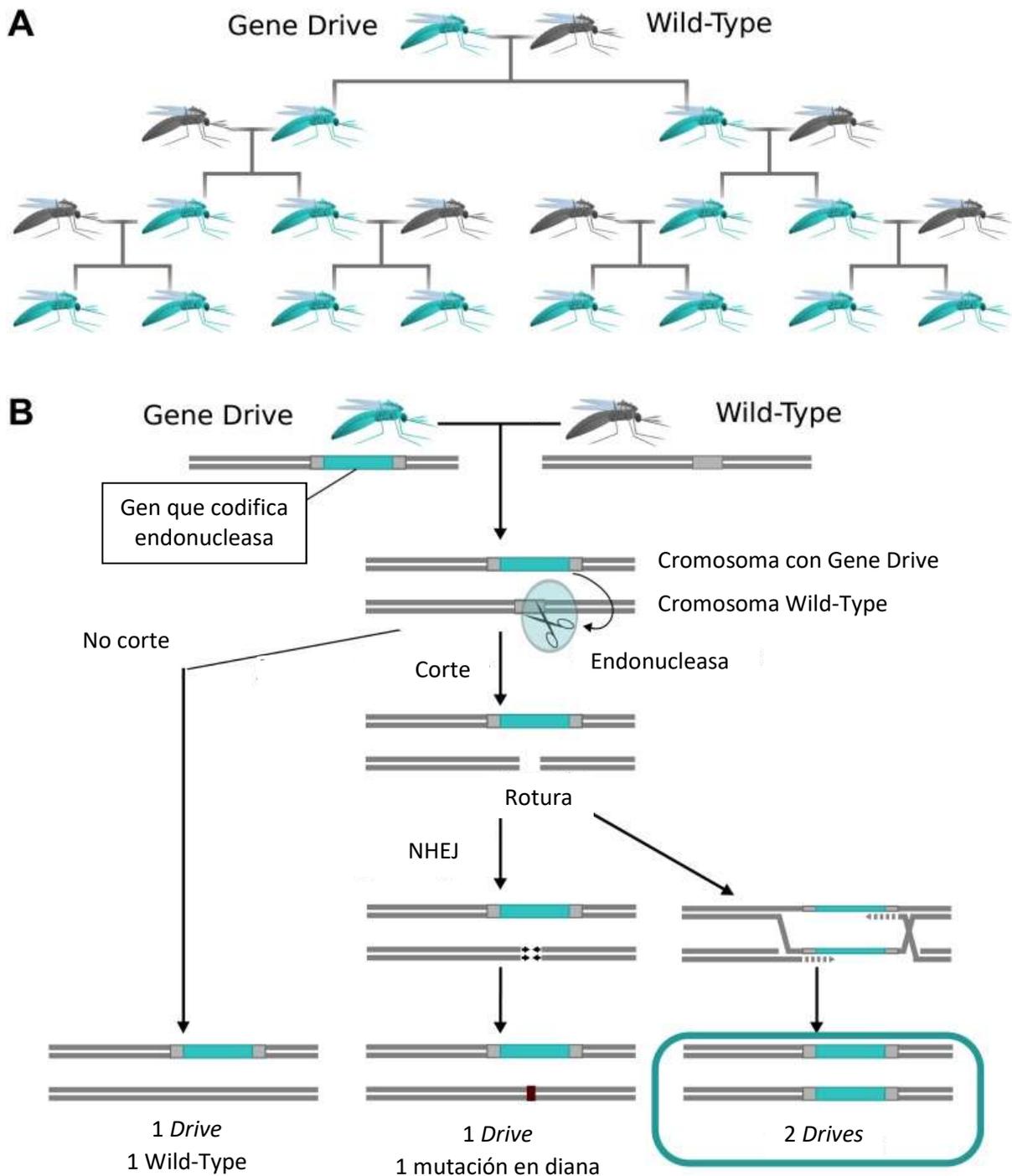


Figura 17. Propagación en la descendencia de una endonucleasa mediante *gene drives*.

- A) Un organismo portador de un *gene drive* (azul) codificante para una nucleasa se aparea con un organismo salvaje (wild-type) (gris), ello provoca que el *gene drive* es preferentemente heredado en toda su progenie.
- B) Los *gene drives* basados en endonucleasas se heredan de forma preferente teniendo en cuenta tres escenarios. En el caso de que la endonucleasa corte al cromosoma salvaje (wild-type) homólogo, la célula puede reparar este DSB dando lugar: a un *gene drive* y a una región mutada con indels (si se produce NHEJ); a dos *gene drives* (si se produce HDR); o a un *gene drive* y un cromosoma wild-type (si no se produce corte). Si la endonucleasa no consigue cortar o usa la vía NHEJ, el *gene drive* no se copia, por lo que los *gene drives* deben estar diseñados de manera que su acción de corte garantice una posterior reparación por HDR.

Modificada de Esvelt et al. (145)

En cuanto a la aplicación de tecnologías basadas en CRISPR-Cas en pacientes con diferentes patologías cabe mencionar que, en 2016, un equipo de oncólogos chinos de la Universidad de Chengdu fueron los primeros en experimentar con humanos. Su estudio consistió en inyectar células modificadas mediante técnicas CRISPR-Cas9 en un paciente con cáncer de pulmón no microcítico metastásico como parte de un ensayo clínico. Esta actuación causó polémica entre la comunidad investigadora (Ver apartado 7). (146) (147)

La beta-talasemia y la anemia de células falciformes son dos patologías que han creado gran expectación dado su posible tratamiento con las tecnología CRISPR-Cas. Es por ello que varias entidades buscan embarcarse en el primer ensayo clínico en humanos para estas enfermedades: CRISPR Therapeutics® se encuentra en fases precoces de comenzar un estudio para la corrección de la beta-talasemia y la anemia de células falciformes (148). La Escuela de Medicina de la Universidad de Stanford también planea iniciar ensayos clínicos sobre la anemia de células falciformes usando técnicas CRISPR en humanos (149). De hecho, existe un ensayo clínico en fase de reclutamiento que busca recoger las inquietudes y conocimientos previos de los pacientes con anemia de células falciformes sobre la tecnología CRISPR-Cas. (150)

