



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO FIN DE GRADO

CRISPR-Cas9: UNA REVOLUCIÓN BIOMÉDICA

David Morales Hernández

Grado de Biología

Facultad de Ciencias

Año Académico 2020-21

CRISPR-Cas9: UNA REVOLUCIÓN BIOMÉDICA

David Morales Hernández

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Ciencias

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2020-21

Palabras clave del trabajo:

Enfermedad genética, terapia génica, CRISPR-Cas9.

Nombre Tutor/Tutora del Trabajo: Bernhard Oliver Vögler

Nombre Tutor/Tutora (si procede)

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Resumen

El tratamiento de las enfermedades genéticas es una tarea difícil porque requiere un transfer horizontal de genes a un organismo ya desarrollado. Por este motivo, los diferentes tipos de terapia génica actuales se centran en el uso de virus como vectores que conlleva varios problemas como la inserción no controlada de genes en el genoma, una elevada inmunogenicidad, poca capacidad de carga genética o poca eficacia de transfección. El descubrimiento de las Repeticiones Palindrómicas Agrupadas Regularmente Interespaciadas o CRISPR, que emplean algunas bacterias como sistema inmune, podría convertirse en una nueva tecnología de edición génica para manipular el genoma de manera guiada, evitando los problemas de la terapia génica clásica. Sin embargo, una limitación que comparte con la terapia génica clásica es su incompatibilidad con el tratamiento de enfermedades multigénicas. Aunque todavía no está regulado su uso esta técnica tiene el potencial de revolucionar la terapia génica.

El tractament de les malalties genètiques és una tasca difícil perquè requereix un transfer horitzontal de gens a un organisme ja desenvolupat. Per aquest motiu, els diferents tipus de teràpia gènica actuals se centren en l'ús de virusos com a vectors que comporta diversos problemes com la inserció no controlada de gens en el genoma, una elevada immunogenicitat, poca capacitat de càrrega genètica o poca eficàcia de transfecció. El descobriment de les Repeticions palindròmiques Agrupades Regularment Interespaciades o CRISPR, que donen feina alguns bacteris com a sistema immune, podria convertir-se en una nova tecnologia d'edició gènica per manipular el genoma de manera guiada, evitant els problemes de la teràpia gènica clàssica. No obstant això, una limitació que comparteix amb la teràpia gènica clàssica és la seva incompatibilitat amb el tractament de malalties multigèniques. Tot i que encara no està regulat el seu ús aquesta tècnica té el potencial de revolucionar la teràpia gènica.

The treatment of genetic diseases is a difficult task because it requires a horizontal transfer of genes to an already developed organism. For this reason, the different types of current gene therapy focus on the use of viruses as vectors that entail several problems such as uncontrolled insertion of genes into the genome, high immunogenicity, low genetic carrying capacity or low transfection efficiency. The discovery of the Regularly Interspaced Clustered Palindromic Repeats or CRISPR, which some bacteria use as immune systems, could become a new gene editing technology to manipulate the genome in a guided way, avoiding the problems of classical gene therapy. However, a limitation that it shares with classical gene therapy is its incompatibility with the treatment of multigene diseases. Although its use is not yet regulated, this technique has the potential to revolutionize gene therapy.

Índice

Abreviaciones.....	3
Introducción.....	4
Hipótesis.....	6
Objetivo.....	6
Material y Métodos.....	6
Resultados y Discusión.....	8
Conclusiones.....	24
Bibliografía.....	25

Abreviaciones

$\Delta F508$: mutación de delección de fenilalanina en la posición 508
AAV: Virus Adeno-Asociado
AAV2: AAV serotipo 2
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
BRCA: Gen de Cáncer de Mama
CFTR: Conductancia Transmembrana de Fibrosis Quística
crARN: ARN CRISPR maduro
CRISPR: Repeticiones Palindrómicas Agrupadas Regularmente Interespaciadas
DnaB: Helicasa Replicativa
E. coli: *Escherichia coli*
HDR: Reparación Dirigida por Homología
HERV: Retrovirus Endógeno Humano
HGT: Transferencia Horizontal de Genes
HSPC: Células Madre y Progenitoras Hematopoyéticas
HTgenes: Genes Transferidos Horizontalmente
HTT: Gen de la Huntintina
IBMX: Forskolina, Genisteína e Isobutilmetil Xantina
iPSC: Células Madre Pluripotentes Inducidas
ITR: Repeticiones Terminales Invertidas
LTR: Repeticiones Terminales Largas
MCH: miocardiopatía hipertrófica
Nab: anticuerpos neutralizantes
NCBI: National Center for Biotechnology Information
NHEJ: Unión de Extremos No Homóloga
PAM: motivo adyacente protoespaciador
PD-1: proteína encargada de la muerte celular programada en las células T
rAAV: AAV recombinante
scAAV: AAV autocomplementario
sgARN: ARN guía único
SNP: Polimorfismo de Nucleótido Único
SRSR: Repeticiones Cortas Espaciadas Regularmente
Ssb: Unión de una Sola Hebra
TopB: Topoisomerasa III
tracrARN: crARN trans-activador
VGT: Transferencia de Genes Verticalmente

Introducción

Una enfermedad genética es una patología producida por una mutación o variación en el ADN de un individuo produciéndole diferentes síntomas clínicos dependiendo del sitio específico de dicha mutación o variación. Comúnmente se les denomina enfermedades raras, ya que un elevado número de estas tienen origen genético (González-Lamuño Leguina & García Fuentes, 2008). Sin embargo, para considerar una enfermedad como “rara”, ésta ha de tener una prevalencia menor a 5 casos cada 10000 habitantes (Posada De la Paz et al., 2008), por lo que según esta definición, no todas las enfermedades genéticas se pueden considerar “raras”, un ejemplo es el Síndrome de Down que presenta una casuística superior a la mencionada previamente.

Las variaciones genéticas que causan enfermedades pueden ser muy diferentes a nivel molecular. Una de estas posibles variaciones es la adición de un cromosoma entero, como es el caso en la llamada trisomía 21 del Síndrome de Down, que está caracterizada por la presencia de tres copias del cromosoma 21 en lugar de solo dos. Por el otro lado, el síndrome de Turner es una enfermedad que se caracteriza por la pérdida parcial o total del cromosoma (monosomía) X debida a una incompleta disyunción en la gametogénesis o incluso en la pérdida cromosómica en las fases mitóticas iniciales del feto (Barreda Bonis et al., 2011). Es una enfermedad que afecta sobre todo a mujeres y tiene una prevalencia estimada de 1 entre 3000 de recién nacidas. Estas recién nacidas se les conoce como fetos 45X0, donde solo el 1% de los casos sobreviven al parto y el porcentaje restante sufren abortos espontáneos (Barreda Bonis et al., 2011). Entre los síntomas que se detectan en la infancia, destaca la talla baja, edad ósea retrasada, fallo gonadal o infertilidad entre otros muchos posibles síntomas.

Otra variación genética más típica es la modificación de un solo gen causando una enfermedad monogénica. Un ejemplo clásico de este tipo de defecto es la anemia falciforme, una enfermedad multisistémica, que se caracteriza por la malformación de los glóbulos rojos adquiriendo una morfología en forma de hoz que fue descrita por primera vez por Herrick JB en 1910 (Rees et al., 2010). Es causada por la mutación del gen codificante de la β -globina, donde el nucleótido 17 cambia su base nitrogenada timina por adenina, provocando un cambio en la cadena de β -globina produciendo una unión de las cadenas $\beta 1$ y $\beta 2$ entre dos moléculas de hemoglobina (Rees et al., 2010).