La base de datos de ensayos clínicos ClinicalTrials.gov recoge en la actualidad 12 estudios experimentales basados en CRISPR-Cas aún en fase piloto o de reclutamiento. 11 son ensayos clínicos de equipos científicos de China y 1 de Estados Unidos. Las patologías que abordarán dichos estudios son diversas: neoplasias asociadas a VPH, infección por VIH, mieloma múltiple, melanoma, sarcomas, gastroenteritis, cáncer de esófago, cáncer de vejiga invasivo, cáncer pulmonar, cáncer nasofaríngeo... (151). Muy probablemente esta lista aumente de forma exponencial, en consonancia con los espectaculares avances en el laboratorio de las diversas aplicaciones de CRISPR-Cas.

7.3. Inconvenientes relacionados con el uso de las tecnologías CRISPR-Cas

A pesar de poseer menores fenómenos *off-target* y, a priori, un elevado perfil de seguridad, el sistema CRISPR puede tener reacciones adversas en relación a su administración en humanos. Especialmente en su introducción por virus, es posible que la mutagénesis secundaria a la aplicación de CRISPR-Cas genere mutantes de escape resistentes más patogénicos. (135) (152)

Los fenómenos *off-target* de CRISPR-Cas son escasos y pueden reducirse en varios órdenes de magnitud aplicando las tecnologías ya descritas anteriormente. No obstante, para poder ejercer una terapia *in vivo* segura, estos fenómenos deben ser reducidos al máximo, dado que cualquier indel en un locus no deseado podría desencadenar un fenómeno de carcinogénesis (152). Un estudio de Fu et al. advirtió de estos fenómenos de mutagénesis fuera de diana, concluyendo que la especificidad de Cas9 para aplicaciones terapéuticas necesita ser mejorada y bien definida para evitar fenómenos de *mismatch*. (153)

Uno de los contratiempos más recientes en la aplicación de CRISPR-Cas en humanos ha sido documentado en el estudio de Matthew H. Porteus. Dicho estudio, elaborado por la Universidad de Stanford, busca tratar la anemia de células falciformes con la tecnología CRISPR-Cas (previamente mencionado) (149). En las fases precoces del estudio descubrieron que hasta un 79% de los testados poseían anticuerpos contra SaCas9, y un 65% contra SpCas9. Se teoriza que quizás la interacción, infecciosa o no, con los microorganismos nativos puede generar algún tipo de inmunidad en caso de reexposición a los mismos (154) (155) (156). Una perspectiva esperanzadora enuncia que Cas9 podría no ser expuesta de forma directa al torrente sanguíneo, sino que podría ir encapsulada en vectores virales, evitando la respuesta inmune (155). Sin embargo, como mencionado en apartados previos, los vectores virales tienen sus limitaciones. Otra alternativa supondría utilizar nucleasas de Cas provenientes de microorganismos con los que sea más difícil haber tenido exposición previa.

8. IMPLICACIONES ÉTICAS DE LA APLICACIÓN DEL SISTEMA CRISPR-CAS

La revista *Nature* enunciaba en 2015 que CRISPR era el mayor hallazgo en la biología desde el descubrimiento de la PCR (157). A pesar de que en un inicio su función era desconocida y su estudio estaba restringido a unos pocos grupos de científicos, la eclosión al popularizarse multiplicó las publicaciones científicas al respecto (**Tabla 4**). A raíz de tal “democratización” de la edición genética, la progresión en los campos de estudio fue exponencial: se pasó de estudios moleculares a técnicas *ex vivo*, a modelos animales, a modelos celulares a partir de células de pacientes, a edición genética de embriones humanos... Todo ello facilitado por la accesibilidad de una técnica simple, al alcance de la gran mayoría de laboratorios.

La facilidad implícita del mecanismo de acción abre puertas a la imaginación y la inventiva de los investigadores, permitiendo explorar y soñar horizontes terapéuticos inimaginables hasta el momento: curar enfermedades genéticas, producir nuevos fármacos o tratar enfermedades tan agresivas como el cáncer, entre otros muchos usos.

Por otro lado, ¿dónde está el límite de la edición genética? La posibilidad futura de realizar cambios “a la carta” sobre caracteres puede variar desde la erradicación genética de enfermedades graves (algo *a priori* deseable), a escoger fenotipos concretos (banalidades como la talla o el color de ojos), lo que puede desequilibrar los pilares de la moralidad y ética de estas técnicas, haciendo complejo delimitar su campo de acción: “¿dónde y hasta cuánto?”. Dichas preguntas se tornan más complejas y oscuras al encuadrarlas en el contexto de países con regímenes opacos o extremistas.

Debido a la rápida escalada de ambición en las tecnologías CRISPR, Baltimore et al. publicaron en 2015 una carta firmada por los investigadores más relevantes del momento del ámbito CRISPR. (50)

En aquella carta delimitaron un marco de trabajo ético en el que desglosaron unos interesantes pasos a seguir en la edición genética (50):

- 1) Intentar disuadir a países con normas laxas con respecto a la edición de líneas germinales.
- 2) Crear fóruns científicos de debate conformados por expertos. (158)
- 3) Favorecer la investigación y transparencia entre equipos de investigación.
- 4) Crear un grupo representante global de la técnica formado por todo tipo de expertos.

Quizás una de las mayores preocupaciones debería ser el arma de doble filo que supone la accesibilidad de este método, pudiendo ser utilizado por países que, como enunciaban Baltimore et al., no posean un control estricto de la ética de sus investigaciones.

Nos encontramos ante un debate de voces alentadores versus opiniones más moderadas con respecto a la ampliación de estas técnicas al público general. Carl June, especialista en inmunoterapia, a raíz de los primeros ensayos clínicos en humanos enunció la frase “*Creo que esto va a disparar un Sputnik 2.0*” (147), en referencia a la escalada entre las potencias china y estadounidense en las aplicaciones de las tecnologías CRISPR. Por otro lado, voces más conservadoras, como la de Edward Lanphier, presidente de *Alliance for Regenerative Medicine*, declaraban a la revista *Nature* que los embriones humanos no deberían ser modificados ni siquiera en investigación debido a la posible explotación de ese campo en cambios genéticos banales (como, por ejemplo, el cambio del color de ojos) (159). Otros investigadores, como George Church (Escuela Médica de Harvard), creen que la edición de embriones debe esperar a tener una seguridad mayor a nivel clínico, pero la experimentación con ellos no debería generar problemas (159). Voces relevantes, como el genetista premiado con el Nobel (160) Craig Mello, también abogan por la experimentación sobre líneas celulares germinales con el fin de proteger a los humanos de enfermedades graves. (159)

¿Hasta qué punto la elaboración de cambios permanentes en embriones podría condicionar la herencia genética humana? Alterar las líneas germinales y enriquecer unas facetas genóticas en detrimento de otras podría causar, por ejemplo, desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (161). Las enfermedades genéticas por sí mismas son condiciones genéticas no deseables. No obstante, sabemos que la presencia de ciertos alelos deletéreos en la población se debe a su efecto positivo en la salud cuando se encuentran enmascarados en heterocigosis (la inmensa mayoría). Por otra parte, desconocemos hasta qué punto variaciones genéticas obtenidas con la tecnología CRISPR-Cas acarrearían cambios genéticos secundarios en un seguimiento dilatado en el tiempo. En defensa del sistema CRISPR-Cas, las ediciones son tremendamente específicas, preservando al máximo el genoma original.

Desde un punto de vista positivo cabe mencionar otros campos de acción de la tecnología CRISPR-Cas, como es la industria alimentaria. Ella puede beneficiarse de estas técnicas generando organismos modificados con una precisión milimétrica sin apenas cambios sobre el genoma base del organismo. Esto podría facilitar la elaboración de

alimentos genéticos modificados de gran seguridad y biosimilaridad a sus originales (162). Todo ello conllevaría un acceso más universalizado y seguro a la alimentación, aislando de la ecuación variables como las plagas, déficits vitamínicos, bajos poderes nutricionales... etc.

La investigación biomédica rara vez se ha visto limitada por el *zeitgeist*, buscando siempre ampliar el conocimiento de la ciencia. La edición genética es un arma de doble filo, si bien los pros parecen más prometedores que los contras. Es posible que nos encontremos ante un punto de inflexión de la edición genética, algo que hacía años que no se daba.

¿Debemos tomar partido en pos de la investigación biomédica más radical? (radical en el sentido de la raíz del problema). ¿Debemos comedir nuestros pasos? Quizás una aproximación intermedia, basada en una legislación universal, supervisada por un grupo de expertos (tanto médicos, como científicos, como corporativos) que compongan una entidad de regulación y supervisión de estudios internacional, pueda arrojar luz y garantizar un correcto desarrollo de la ciencia a través del diálogo.

El descubrimiento de CRISPR-Cas fue un claro ejemplo del buen funcionamiento y la coordinación entre equipos de investigación de diferentes países. El desarrollo de sus técnicas no debería tender al aislacionismo o una “guerra de patentes” (163) (164), sino a una colaboración global.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Skoglund P, Ersmark E, Palkopoulou E, Dalén L. Ancient Wolf Genome Reveals an Early Divergence of Domestic Dog Ancestors and Admixture into High-Latitude Breeds. *Current Biology*. 2015 June; 25:1515-1519.
2. Watson JD, Crick FHC. Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature*. 1953 April; 171(4356).
3. Pray LA. Discovery of DNA Structure and Function: Watson and Crick. [Online].; 2008 [cited 2017 11 21]. Available from: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/discovery-of-dna-structure-and-function-watson-397>
4. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 February; volume 409, pages 860-921.
5. Venter CJ, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG. The Sequence of the Human Genome. *Science*. 2001 February; 291(5507):1304-51.
6. Genome Project Information Archive. [Online]. [cited 2017 11 23]. Available from: http://web.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/index.shtml
7. Griffiths A, Miller J, Suzuki D. Mendel's experiments. In *An Introduction to Genetic Analysis*. 7th edition. New York: W.H. Freeman; 2000.
8. Griffith F. The Significance of Pneumococcal Types. *Journal of Hygiene*. 1928; 27(113-59).
9. Avery O, MacLeod C, McCarthy M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *Journal of Experimental Medicine*. 1944 February; 79(2): p. 137-158.
10. Danna K, Nathans D. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 December; 68(12):2913-7.
11. Smith H, Wilcox K. A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *Journal of Molecular Biology*. 1970 July; 51(2):379-91.
12. Arber W. Host-controlled modification of bacteriophage. *Annual Review of Microbiology*. 1965; 19:365-78.
13. Jaenisch R, Mintz B. Simian Virus 40 DNA Sequences in DNA of Healthy Adult Mice Derived from Preimplantation Blastocysts Injected with Viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*. 1974 April; 71(4):1250-1254.
14. Bevan MW, Flavell RB, Chilton MD. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*. 1983 July; 304, 184-187.