La terapia actual de las enfermedades causadas por variaciones genéticas es en gran parte un tratamiento simplemente sintomático. En paralelo, se ha intentado desarrollar un nuevo tipo de tratamiento durante los últimos años que se centra en la corrección de las

mutaciones causantes, tanto hereditarias como adquiridas, llamado terapia génica. Esta terapia implica un conocimiento exacto de las secuencias específicas de ADN que provocan dichas enfermedades, así como los tipos de células implicadas en el proceso (Verma & Somia, 1997). Los primeros métodos empleados como terapia génica utilizaron vectores virales recombinantes cuya capacidad de replicación fue bloqueada, permitiendo de esta manera realizar la transferencia de genes en células somáticas humanas sin causar una infección viral por el vector (Dunbar et al., 2018).

En 1989 el microbiólogo Dr. Francisco Mojica de la Universidad de Alicante comenzó a estudiar el microorganismo *Haloferax mediterranei*, un microbio arquea extremófilo proveniente de la sal característica de la zona litoral de las marismas de Santa Pola. Sus observaciones mostraron que esta alta concentración de sales alteraba la función de los enzimas de restricción que cortaban el genoma del microbio. Los fragmentos genéticos resultantes presentaron una estructura muy inusual, caracterizada por múltiples copias repetidas casi a la perfección de una secuencia palindrómica de 30 pares de bases y que estaban separadas entre sí por espaciadores de unos 36 pares de bases (Lander, 2016). En estudios posteriores encontró en alrededor de 20 microbios diferentes los mismos loci originalmente descubiertos en *Haloferax mediterranei*, entre ellos *Escherichia coli*, *Clostridium difficile* y *Yersinia pestis*. Inicialmente denominó a estas repeticiones como “Repeticiones Cortas Espaciadas Regularmente” (en inglés “Short Regularly Spaced Repeats”, con las siglas SRSR) pero posteriormente cambió el nombre a lo que se conoce ahora como “Repeticiones Palindrómicas Agrupadas Regularmente Interespaciadas” o en inglés “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats” - CRISPR (Lander, 2016).

En un principio las hipótesis de la función del sistema CRISPR eran numerosas y se propusieron, entre otras, funciones tan diversas como la regulación de genes hasta la regeneración de ADN. En agosto de 2003 cuando el Dr. Mojica, tras varios intentos de extracción de espaciadores de *E. coli*, descubrió que estos espaciadores coincidían con secuencias de virus o plásmidos conjugativos por lo que dedujo que los loci CRISPR se usan de manera específica por las bacterias como sistema inmunológico adaptativo frente a posibles infecciones (Lander, 2016). Estos resultados se publicaron casi dos años después en la revista *Journal of Molecular Evolution* (Mojica et al., 2005) y fueron el inicio de una investigación global sobre este tema.

Hipótesis

La edición génica como terapia ha sido un recurso en los últimos años para el tratamiento de ciertas enfermedades de carácter génico. Se han creado diferentes métodos para llevarlo a cabo, intentando mejorar a cada intento los problemas que presentaban las anteriores terapias génicas. Con la CRISPR-Cas9 es posible llevar a cabo dicha edición génica mediante un sistema de guiado mediado por ARN facilitando así su uso. Esta tecnología llega para intentar remediar los diferentes problemas que plantea la edición génica.

Objetivos

Comparar a nivel molecular y celular las diferentes terapias génicas que existen hoy en día con especial enfoque en los problemas clínicos que conlleva la realización de la edición génica con estos métodos y, en este contexto, evaluar el potencial clínico de la nueva técnica CRISPR-Cas9.

Material y Métodos

La investigación bibliográfica se ha llevado a cabo utilizando las siguientes bases de datos, ordenados de mayor a menor según el uso con el que ha sido empleado: Google Scholar, Science Direct, Web of Science y NCBI. Estas bases de datos han sido escogidas como fuente de información científica para el desarrollo del tema principal de este trabajo por tener una gran variedad de artículos que proporcionan de manera pública. Ya que la tesis de grado, al tratarse de un tema principalmente relacionado con la biomedicina, tanto Science Direct como NCBI se centran en dicho campo y fueron las webs especializadas que se emplearon para encontrar publicaciones para este trabajo. Tanto Google Scholar como Web of Science se usaron para una búsqueda más genérica de publicaciones sobre el tema. Al tener credenciales universitarias, se pudo acceder de manera sencilla y gratuita a la descarga de las diferentes publicaciones sin necesidad de tener ningún tipo de suscripción a estas páginas web.

Para la búsqueda, se empezó por un enfoque general usando como palabra clave “crispr” junto a otras palabras como “cas9” o “enfermedad genética” para encontrar resultados que mostraran el mecanismo de acción de la CRISPR Cas9 sobre los genes humanos. Posteriormente se buscaron diferentes enfermedades genéticas tratadas con esta terapia génica, los procedimientos llevados a cabo y los resultados obtenidos con este tratamiento.

La búsqueda bibliográfica se ha realizado usando diferentes palabras clave por separado, así como una combinación de palabras clave y en ocasiones el uso de comillas dobles en el

campo de búsqueda (Tabla 1). En algunos casos se han buscado palabras clave en inglés para obtener un mayor rango de resultados. Aquellos artículos con títulos de interés para el trabajo fueron seleccionados para una lectura previa y también se consideraron durante la búsqueda. Una vez seleccionados los artículos, se realizó una primera lectura del resumen (o abstract) del artículo en cuestión para, posteriormente, decidir si dicho artículo era de interés para el objetivo de este trabajo. Después se descargaron los artículos y tras una primera lectura introductoria se decidía definitivamente si el artículo contenía información relevante para el tema.

Finalmente, para la redacción del trabajo, se han usado diferentes artículos y recursos que se pueden encontrar en el apartado de referencias. Las citas incluidas en esta tesis son referencias originales. Añadir que durante la realización de esta tesis se han consultado otros artículos científicos que no han sido incluidos en la bibliografía pero que han sido usados para una mayor comprensión y ampliación de conocimiento personal del tema.

Campo de búsqueda	
Crispr + cas9	"Francis Mojica" + crispr
Enfermedades + genéticas	"Enfermedades genéticas" + humanos
"Cystic fibrosis"	"Sickel cell" + disease
"Huntington's disease"	"BRCA gene"
"genetic therapy"	"enfermedades raras"
"genetic disease" + "environmental factors"	"Turner syndrome"
"transfection"	"adeno associated virus" + "gene therapy"
"horizontal gene transference"	"vertical gene transference"
"Crispr cost"	"crispr embryon"

Tabla 1. Lista de palabras clave empleadas en las bases de datos consultadas para la adquisición de información presentada en esta tesis de grado.

Resultados y Discusión

Conceptualmente el tratamiento de una enfermedad genética se puede llevar a cabo de dos formas: 1) tratar los síntomas provocados por el defecto genético mediante fármacos o suplementos nutricionales o 2) tratar el origen de la enfermedad lo que significaría revertir el defecto genético. Sin embargo, tanto el primero como el segundo concepto tienen limitaciones. En muchas ocasiones los síntomas causados por la mutación genética no se pueden tratar de forma eficaz con los fármacos existentes, como por ejemplo en el caso de la anemia falciforme mencionada en la introducción, o no provocan una deficiencia alimenticia que se podría evitar con suplementos nutricionales, como por ejemplo es el caso en la adrenoleucodistrofia que está caracterizada por un trastorno metabólico en la síntesis de ácidos grasos de cadena larga. En la segunda opción de tratamiento, es decir, revertir el defecto genético, existe también un problema general, porque esta opción requiere un transfer horizontal de material genético.

La transferencia de material genético se puede clasificar en dos tipos que son la transferencia vertical de genes (VGT) y la transferencia horizontal de genes (HGT). La transferencia vertical es aquella que implica una herencia de material genético por parte de la célula parental a su descendencia resultado de la división celular (Seoane et al., 2011) y se realiza de forma habitual en la herencia de los genes de los padres a los hijos mientras que la transferencia horizontal de genes (HGT) es aquella que se transmite entre linajes evolutivos diferentes. El último tipo es característico para la transferencia de material genético de células a virus, de virus a virus y de virus a células eucariotas (H. Liu et al., 2010). La HGT es reconocida como un mecanismo de adaptación en bacterias y arqueas como resistencia frente tanto a antibióticos y como a patogenicidad. Aunque la mayoría de eventos de HGT suelen ser neutrales y no tienen apenas trascendencia, se ha observado que algunos eucariotas multicelulares pueden llegar a evolucionar adquiriendo genes procedentes del microbioma asociado, lo cual implica con frecuencia la importación de genes tanto del organismo donante como de otros organismos (Soucy et al., 2015). La HGT también es importante en la evolución de los virus, especialmente en los patógenos realizando transferencia de dominios de proteínas o incluso genes completos, donde éstos últimos se conocen como genes transferidos horizontalmente (HTgenes). Los HTgenes a menudo incrementan la virulencia al interferir y codificar genes homólogos del sistema inmunológico del organismo huésped. Dichos eventos de HGT confiere ventaja al genoma del virus si los HTgenes han sido adquiridos y se mantienen varias veces (Bratke & McLysaght, 2008).

Dado el hecho de que los virus utilizan la transferencia horizontal de material genético como mecanismo para su propia propagación se convirtieron en una herramienta principal para la corrección de las mutaciones genéticas causantes de las enfermedades genéticas. De especial interés fueron los retrovirus que son virus de ARN cuyos genes están codificados en una sola molécula monocatenaria de ARN y, una vez el retrovirus entra en la célula huésped, ésta se convierte en ADN de doble cadena mediante un proceso llamado transcripción inversa (Gilboa, 1986) (Figura 1). Cuando este ADN vírico se introduce en el núcleo de la célula huésped, éste se integra en el cromosoma. Esta forma integrada del ADN vírico se denomina provirus y se usa como plantilla para la síntesis del ARN del virus y para la expresión de los genes de la futura descendencia de los virus. Generalmente la integración del material genético viral en la célula huésped no supone ningún efecto sobre la viabilidad (Gilboa, 1986).

Por este motivo, los retrovirus han sido utilizados en los últimos años para la transferencia de genes empleando los retrovirus como vectores en la llamada terapia génica. Primero se introduce al retrovirus el gen extraño que se desea transferir y se infecta en la célula diana. Este primer paso se puede realizar de manera sencilla debido a que, en el genoma vírico, se puede reemplazar la mayoría de secuencias virales importantes para la infección vírica por los genes de interés y el ADN del retrovirus restante se denomina vector. Dicho vector ha de incluir siempre los dos extremos del genoma vírico y dichos extremos se denominan LTR (repeticiones terminales largas o en inglés "Long Terminal Repeats").

Esto junto a algunas regiones adyacentes contienen información importante para la replicación vírica. Posteriormente, una vez formado el ADN híbrido, se introduce en células cultivadas *in vitro* llamadas células empaquetadoras que albergarán el retrovirus "defectuoso" (no tiene viabilidad vírica ya que no podrá encapsularse). Este ADN del vector se transcribirá en el ARN correspondiente que se secretará en el medio que será recolectado para finalmente infectar a las células diana para poder insertar en el genoma celular nuestro gen extraño de manera similar a como si fuera un gen viral (Gilboa, 1986).

Que el retrovirus se integre en el ADN de la célula huésped es, en principio, un hecho positivo porque permitiría una cura real de la enfermedad genética con un único tratamiento. Sin embargo, como no se puede controlar el sitio de integración puede inhabilitar otros genes por integrarse en medio de su secuencia genética. Además, puede provocar lo que se conoce como retrovirus endógenos humanos (HERV) y permanecer para siempre y transferirse a la descendencia. Estos HERV al estar integrados, evitan su metilación de manera que se asegura su expresión a la par que evitan ser reconocidos por células T (Svoboda et al., 2000). De hecho, en ocasiones estos HERV se han relacionado como

cofactores en ciertas enfermedades autoinmunes donde se ha observado un aumento de la expresión de ARN cuando se manifiesta la enfermedad (Griffiths, 2001).

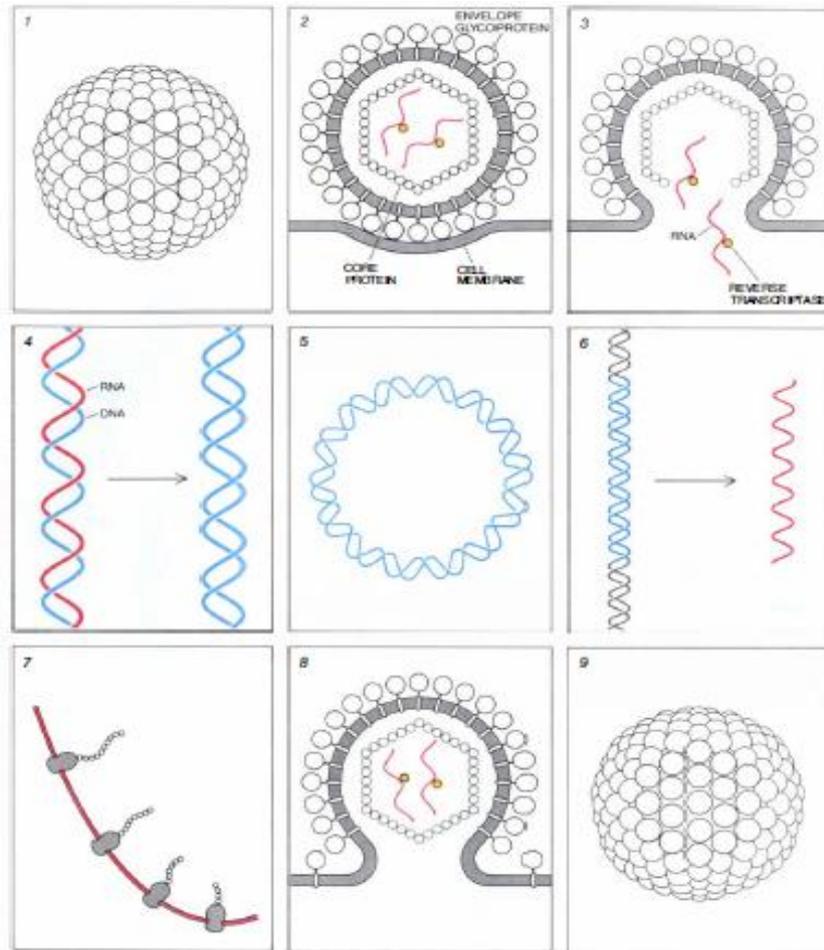


Figura 1: Ciclo de vida de un retrovirus (Gallo, 1986). (1) Retrovirus. (2) Interacción con la membrana de la célula huésped. (3) Liberación del contenido. (4) Transcripción inversa. (5) ADN vírico de doble cadena. (6) Inserción en el cromosoma huésped y replicación. (7) Traducción del ARN. (8) Formación del virión. (9) Nuevo virus.