15. Mojica FJM, Rodriguez-Valera F. The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *The FEBS Journal*. 2016 May; (283):3162-3169.
16. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*. 2014 June; 157(6):1262-1278.
17. Jansen R, van Embden JDA, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*. 2002; 43(6) 1565-1575.
18. Barrangou R, van der Oost J. CRISPR-Cas Systems. RNA-Mediated Adaptative Immunity in Bacteria and Archaea. 1010079783642346576th ed. Heidelberg SVB, editor.; 2013.
19. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide Sequence of the *iap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia coli*, and Identification of the Gene Product. *Journal of Bacteriology*. 1987 December; 169(12):5429-5433.
20. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guide DNA Endonuclease in Adaptative Bacterial Immunity. *Nature*. 2012 August; 337(6096):816-821.
21. MeSH. NCBI. [Online].; 1989 [cited 2017 November 24]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68005818>
22. AB NoNM. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1978. [Online].; Web. 21 Nov 2017. Available from: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1978/
23. Cohen S, Chang A, Boyer H, Helling R. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*. 1973 November; 70 (11): 3240-4.
24. Goeddel DD, Kleid DG, Bolivar F, Heyneker HL, Yansura DG, Crea R, et al. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979 January; 76(1).
25. Genentech, Group R. First Successful Laboratory Production of Human Insulin Announced. [Online].; Sep 6, 1978 [cited 2017 11 23]. Available from: <https://www.gene.com/media/press-releases/4160/1978-09-06/first-successful-laboratory-production-o>
26. Brinster R, Chen HY, Trumbauer, M. , Senear A, Warren R, Palmiter RD. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell*. 1981; 21 (1 Pt 2): 223-231.

27. World Health Organization. WHO | Vaccines. [Online].; 2013 [cited 2017 11 23]. Available from:
http://www.who.int/biologicals/vaccines/Hepatitis_B/en/
28. Yin H, Kauffman KJ, Anderson DG. Delivery technologies for genome editing. *Nature Reviews | Drug Discovery*. 2017 June; 16 (6):387-399.
29. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008 September; 118(9):3132-3142.
30. MeSH MSH. NCBI. [Online].; 1995 [cited 2018 Mayo 5]. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=gene+targeting>
31. Mojica FJ, Almendros C. El descubrimiento del sistema CRISPR-Cas. *Investigación y Ciencia*. 2017 October; 493: 20-30.
32. Wang L, Li F, Dang L, Liang C, Wang C, He B, et al. In Vivo Delivery Systems for Therapeutic Genome Editing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016 April; 17, 626.
33. Check E. Gene therapy: A tragic setback. *Nature*. 2002 November; 420, 116-118.
34. Woods N, Bottero V, Schmidt M, von Kalle C, Verma I. Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. *Nature*. 2006 April; 27;440(7088):1123.
35. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*. 2000 April; 288(5466):669-72.
36. Herzog W. Gene Therapy for SCID-X1: Round 2. *Molecular Therapy*. 2010 November; 18(11): 1891.
37. Stolberg SG. Scientists Defend Suspended Gene Therapy. *The New York Times*. 2000 February.
38. Wilson JM. A History Lesson for Stem Cells. *Science*. 2009 May; 324(5928): p. 727-728.
39. Ain QU, Chung JY, Kim YH. Current and future delivery systems for engineered nucleases: ZFN, TALEN and RGEN. *Journal of Controlled Release | Elsevier | ScienceDirect*. 2015; 205:120-127.
40. Sibbald B. Death but one unintended consequence of gene-therapy trial. *CMAJ*. 2001 May; 164(11): 1612.
41. Marshall E. Gene Therapy Death Prompts Review of Adenovirus Vector. *Science*. 1999 December; 286(5448):2244-2245.

42. Wang AY, Peng PD, Erhardt A, StormMark TA, Kay A. Comparison of Adenoviral and Adeno-Associated Viral Vectors for Pancreatic Gene Delivery In Vivo. *Hum Gene Ther.* 2004 July; 15(4):405-13.
43. Komor AC, Badran AH, Liu DR. CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell.* 2017 January; 168(1-2):20-36.
44. Finn J, Smith A, Patel M, Shaw L, Youniss M, van Heteren J, et al. A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing. *Cell Rep.* 2018 February; 22(9):2227-2235.
45. Lee K, Conboy M, Min Park H, Jiang F, Jin Kim H, Dewitt MA, et al. Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair. *Natures Biomedical.* 2017 October; 1, pages 889-901.
46. Nature. Biolistics. [Online].; 2018. Available from: <https://www.nature.com/subjects/biolistics>
47. Svitashv S, Schwartz C, Lenderts B, Young JJ, Cigan AM. Genome editing in maize directed by CRISPR–Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Communications.* 2016 November; 13274 (2016).
48. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triprenuclear zygotes. *Protein & Cell.* 2015 Mayo; 6 (5):363-372.
49. Reyes AP, Lanner F. Towards a CRISPR view of early human development: applications, limitations and ethical concerns of genome editing in human embryos. *Development.* 2017 January; 144(1):3-7.
50. Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G, et al. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science.* 2015 March; 348(6230):36-8.
51. Montoliu José L. La técnica CRISPR-Cas9: Fundamentos y aplicaciones. 10 March 2016, Madrid. Mesa redonda sobre "Edición Genómica"; RANF; sitio web: <https://www.youtube.com/watch?v=UqxDCv5BexU&t=1968s&index=94&list=WL>
52. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes K. Non-Homologous End Joining (NHEJ). [Online].; 2015 [cited 2017 November 24]. Available from: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?scale=1.0&query=&map=ko03450&scale=1.22&auto_image=&show_description=hide&multi_query=
53. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes K. Homologous Recombination. [Online].; 2016 [cited 2017 November 24]. Available from: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko03440