El virus adeno-asociado (AAV) es una de las terapias génicas con mayor actividad de investigación, donde en un principio fue descubierto en unas preparaciones de adenovirus durante una investigación y fue considerado inicialmente como un contaminante (Naso et al., 2017). Tiene un genoma monocatenario y dicho genoma contiene tres principales genes que están flanqueados a ambos lados del genoma por repeticiones terminales invertidas (ITR) que son necesarias para la replicación y empaquetamiento. Dichos genes son el gen *Rep* (replicación) que codifica cuatro proteínas diferentes, el gen *aap* (montaje) que codifica para la proteína encargada de la activación del ensamblaje y el gen *Cap* (cápside) que codifica la familia de las proteínas encargadas de formar la capa externa de la cápside (envoltura viral) (Naso et al., 2017).

Los vectores AAV han tenido un gran éxito dentro de la terapia génica debido a su alta capacidad de expresión en el núcleo de la célula huésped durante un periodo de tiempo prolongado, además de tener un grado de toxicidad bajo para la célula (Daya & Berns, 2008). Al igual que en el caso de la terapia con transfección, los AAV pueden ser usados como elementos extracromosómicos (permanecen en el citosol) o como empalme en el genoma para mejorar la capacidad de expresión génica. En el caso de ser elementos extracromosómicos, se usan vectores de AAV recombinantes (rAAV) basados principalmente en AAV2. Estos rAAV pueden transducir varios tipos distintos de órganos (como por ejemplo músculo o hígado entre otros) y su velocidad de expresión está limitada por dos factores principales que son la síntesis de la segunda cadena y el tráfico ineficaz de AAV en la célula (Daya & Berns, 2008). Para ello, la unión de la proteína celular FKBP52 en la región ITR en su estado fosforilado es crucial para inhibir la síntesis de la segunda cadena y de esta manera mejorar la velocidad de expresión (Qing et al., 2003).

En el otro caso, se ha usado la idea conocida como *trans*-empalme (o *trans*-splicing en inglés). Este sistema aprovecha que los AAV tienen capacidad de formar lo que se denomina concatémeros de cabeza a cola vía recombinación en los ITR (Daya & Berns, 2008). Según la definición de R. Cammack en el libro Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, “*un concatémero es una molécula de ADN que contiene copias múltiples de una misma secuencia de nucleótidos dispuestas en tándem*”. Una vez se ha formado este complejo, se forma la transcripción de rAAV seguida de un proceso de corte-empalme correcto de la transcripción de ARN mensajero (ARNm) y como resultado de este proceso se obtiene un producto génico totalmente funcional.

Esta aplicación puede resultar muy útil para la administración de genes para terapias de hasta un tamaño de 9 kb como máximo, aunque se ha observado que este método de *trans*-splicing suele ser menos eficiente respecto a los vectores rAAV (Daya & Berns, 2008). Para evitar el factor limitante que produce la síntesis de la segunda cadena, también se ha diseñado los vectores AAV autocomplementarios (scAAV) que acortan el tiempo antes de la expresión del transgén y aumenta de manera muy eficaz la eficiencia biológica del vector. Estos scAAV son capaces de plegarse sobre sí mismos formando así ADN bicatenario y su tamaño es aproximadamente la mitad respecto al de los rAAV, teniendo los scAAV una transducción rápida tanto en organismos *in vivo* como en cultivos de tejidos *in vitro* (Wu et al., 2007). (Figura 2)

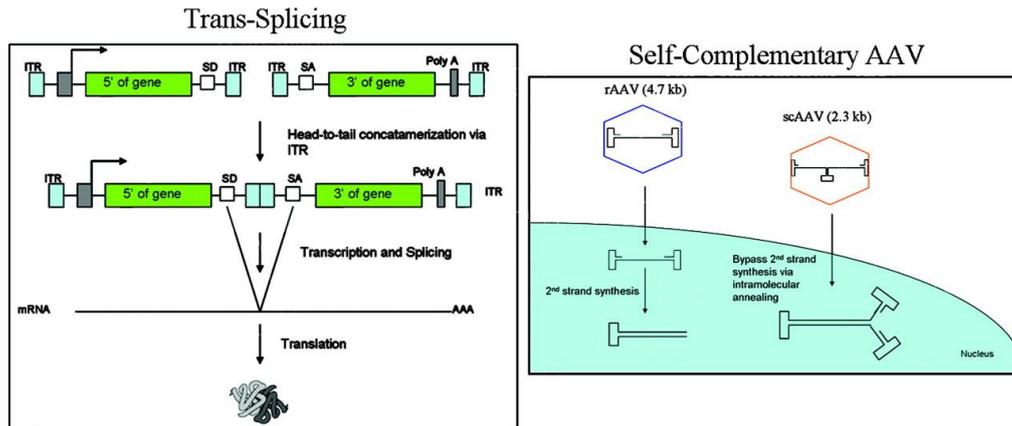


Figura 2: A la izquierda representada de forma esquemática el proceso de trans-splicing. A la derecha representada la comparación de scAAV (self-complementary AAV) y rAAV. (Daya & Berns, 2008).

La mayor problemática en cuanto al uso de AAV como terapia génica es la respuesta inmune (Zaiss et al., 2002). Esta problemática fue aún más relevante durante el anterior uso de adenovirus en lugar del AAV, que provocó el primer caso de muerte por terapia génica. Jesse Gelsinger, un varón adolescente de 17 años, murió durante la realización de un ensayo clínico de pacientes con deficiencia parcial de ornitina transcarbamilasa. Administraron diferentes cantidades de dicho vector a los distintos pacientes y de los que Jesse recibió la dosis más alta provocándole la muerte por una reacción de su sistema inmune que terminó en una falla orgánica múltiple (Hollon, 2000). En el caso del AAV la respuesta inmunitaria que manifiesta el huésped es en primer lugar una respuesta humoral, aunque también cabe la posibilidad de que se desarrolle una respuesta mediada por células (Xiao et al., 1996). La respuesta mediada por células involucra células T citotóxicas para neutralizar o eliminar las células transducidas, mientras que la respuesta humoral depende de los linfocitos T. El paciente produce lo que se llaman anticuerpos neutralizantes (Nab) lo que dificulta una nueva administración del vector pero prácticamente no se observa una respuesta innata a la infección por AAV, por lo que en una primera administración no habría una respuesta inmunitaria salvo la mediada por células (Zaiss et al., 2002).

Otro método para la transferencia horizontal de material genético, que se ha desarrollado en el laboratorio de cultivo celular, es la transfección. Es un procedimiento que puede introducir tanto ADN como ARN dentro de las células, de manera que posteriormente se puedan producir células modificadas genéticamente. Se puede realizar dos tipos diferentes de transfección (Figura 3): la transfección estable, donde el material genético introducido contiene un marcador para integrarse en el genoma de la célula huésped; y la transfección

transitoria, donde el material genético no se integra en el genoma y quedan remanentes en el citoplasma (Kim & Eberwine, 2010). En la transfección estable, la expresión del transgen se mantiene incluso después de que la célula se haya replicado, es decir, se va a mantener en las células hijas. En cambio en la transfección transitoria puede perderse el material genético en la división celular, ya que, al permanecer en el citosol, este material no se duplicará y por lo tanto solo se mantendrá en una de las células hijas y no en ambas, además de que factores ambientales pueden inducir a la degradación del material genético introducido (Kim & Eberwine, 2010). Existen tres métodos de transfección independientemente del resultado final, transfección estable o transitoria, que son física o química.