54. Doudna J. iBiology | Genome Engineering with CRISPR-Cas9: Birth of a Breakthrough Technology. [Online].; 2015 [cited 2017 November 25]. Available from: <https://www.ibiology.org/genetics-and-gene-regulation/crispr-cas9/>
55. Xenbase. New genome editing technologies. [Online].; 2017 [cited 2017 November 25]. Available from: <http://www.xenbase.org/other/static/CRISPR.jsp>
56. Gaj T, Gersbach CA, Barbas III CF. ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*. 2013 July; 31(7):397-405.
57. Marrafani LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*. 2015 October; 526(7571):55-61.
58. Keen EC. A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. *Bioessays*. 2015 January; 37(1):6-9.
59. Suttle C. The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities. *Microbial ecology*. 1994 September; 28(2):237-43.
60. Luo E, Aylward FO, Mende DR, DeLong EF. Bacteriophage Distributions and Temporal Variability in the Ocean's Interior. *mBio*. 2017 November; 8(6).
61. Brussaard C, Wilhelm S, Thingstad F, Weinbauer M, Bratbak G, Haldal M, et al. Global-scale processes with a nanoscale drive: the role of marine viruses. *The ISME journal*. 2008 June; 2(6):575-8.
62. Danovaro R, Corinaldesi C, Dell'anno A, Fuhrman J, Middelburg J, Noble R, et al. Marine viruses and global climate change. *FEMS microbiology reviews*. 2011 November; 35(6):993-1034.
63. Embden JDA, Hermans PWM, Soolingen Dv. Characterization of a Major Polymorphic Tandem Repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and Its Potential Use in the Epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium gordonae*. *Jornal of Bacteriology*. 1992 June; 174 (12) 4157-4165.
64. Jansen R, Embden Van J, Gaastra W, Schouls L. Identification of a Novel Family of Sequence Repeats among Prokaryotes. *Omic: a journal of integrative biology*. 2002; 6. 23-33.
65. Nelson KE, Mongodin EF, Selengut J, Haft DH. A Guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes. *PLOS: Computational Biology*. 2005 November; 1(6).
66. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*. 2007 March; 315(1709-1712).

67. Marraffini L, Sontheimer E. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in Staphylococci by targeting DNA. *Science*. 2008; 322:1843-1845.
68. Mojica F, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiol*. 2009; 155:733-740.
69. Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovic M, Ressel S, Charpentier E. The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*. 2018 March; 172, Issue 6, 1239-1259.
70. Jackson SA, McKenzie RE, Fagerlund RD, Kieper SN, Fineran PC, Brouns SJJ. CRISPR-Cas: Adapting to change. *Science*. 2016 April; 356(6333).
71. Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology*. 2017; 37:67-78.
72. Makarova KS, Zhang F, Koonin EV. SnapShot: Class 1 CRISPR-Cas Systems. *Cell*. 2017 February; 168 (5).
73. InterPro. InterPro: protein sequence analysis & classification (Cascade). [Online].; 2018 [cited 2018 January 1]. Available from: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR006482?q=cas7>
74. Oost Jvd, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2014 June; 12(7):479-92.
75. InterPro. InterPro: protein sequence analysis & classification (RAMP). [Online].; 2018 [cited 2018 January 1]. Available from: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR005537>
76. Makarova KS, Zhang F, Koonin EV. SnapShot: Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Cell*. 2017 February; 168 (5).
77. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konemann S, Dohmae N, Ishitani R, et al. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*. 2014 February; 156, 935-949.
78. Leon LM, Mendoza SD, Bondy-Denomy J. How Bacteria Control the CRISPR-Cas Arsenal. *Current Opinion in Microbiology*. 2018; 42:87-95.
79. Barrangou R, Horvath P. A decade of discovery: CRISPR functions and applications. *Nature Microbiology*. 2017 June; 2.
80. Zhang F. CRISPR: The democratization of gene editing. [Online]. Available from: http://www.sciencemag.org/sites/default/files/custom-publishing/documents/CRISPR-Cas9_booklet_LowRes.pdf
81. Pennisi E. The CRISPR Craze. *Science*. 2013 August; 341(6148):833-6.

82. Mitsunobu H, Teramoto J, Nishida K, Kondo A. Beyond Native Cas9: Manipulating Genomic Information and Function. *Trends in Biotechnology*. 2017 October; 35 (10) 983-996.
83. Ran F, Cong L, Yan W, Scott D, Gootenberg J, Kriz A, et al. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. 2015 April; 9;520(7546):186-91.
84. Abudayyeh O, Gootenberg J, Essletzbichier P, Han S, Joung J, Belanto J, et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*. 2017 October; 550(7675):280-284.
85. Zetsche B, Gootenberg J, Abudayyeh O, Slaymaker I, Makarova K, Essletzbichler P, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. 2015 October; 22;163(3):759-71.
86. Wang F, Qi LS. Applications of CRISPR Genome Editing in Cell Biology. *Trends in Cell Biology*. 2016 September; 26(11):875-888.
87. Kim D, Kim J, Hur J, Been K, Yoon S, Kim J. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nat Biotechnol*. 2016 August; 34(8):863-8.
88. Fu Y, Sander J, Reyon D, Cascio V, Joung J. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*. 2014 March; 32(3):279-284.
89. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Feng Z. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. 2016 January; 351 (6268) 84-88.
90. Chen JS, Dagdas YS, Kleintiver BP, Welch MM, Sousa AA, Harrington LB, et al. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature*. 2017 October; 550, 407-4010.
91. Mitsunobu H, Teramoto J, Nishida K, Kondo A. Beyond Native Cas9: Manipulating Genomic Information and Function. *Trends in Biotechnology*. 2017 October; 35 (10) 983-996 (doi:10.1016/j.tibtech.2017.06.004).
92. Ran F, Hsu P, Lin C, Gootenberg J, Konermann S, Trevino A, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013 September; 12;154(6):1380-9.
93. Wyvekens N, Topkar V, Khayter C, Joung J, Tsai S. Dimeric CRISPR RNA-Guided FokI-dCas9 Nucleases Directed by Truncated gRNAs for Highly Specific Genome Editing. *Human Gene Therapy*. 2015 July; 26(7):425-31.
94. Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology* volume. 2014 April; 32, pages 569-576.
95. Bikard D, Jiang W, Samai P, Hochschild A, Zhang F, Marraffini LA. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Research*. 2013 August; 41(15):7429-37.