Los métodos físicos son los más recientes e incluyen la microinyección directa, la transfección basada en láser y la electroporación. La electroporación produce un pulso eléctrico corto provocando que en la membrana celular se produzcan agujeros por los que pasarán los ácidos nucleicos. Es fácil y rápido y se puede transfectar grandes cantidades de células en un periodo corto de tiempo. En cuanto a la transfección basada en láser, funciona de manera similar a la electroporación, con la diferencia de que, usando un láser de pulso, se forma un poro transitorio en la membrana y el material genético entra por diferencia osmótica entre el medio y el citosol (Kim & Eberwine, 2010).

Pero el éxito de la transfección viene determinado por el tipo de célula debido a que es un factor crítico para determinar el nivel de expresión que tendrá la célula después de haber sufrido la transfección y por lo tanto es necesario determinar el tipo de transfección antes de llevarla a cabo (Yamano et al., 2010). Además pueden presentar problemáticas como la electroporación, que en ocasiones produce una permeabilización de la membrana plasmática de la célula, provocando en ocasiones su muerte debido a la pérdida de la homeostasis celular (Rubinsky, 2007). Además, este procedimiento no se puede realizar *in vivo* debido a que no se puede aplicar de manera específica sobre aquellas células a tratar y menos aún en órganos internos.

Los métodos químicos son los más utilizados en los últimos años en el ámbito de la investigación. Se utilizan diferentes productos químicos tales como polímero catiónico, aminoácido catiónico, fosfato de calcio y lípido catiónico. Se forman complejos de ácido nucleico/químico con carga positiva de manera que son atraídos por la membrana celular con carga negativa. Se cree que, una vez atraído dicho complejo, éste entra en la célula atravesando la membrana mediante endocitosis o fagocitosis y una vez dentro de la célula, el ADN es transfectado en el núcleo para poder ser expresado posteriormente. En este tipo de método la eficiencia depende sobretodo del pH de la solución, especialmente si se desea

aplicar *in vivo* (el pH se ha de mantener constante) y las condiciones en las que se encuentra la membrana celular y en comparación con la transfección vírica tiene una baja eficiencia. Sin embargo, tiene una citotoxicidad relativamente baja y no provoca mutagénesis, por lo que le confiere ventajas respecto a la transfección mediada por virus (Kim & Eberwine, 2010).

Una técnica de transfección química que ha estado en uso es la conocida como lipofección. La lipofección emplea un lípido catiónico conocido como DOTMA donde varias moléculas de DOTMA interactúan con el ADN formando complejos facilitando así la entrada en la célula a través de la membrana plasmática con dicho ADN empaquetado (Felgner et al., 1987). Aunque la inserción del ADN es relativamente fácil con este método, la eficacia de esta técnica es muy baja en comparación con el resto de técnicas, provocando que, para alcanzar la misma eficacia de transfección *in vivo*, es necesario administrar concentraciones altas que en ocasiones puede provocar citotoxicidad (Mars et al., 2015).

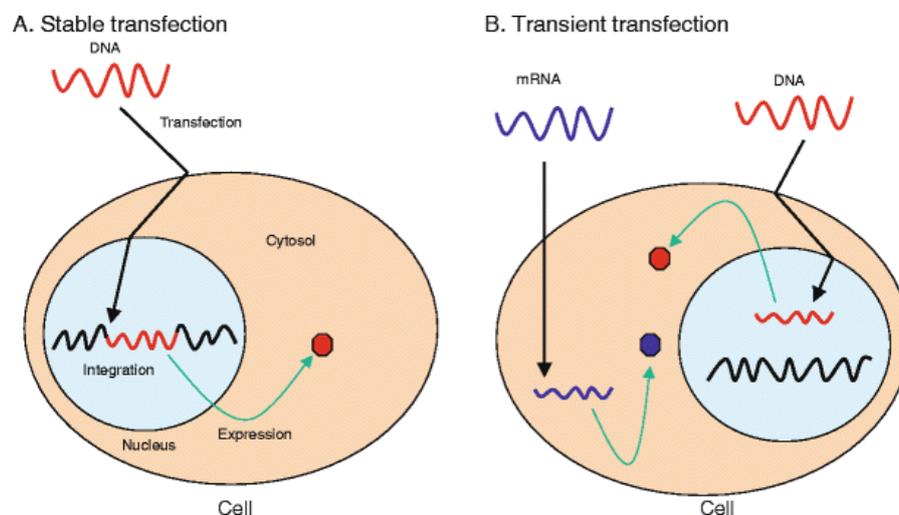


Figura 3: Diagramas esquemáticos de los dos tipos principales de transfección. A la izquierda está representada la transfección estable y a la derecha la transfección transitoria. Las ondas rojas representan ADN extraño, las ondas azules representan ARNm y las ondas negras ADN del huésped. Las flechas negras indican liberación de ácidos nucleicos extraños y las verdes liberación de proteínas expresadas a partir de los ácidos nucleicos extraños. (Kim & Eberwine, 2010)

La abreviatura CRISPR viene de las siglas del término inglés Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (en español Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas). Es una familia de secuencias de ADN que representa el homólogo bacteriano al sistema inmunitario humano. Este mecanismo es

guiado por ARN codificado por el loci CRISPR y genes asociados. Con este mecanismo, la bacteria adquiere inmunidad a posibles infecciones de bacteriófagos y a la transferencia de plásmidos. La bacteria realiza este proceso mediante la integración de fragmentos cortos de ADN en la matriz de espaciadores de repetición CRISPR en el cromosoma del individuo huésped. De esta manera, permite evitar posibles futuras infecciones o invasiones, habiendo adquirido previamente una especie de “registro” genético (Jiang & Doudna, 2017) (Figura 4).

Aunque este mecanismo se ha desarrollado como parte del sistema de defensa de las bacterias contra bacteriófagos, se ha propuesto que se podría utilizar igualmente en la rama de ingeniería del genoma y es por ello que este sistema comenzó a ser empleado como herramienta para la manipulación del genoma con un rango muy amplio de organismos que podían ser modificados debido a la alta eficiencia y la simplicidad de su uso (Jiang & Doudna, 2017). A la hora de editar el genoma, éste primero es atacado por una guía de ARN homóloga para el gen que se desea editar y este ARN estará asociado a la enzima Cas9 (endonucleasa). Una vez el ARN guía se hibrida con el ADN diana, la Cas9 provoca la rotura de la cadena doble de ADN (El-Mounadi et al., 2020). Posteriormente se activan diversos mecanismos celulares para la reparación del ADN que ha sufrido la rotura. Principalmente se pueden observar dos mecanismos diferentes de reparación. Uno de estos mecanismos une los extremos no homólogos provocando una inserción-delección en la región del ADN donde hibrida la secuencia de ARN que puede provocar tanto la pérdida como la inserción de ADN. Otro mecanismo es la reparación de ADN dirigida por homólogos, incorporando una secuencia de ADN homóloga específica. Para que esto ocurra, se ha de introducir dentro de la célula dicha secuencia homóloga que se quiere integrar en el ADN (El-Mounadi et al., 2020).