96. Thakore P, D'Ippolito AM, Song L, Safi A, Shivakumar NK, Kabadi AM, et al. Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. *Nature Methods*. 2015 October; 12, 1143-49.
97. Lawhorn IEB, Ferreira JP, Wang CL. Evaluation of sgRNA Target Sites for CRISPR-Mediated Repression of TP53. *PLOS | Public Library of Science*. 2014 November; 14;9(11):e113232.
98. Gilbert L, Larson M, Morsut L, Liu Z, Brar G, Torres S, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*. 2013 July; 154(2):442-51.
99. Tanenbaum M, Gilbert L, Qi L, Weissman J, Vale R. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*. 2014 October; 23;159(3):635-46.
100. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*. 2015 January; 517, pages 583-588.
101. Hilton I, D'Ippolito A, Vockley C, Thakore P, Crawford G, Reddy T, et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature biotechnology*. 2015 May; 33(5):510-7.
102. Choudhury SR, Cui Y, Lubecka K, Stefanska B, Irudayaraj J. CRISPR-dCas9 mediated TET1 targeting for selective DNA demethylation at BRCA1 promoter. *Oncotarget*. 2016 June; 7(29)46546-58.
103. McDonald JI, Celik H, Rois LE, Fishberger G, Fowler T, Rees R, et al. Reprogrammable CRISPR/Cas9-based system for inducing site-specific DNA methylation. *Biology Open*. 2016; 5: 866-874.
104. Huang Y, Su J, Lei Y, Brunetti L, Gundry M, Zhang X, et al. DNA epigenome editing using CRISPR-Cas SunTag-directed DNMT3A. *Genome Biol*. 2017 September; 18(1):176.
105. Chen B, Huang B. Imaging genomic elements in living cells using CRISPR/Cas9. *Methods in Enzymology*. 2014; 546:337-54.
106. Citorik RJ, Mimee M, Lu TK. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nature Biotechnology*. 2014 September; 32, pages 1141-1145.
107. Spanjaard B, Hu B, Mitic N, Olivares-Chauvet P, Janjuha S, Ninov N, et al. Simultaneous lineage tracing and cell-type identification using CRISPR-Cas9-induced genetic scars. *Nature Biotechnology*. 2018 April; 36, 469-473.
108. Oliveros J, Franch M, Tabas-Madrid D, San-León D, Montoliu L, Cubas P, et al. Breaking-Cas-interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. *Nucleic Acids Research*. 2016 July; 8;44(W1):W267-71.

109. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006 August; 126 (4) 663-676.
110. Xie F, Ye L, Chang JC. Seamless gene correction of b-thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome Research*. 2014 August; 24(9): 1526-1533.
111. Schwank r, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, et al. Functional Repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in Intestinal Stem Cell Organoids of Cystic Fibrosis Patients. *Cell*. 2013 December; 13, 653-658.
112. Firth AL, Menon T, Parker GS, Khanna A, Gage FH, Verma IM. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Reports*. 2015 September; 12, 1385-1390.
113. Nelson CE, Robinson-Hamm JN, Gersbach CA. Genome engineering: a new approach to gene therapy for neuromuscular disorders. *Nature Reviews | Neurology*. 2017 November; 13(11):647-661.
114. Vieitez I, Gallano P, González-Quereda L, Borrego S, Marcos I, Millán J, et al. Mutational spectrum of Duchenne muscular dystrophy in Spain: Study of 284 cases. *Neurología*. 2017 July; 32(6):377-385.
115. Li H, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, et al. Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports*. 2015 January; 4(1):143-54.
116. Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Majoros WH, Reddy TE, Gersbach CA. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nature Communications*. 2015 February; 6(6:6244).
117. Bassuk AG, Zheng A, Li Y, Tsang SH, Mahajan VB. Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells. *Scientific Reports*. 2016 January; 6:19969.
118. Chang CW, Lai YS, Westin E, hodadadi-Jamayran A, Pawlik KM, Lamb, Jr. LS, et al. Modeling Human Severe Combined Immunodeficiency and Correction by CRISPR/Cas9-Enhanced Gene Targeting. *Cell Reports*. 2015 September; 12, 1-10.
119. Xue W, Chen S, Yin H, Tammela T, Papagiannakopoulos T, Joshi NS, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*. 2014 October; 514(7522): 380-384.
120. Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nature Medicine*. 2015 January; 21(3):256-62.

121. Drost J, van Jaarsveld RH, Ponsoen B, Zimmerlin C, van Boxtel R, Buijs A, et al. Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature*. 2015 May; 521(7550):43-7.
122. Drost J, van Boxtel R, Blokzijl F, Mizutani T, Sasaki N, Sasselli V, et al. Use of CRISPR-modified human stem cell organoids to study the origin of mutational signatures in cancer. *Science*. 2017 September; 358(6360):234-238.
123. Maddalo D, Manchado E, Concepcion CP, Bonetti C, Vidigal JA, Han YC, et al. In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature*. 2014 December; 516, pages 423-427.
124. Han S, Guo J, Liu Y, Zhang Z, He Q, Li P, et al. Knock out CD44 in reprogrammed liver cancer cell C3A increases CSCs stemness and promotes differentiation. *Oncotarget*. 2015 October; 6(42):44452-44465.
125. Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, Somerville RP, Carpenter RO, Stetler-Stevenson M. Chemotherapy-Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Indolent B-Cell Malignancies Can Be Effectively Treated With Autologous T Cells Expressing an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor. *Journal of Clinical Oncology*. 2015 February; 33(6): 540-549.
126. EUROPA PRESS. La OMS alerta de que los nuevos casos de VIH han aumentado un 7% en Europa. [Online].; 2016 [cited 2018]. Available from: <http://www.elmundo.es/salud/2016/11/29/583d6b9146163fdf5c8b4665.html>
127. Huang Z, Tomitaka A, Raymond A, Nair M. Current application of CRISPR/Cas9 gene-editing technique to eradication of HIV/AIDS. *Gene Therapy*. 2017 July; 24(7):377-384.
128. Hou P, Chen S, Wang S, Yu X, Chen Y, Jiang M, et al. Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. *Scientific Reports*. 2015 October; 5:15577.
129. Ye L, Wang J, Beyer A, Cradick T, Qi Z, Chang J, et al. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 Δ 32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014 July; 111(26):9591-6.
130. Mandal P, Ferreira L, Collins R, Meissner T, Boutwell C, Friesen M, et al. Efficient Ablation of Genes in Human Hematopoietic Stem and Effector Cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell*. 2014 November; 15, 643-652.
131. Kaminski R, Chen Y, Fischer T, Tedaldi E, Napoli A, Zhang Y, et al. Elimination of HIV-1 Genome from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Scientific Reports*. 2016 March; 6:22555.
132. Yin C, Zhang T, Qu X, Zhang Y, Putatunda R, Xiao X, et al. In Vivo Excision of HIV-1 Provirus by saCas9 and Multiplex Single-Guide RNAs in Animal Models. *Molecular Therapy*. 2017 May; 25(5): 1168-1186.