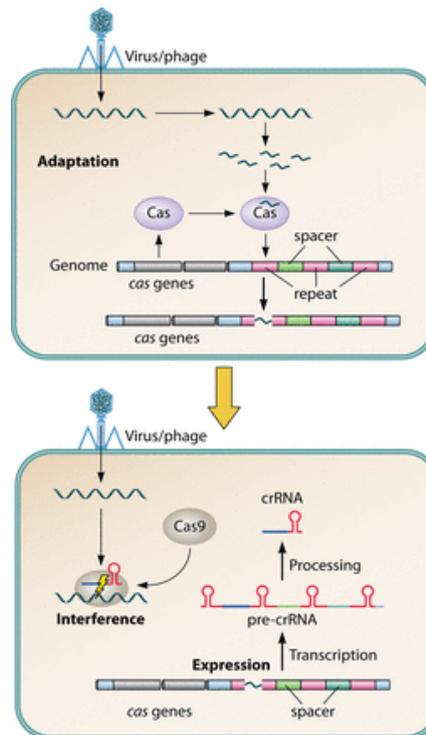


Figura 4: Proceso del sistema inmune adquirido por el sistema CRISPR-Cas 9. La imagen de arriba corresponde al proceso de adaptación y la imagen de abajo corresponde al proceso de expresión. (Ishino et al., 2018)

Se puede dividir los sistemas CRISPR-Cas en dos clases, clase 1 y clase 2, siendo ésta última la que contiene el sistema CRISPR-Cas9 (Figura 5) que es la más idónea y empleada para su uso y aplicación en la edición génica (C. Liu et al., 2017). Es un sistema guiado por ARN, más concretamente por sgARN (ARN guía único) y unas secuencias determinadas llamadas secuencias PAM (motivo adyacente protoespaciador) que se encuentran justo antes de la secuencia destinada a la edición genómica (Khadempar et al., 2019). El sgARN en este caso se compone de un crARN (ARN CRISPR maduro) que contiene una secuencia PAM que puede ser de un tamaño de hasta 20 nucleótidos y una secuencia complementaria a un crARN trans-activador (tracrARN). Tanto el crARN como el tracrARN hibridan entre sí para unirse a la proteína Cas9 formando así el complejo CRISPR-Cas9 (C. Liu et al., 2017). Este mecanismo permitió pensar en la posibilidad de curar ciertas enfermedades genéticas, permitiendo así tratar estas enfermedades producidas por mutaciones, incluyendo tanto enfermedades hereditarias como cánceres.

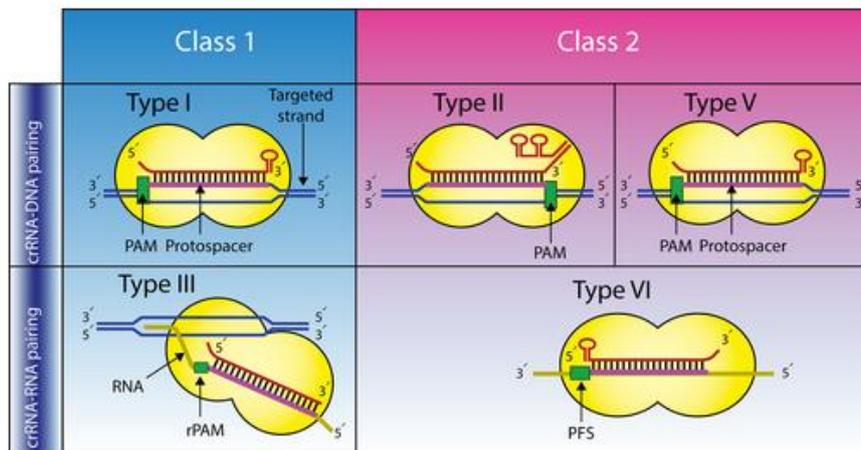


Figura 5: Clases y tipos de sistemas CRISPR-Cas, siendo el tipo II el CRISPR-Cas9. Están representados la proteína Cas9 (amarillo), la secuencia PAM (verde), el ADN diana (azul) y el crARN (rojo). (Khadempour et al., 2019).

En 2016 el oncólogo Lu You realizó el primer ensayo clínico en humanos con esta técnica que contó con la aprobación ética de la junta de revisión del hospital en el que se realizó (Cyranski, 2016). Se administraron células T autólogas (células que provienen del propio paciente) modificadas *ex vivo* con el sistema CRISPR-Cas9 a un paciente con cáncer de pulmón agresivo para desactivar la proteína PD-1 (proteína encargada de la muerte celular programada) en las células T con la finalidad de que las células T pudieran tener una respuesta inmune contra las células cancerosas que, con la proteína PD-1 activada, no son atacadas por estas células. Dado el éxito que tuvo, Lu You decidió ampliar el grupo de ensayo y continuar con el mismo tratamiento en distintos pacientes. Dichas células que se extraían y se modificaron *ex vivo* se volvieron a inyectar en los pacientes con el objetivo de observar la viabilidad y la eficacia del tratamiento, obteniendo como resultado que la aplicación de las células T modificadas con el sistema CRISPR-Cas9 fue segura y factible (Lu, 2018; Lu et al., 2020).

A lo largo de los últimos años, han sido varios los grupos de investigación que han querido comprobar si, con la tecnología CRISPR-Cas9, era posible tratar el cáncer como ya se demostró en el primer paciente tratado con CRISPR-Cas9 ya mencionado. El cáncer de mama es la segunda causa de muerte por cáncer y la más común en mujeres en Estados Unidos. Aunque se desconoce la etiología que lo provoca en la mayoría de casos, se ha establecido diversos factores de riesgo que pueden provocarlo, así como antecedentes familiares, el sexo femenino o la menopausia. Otro motivo por el que puede manifestarse esta enfermedad es la mutación de los genes BRCA1 y BRCA2 (Carlson et al., 2011), genes pertenecientes a la familia de genes BRCA que son genes supresores de tumores (Scully, 2000). Aunque este cáncer es más frecuente en mujeres, también puede darse en hombres,

siendo el gen BRCA2 el gen mutado. En este caso, los factores de riesgo que pueden provocar el cáncer de mama en hombres son la hiper-estrogenización, la obesidad o el exceso de alcohol entre otros. Se ha comprobado que la técnica de CRISPR-Cas9 puede ser empleado para el propio diagnóstico del cáncer de mama y como terapia para tratar la enfermedad, ya bien sea contrarrestando la resistencia a tratamientos antitumorales o bien actuando directamente en reducción de la proliferación de las células (Yang et al., 2018).

Por ejemplo, el grupo de investigación encabezado por Yinnan Chen (Chen & Zhang, 2018) propuso principalmente la idea de dirigir con CRISPR-Cas9 secciones de las secuencias específicas en los exones mutados de ER o HER2 (Figura 6) (gen que codifica para respuesta a antiestrógenos en el caso de ER y gen que codifica la vía HER2 que juega un papel en la diafonía del receptor del factor de crecimiento en el caso de HER2) reparando las mutaciones de manera que las células cancerosas pierdan de una manera permanente la resistencia que habían adquirido a los medicamentos y combinar la CRISPR-Cas9 con los métodos ya empedados contra el cáncer como puede ser la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia.