133. Wang J, Quake SR. RNA-guided endonuclease provides a therapeutic strategy to cure latent herpesviridae infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 September; 111(36): 13157–13162.
134. Hu Z, Yu L, Zhu D, Ding W, Wang X, Zhang C, et al. Disruption of HPV16-E7 by CRISPR/Cas System Induces Apoptosis and Growth Inhibition in HPV16 Positive Human Cervical Cancer Cells. *BioMed Research International*. 2014; 612823.
135. van Diemen FR, Kruse EM, Hooykaas MJG, Bruggeling CE, Schürch AC, van Ham PM, et al. CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing of Herpesviruses Limits Productive and Latent Infections. *PLoS Pathog*. 2016 June; 12(6): e1005701.
136. Lin S, Yang H, Kuo Y, Liu C, Yang T, Sung K, et al. The CRISPR/Cas9 System Facilitates Clearance of the Intrahepatic HBV Templates In Vivo. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014 August; 3:e186.
137. Dong C, Qu L, Wang H, Wei L, Dong Y, Xiong S. Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral Research*. 2015 June; 118:110-7.
138. Dong Y, Simoes ML, Marois E, Dimopoulos G. CRISPR/Cas9 -mediated gene knockout of *Anopheles gambiae* FREP1 suppresses malaria parasite infection. *PLoS Pathog*. 2018 March; 14(3): e1006898.
139. Hammond A, Galizi R, Kyrou K, SImoni A, Siniscalchi C, Katsanos D, et al. A CRISPR-Cas9 Gene Drive System Targeting Female Reproduction in the Malaria Mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat Biotechnol*. 2015 December; 34(1): 78-83.
140. Mullin E. MIT Technology Review "CRISPR in 2018: Coming to a Human Near You". [Online].; 2017 [cited 2018 4 4]. Available from: <https://www.technologyreview.com/s/609722/crispr-in-2018-coming-to-a-human-near-you/>
141. Brown KV. Gizmodo "In 2018, We Will CRISPR Human Beings". [Online].; 2017 [cited 2018 4 4]. Available from: <https://gizmodo.com/in-2018-we-will-crispr-human-beings-1821540150>
142. Tang L, Zeng Y, Du H, Gong M, Peng J, Zhang B, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Mol Genet Genomics*. 2017 February; 292(3):525-533.
143. Liang P, Ding C, Sun H, Xie X, Xu Y, Zhang X, et al. Correction of beta-thalassemia mutant by base editor in human embryos. *Protein & Cell*. 2017 September; 8, Issue 11, pp 811-822.
144. Ma H, Martí-Gutierrez N, Park SW, Wu J, Lee Y, Suzuki K, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*. 2017 August; 548, pages 413-419.
145. Esvelt KM, Smidlet AL, Catteruccia F, Church GM. Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. *eLife*. 2017 July; 3: e03401.

146. Lu Y. U.S. National Library of Medicine "PD-1 Knockout Engineered T Cells for Metastatic Non-small Cell Lung Cancer". [Online].; 2016 [cited 2018 4 4]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02793856>
147. Cyranoski D. Nature "CRISPR gene-editing tested in a person for the first time". [Online].; 2016 [cited 2018 4 4]. Available from: <https://www.nature.com/news/crispr-gene-editing-tested-in-a-person-for-the-first-time-1.20988>
148. CRISPR Therapeutics. "CRISPR Therapeutics Submits First Clinical Trial Application for a CRISPR Gene-Edited Therapy, CTX001 in β -thalassemia". [Online].; 2018 [cited 2018 4 4]. Available from: <http://ir.crisprtx.com/phoenix.zhtml?c=254376&p=irol-newsArticle&ID=2321577>
149. Mullin E. MIT Technology Review "Sickle-Cell Patients See Hope in CRISPR". [Online].; 2017 [cited 2018 4 4]. Available from: <https://www.technologyreview.com/s/608641/sickle-cell-patients-see-hope-in-crispr/>
150. National Human Genome Research Institute (NHGRI). U.S National Library of Medicine "Examining the Knowledge, Attitudes, and Beliefs of Sickle Cell Disease Patients, Parents of Patients With Sickle Cell Disease, and Providers Towards the Integration of CRISPR in Clinical Care". [Online].; 2018 [cited 2018 4 4]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03167450?term=CRISPR&draw=3&rank=3>
151. Medicine USNLo. Clinical Trials containing the word "CRISPR". [Online].; 2018 [cited 2018 4 4]. Available from: https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=CRISPR&age_v=&gndr=&type=Intr&rslt=&Search=Apply
152. Soppe JA, Lebbink RJ. Antiviral Goes Viral: Harnessing CRISPR/Cas9 to Combat Viruses in Humans. *Trends in Microbiology*. 2017 October; 25(10):833-850.
153. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*. 2013 June; 31(9): 822-826.
154. Montoliu L. Naukas "Inesperado contratiempo para las terapias g3nicas basadas en CRISPR". [Online].; 2018 [cited 2018 4 4]. Available from: <http://naukas.com/2018/01/07/inesperado-contratiempo-las-terapias-genicas-basadas-crispr/>
155. Charlesworth CT, Deshpande PS, Dever DP, Dejene B, Gomez-Ospina N, Mantri S, et al. Identification of Pre-Existing Adaptive Immunity to Cas9 Proteins in Humans. *bioRxiv*. 2018 January; (<https://doi.org/10.1101/243345>).

156. Zhang S. The Atlantic "You May Already Be Immune to CRISPR". [Online].; 2018 [cited 2018 4 4]. Available from:
<https://www.theatlantic.com/science/archive/2018/01/crispr-humans-immune-system/549974/>
157. Ledford H. Nature "CRISPR, the disruptor". [Online].; 2015. Available from:
<https://www.nature.com/news/crispr-the-disruptor-1.17673>
158. ARRIGE. Association for Responsible Research and Innovation in Genome Editing. [Online].; 2018. Available from:
<http://arrige.org>
159. Cyranoski D. Embryo editing divides scientist. Nature. 2015 March; 519:272.
160. AB NoNM. Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006. [Online].; 2006. Available from:
https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/index.html
161. Nature. Nature Education "Hardy-Weinberg equilibrium". [Online].; 2018. Available from:
<https://www.nature.com/scitable/definition/hardy-weinberg-equilibrium-122>
162. Dinerstein C. CRISPR-Created Foods Are Different Than GMOs. It's Wrong For Anti-GMO Activists To Pretend They're Not. American Council on Science and Health. 2018 April.
163. Ledford H. Nature "Bitter CRISPR patent war intensifies". [Online].; 2017. Available from:
<https://www.nature.com/news/bitter-crispr-patent-war-intensifies-1.22892>
164. Valenzuela A. El independiente "La guerra de patentes por el invento científico del siglo". [Online].; 2017. Available from:
<https://www.elindependiente.com/futuro/2017/11/19/la-guerra-de-patentes-por-el-invento-cientifico-del-siglo/>

Fuentes no referenciadas:

165. Kurzgesagt. Genetic Engineering Will Change Everything Forever – CRISPR. [Online].; 2016 [cited 2017 December 30]. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=jAhjPd4uNFY>
166. Mojica FJ. Sistemas CRISPR-Cas, una revolución biotecnológica con origen bacteriano. [Online].; 2016 [cited 2017 12 30 [XIII edición del ciclo Encuentros con la Ciencia]. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=GOK6FkfmHdQ&t=3s&list=WL&index=83>
167. Didovyk A, Borek B, Tsimring L, Hasty J. Transcriptional regulation with CRISPR-Cas9: principles, advances and applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016 40:177-184.
168. Fellmann C, Gowen BH, Lin PC, Doudna JA, Corn JE. Cornerstones of CRISPR-Cas in drug discovery and therapy. *Nature Reviews | Drugs Discovery*. 2016 December.
169. Kazlauskienė M, Kostiuik G, Venclovas Č, Tamulaitis G, Siksnys V. A cyclic oligonucleotide signaling pathway in type III CRISPR-Cas systems. *Science*. 2017 June.
170. Khan FA, Pandupuspitasari S, Chung-Jie H, Ao Z, Jamal M, Zohaib A, et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: a cure for cancer and other genetic diseases. *Oncotarget*. 2016 May; 7(32):52541-52552.
171. Kim JS. Genome editing comes of age. *Nature Protocols*. 2016; 11 (9)1573-1578.
172. Luo J. CRISPR/Cas9: From Genome Engineering to Cancer Drug Discovery. *Trends in Cancer*. 2016 June; 2(6):313-324.
173. Mout R, Ray M, Lee YW, Scaletti F, Rotello VM. In Vivo Delivery of CRISPR/Cas9 for Therapeutic Gene Editing: Progress and Challenges. *Bioconjugate Chemistry*. 2017 March.
174. Niewoehner O, Garcia-Doval , Rostøl JT, Berk C, Schwede F, Bigler L, et al. Type III CRISPR–Cas systems produce cyclic oligoadenylate second messengers. *Nature*. 2017 July; 31;548(7669):543-548.
175. Poon A, Zhang Y, Chandrasekaran A, Phanthong P, Schmid B, Nielsen TT, et al. Modeling neurodegenerative diseases with patient-derived induced pluripotent cell: Possibilities and challenges. *New Biotechnology*. 2017 October; 25;39(Pt B):190-198.
176. Sanjana NE, Wright JB. CRISPR Screens to Discover Functional Noncoding Elements. *Trends in Genetics*. 2016 September; 32(9):526-529.
177. Song M. The CRISPR/Cas9 system: their delivery, in vivo and ex vivo applications and clinical development by startups. *Biotechnology Progress | Cell Culture and Tissue Engineering*. 2017 April; 33(4):1035-1045.

9. AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar este trabajo a todos aquellos divulgadores de la ciencia que admiro. Entre ellos: Hank Green, Michael Stevens y Derek Muller. Por su incesante trabajo investigador y su contagiosa curiosidad.

Quiero hacer mención especial a Tim Blais, que consiguió encender la mecha de mi interés en la materia CRISPR y en multitud de otros ámbitos científicos gracias a su excelente labor de divulgación.

Me gustaría agradecer a mi tutora, la Dra. Matxalen Llosa Blas, su ayuda y sus consejos, así como la impronta que consiguió dejar en mí durante la carrera a través de su excelente docencia.

Por último, quisiera extender mis agradecimientos a mi familia y mi pareja, por ayudarme siempre que lo he necesitado; y a mi amigo Jon Bosque, por su hambre de conocimiento.

I want to dedicate this work to all those science divulgators that I admire. Specially Hank Green, Michael Stevens and Derek Muller. For their incessant research and contagious curiosity.

I want to make special mention to Tim Blais, who managed to ignite my interest in CRISPR and in many other scientific fields thanks to his excellent work of science-divulgation.

I would like to thank my tutor, Dr. Matxalen Llosa Blas, for her help and advice, as well as for the imprint she managed to leave on me during my formation as a student through her excellent teaching.

Finally, I would like to extend my thanks to my family and my girlfriend, for helping me whenever I needed it; and my friend Jon Bosque, for his hunger for knowledge.