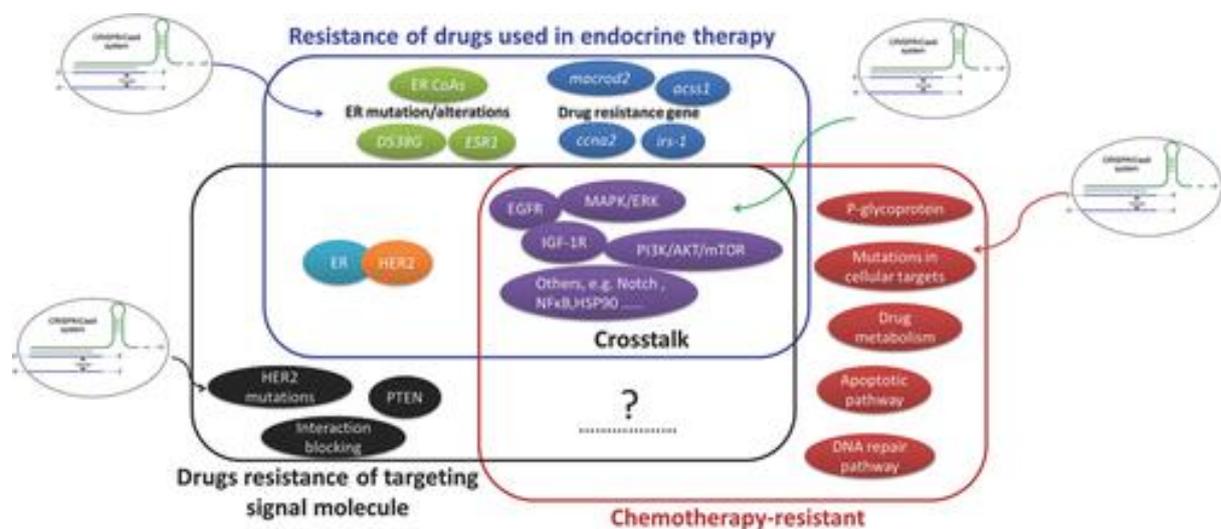


Figura 6: Representación de posibles mecanismos implicados en la fármaco-resistencia en la terapia del cáncer de mama propuesta por Chen y Zhang (Chen & Zhang, 2018).

A raíz de este primer ensayo clínico, se comenzó a tratar otras enfermedades de carácter genético con la misma técnica de CRISPR-Cas9. El uso de esta nueva técnica presenta ventajas respecto a las otras terapias génicas mencionadas anteriormente, especialmente en aquellas en las que están mediadas por vectores virales. Puede tratar de manera eficaz enfermedades con trastorno recesivo monogénico como por ejemplo la fibrosis quística o la anemia falciforme, enfermedades con trastornos dominante negativo, trastornos hereditarios, repeticiones de trinucleótidos como puede ser la enfermedad de Huntington o

incluso puede ser empleado como terapia contra el cáncer como ya se ha visto anteriormente y se demostrará a continuación (Hsu et al., 2014; Mollanoori & Teimourian, 2018).

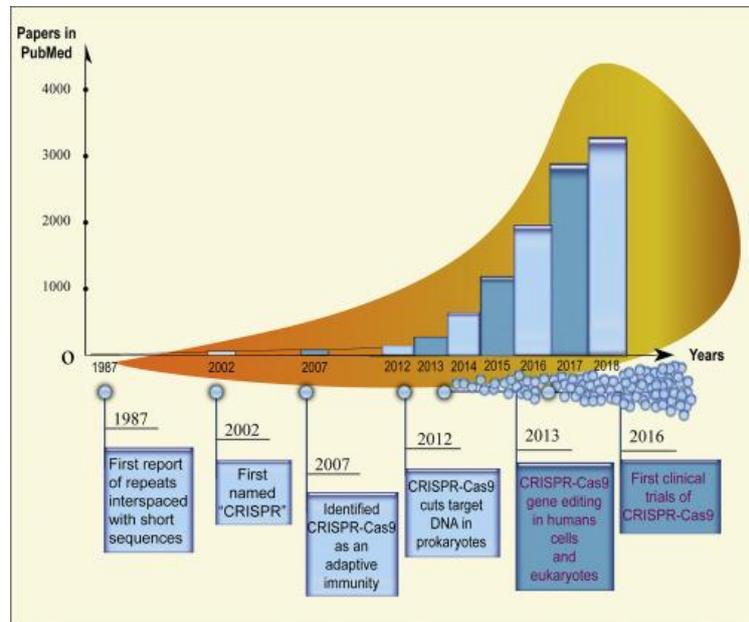


Figura 7: cronología y estudios que han sido clave del sistema CRISPR-Cas (You et al., 2019). Se observa un incremento en el número de investigaciones a partir de 2013 (representado con burbujas).

Como ya se ha mencionado en la introducción, la anemia falciforme presenta glóbulos rojos con forma de hoz provocado por una mutación en el gen que codifica para el gen de la β -globina provocando que las cadenas $\beta 1$ y $\beta 2$ de la hemoglobina se unan entre sí. Un estudio clínico realizado en 2020 (Frangoul et al., 2021) demostró que, con el uso de la CRISPR-Cas9 en células HSPC (células madre y progenitoras hematopoyéticas) podía reducir considerablemente los síntomas causados por la anemia falciforme en los que destacan la vaso-oclusión, necesidad de transfusiones de glóbulos rojos y dolor crónico. El ensayo clínico se centró en reducir la expresión de BCL11A. BCL11A es un factor de transcripción que reprime la expresión de la proteína γ -globina, una subunidad que conforma la hemoglobina fetal (dos subunidades α y dos unidades γ) que, una vez producido el nacimiento del feto, estas subunidades dejan de producirse y son sustituidas por las subunidades β . El objetivo fue reprimir la expresión de BCL11A para reactivar la producción de hemoglobina fetal y de esta manera sustituir la hemoglobina malformada por la mutación y que esta "nueva" hemoglobina fetal se mantuviera a lo largo del tiempo sin necesidad de readministración de CRISPR-Cas9 (Figura 8). Destacaron el resultado de una de sus dos

pacientes la cual en los 2 últimos años presentó un total de 7 episodios de vaso-oclusión grave. A dicha paciente le administraron mediante trasplante directo en la médula ósea células CD34+ y HSPC obtenidas previamente de la propia paciente mediante aféresis y que fueron posteriormente editadas por CRISPR-Cas9 *ex vivo* para reactivar la hemoglobina fetal. Esta técnica de trasplante de HSPC en personas es una técnica ya conocida y establecida clínicamente (Appelbaum, 2007) que lleva años aplicándose en pacientes, pero nunca se había realizado empleando CRISPR-Cas9 hasta ahora. CD34+ es una glucoproteína transmembrana que está presente en células madre precursoras de la hematopoyesis que pueden diferenciarse en cualquier tipo de célula hematopoyética (Krause et al., 1996; Lanza et al., 2001). Pasados 3 meses aumentó sus niveles de hemoglobina basal en sangre de 7,2 g a 10,1 g por decilitro y pasados 15 meses a 12 g por decilitro, todo esto sin necesidad de recibir ningún tipo de transfusión adicional. También observaron un aumento en el porcentaje de hemoglobina fetal, pasando de tener un 9,1% al comienzo del estudio a un 74,1% pasados 15 meses. Además, durante los siguientes 16 meses posteriores a la administración no volvió a tener ningún episodio de vaso-oclusión.

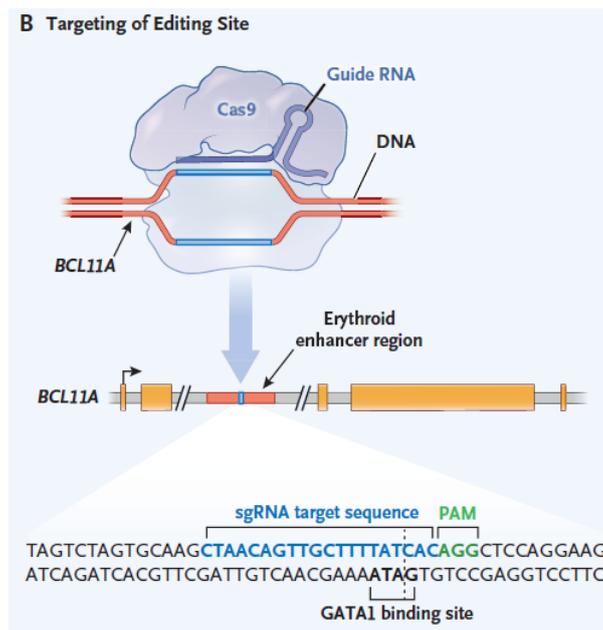


Figura 8: Lugar de edición de la CRISPR-Cas9 en el gen *BCL11A* con su sgARN (azul) y su secuencia PAM (verde) correspondientes. (Frangoul et al., 2021)

Otra enfermedad que se han reportado casos que han sido tratados con éxito con CRISPR es la fibrosis quística. La fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva causada por las mutaciones de un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 7. Dicho gen codifica el regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) que es una proteína que colabora en el transporte de electrolitos a través de las membranas de las células epiteliales (Robert C. Stern, 1997). Entre sus síntomas se observan que hay

infección bacteriana de las vías respiratorias, mala digestión de grasas, infertilidad en hombres y concentraciones de cloruro en sudor elevadas (Michael R. Knowles & Peter R. Durie, 2002). En 2015, el grupo de investigación liderado por Amy L. Firth (Firth et al., 2015) se propuso corregir la mutación $\Delta F508$ (delección de fenilalanina en la posición 508) que causa la fibrosis quística. Para corregirla, realizaron un estudio con una biopsia de iPSC (células madre pluripotentes inducidas) obtenida de un paciente homocigoto de la mutación $\Delta F508$ donde emplearon la CRISPR-Cas9 para que actuara en secuencias cercanas a la mutación. El objetivo era eliminar de manera experimental la mutación $\Delta F508$ provocando así que la CFTR sufra un defecto en su procesamiento. De esta manera, las células iPSC que fueron corregidas posteriormente se diferenciaron a células maduras de las vías respiratorias. Para obtener dichas células diferenciadas, realizaron una primera siembra de las células obtenidas de la biopsia y aplicaron la CRISPR-Cas9 con su sgARN pertinente para la mutación. Después de varios procesos de clonación y aislamiento de aquellas células que presentaron una delección de la mutación $\Delta F508$, las células iPSC corregidas se diferenciaron a través del endodermo definitivo donde todas las células consiguieron madurar a células epiteliales pulmonares con uniones estrechas pasados 48 días desde la diferenciación. Posteriormente, se observó que estas mismas células respondieron a una estimulación inducida con un cóctel de IBMX (forskolina, genisteína e isobutilmetil xantina) similar a una respuesta que se obtendría en el mismo tipo de célula de tipo salvaje. De esta manera, observaron que pudieron eliminar al completo cualquier huella genómica en el gen CFTR endógeno y considerar seriamente aplicaciones clínicas y terapéuticas.

CRISPR-Cas9 también podría tener un potencial para tratar enfermedades neurodegenerativas. La enfermedad de Huntington es una enfermedad neurodegenerativa autosómica dominante. Es provocada por una proteína mutante llamada hungtintina, resultado de múltiples repeticiones del trímero CAG provocando una hebra de poliglutamina en el extremo N-terminal de la cadena. Entre los síntomas se encuentran la falta de coordinación o el deterioro cognitivo entre otros. Un estudio experimental sobre la enfermedad de Huntington realizado por Alex Mas Monteys y colaboradores en 2017 (Monteys et al., 2017) tuvo como objetivo la eliminación del alelo HTT (gen de la hungtintina) utilizando como secuencia PAM la secuencia que flanquea el exón 1 de HTT. Para ello, debido a que el nucleótido que se encuentra en la tercera posición de la secuencia PAM podía presentar diferentes SNP (Polimorfismo de nucleótido único), escogieron de entre 47 SNP diferentes de las cuales identificaron 21 que estaban presentes en el tercer nucleótido conservado de PAM. Posteriormente desarrollaron sgARN para 6 de estos SNP para comprobar la escisión con CRISPR-Cas9 utilizando células de la línea HEK-293 (células embrionarias de riñón humano). 5 de estos SNP se ubicaron dentro de un rango de 5 kb

(kilobases) de la región promotora de HTT y se procedió a clonar los diferentes sgARN para apuntar a regiones del intrón 1 de HTT y, posteriormente, transfectar las células HEK-293 con plásmidos con expresión de sgARN y Cas9 para evaluar la delección del gen. Se demostró que realmente hubo una delección del exón 1 de HTT que fue acompañada por una correspondiente reducción de los niveles de la proteína y de ARNm en aquellas células que se editaron genéticamente y que expresaron más de un sgARN. Al contrario, las células que expresaron solo un sgARN, aunque también mostraron niveles bajos de ARNm y proteínas de HTT, no se observó ninguna delección del exón 1 de HTT. Finalmente testaron con ratones BachD, que son ratones transgénicos para el alelo de HTT humano modificado y observaron los mismos resultados anteriores, una bajada en los niveles de expresión de ARNm de HTT y por consiguiente también sus proteínas. Paralelamente, el grupo de investigación liderado por Jun Wan Shin (Shin et al., 2016) realizó un estudio muy similar cuyo objetivo también era eliminar el exón 1 de HTT y que también demostró que usando como estrategia la escisión específica con la tecnología de CRISPR-Cas9 se puede reducir la expresión de HTT en fibroblastos de la enfermedad de Huntington en humanos, aunque todavía se desconozca si este tipo de tratamiento puede ser igual de beneficioso a la hora de administrar a pacientes humanos como ha resultado en ratones.

Pero este tipo de terapia no solo es aplicable en adultos, también puede ser empleado en embriones para evitar aquellas enfermedades cuyas mutaciones se manifiestan de manera tardía en adultos. Debido a esto, este tipo de mutaciones no se rigen por la selección natural, por lo que se suele transmitir de forma vertical a su descendencia y de esta manera perdurar. Un ejemplo es la miocardiopatía hipertrófica (MCH) que fue objetivo de estudio de Ma (Ma et al., 2017). Se centraron en corregir la mutación heterocigótica MYBPC3, gen que causa la MCH, eliminando 4 pares de bases de dicho gen. Esta delección se realizó en el alelo paterno y la reparación de la rotura del ADN fue mediado por el ovocito mediante reparación dirigida por homología (HDR). Para ello tomaron diferentes muestras de un paciente adulto varón, en concreto muestras de piel, sangre y semen. Los fibroblastos que obtuvieron de la piel fueron empleados para generar iPSC a los que administrarles el CRISPR-Cas9 dirigida junto con dos moldes de oligodesoxinucleótidos monocatenarios (ssODN-1 y ssODN-2) para comprobar la eficacia. Dado que la combinación de CRISPR-Cas9 con ssODN-1 (CRISPR-Cas9-1) fue la más exitosa se procedió a emplearlo en ensayos con cigotos. Los cigotos tenían la misma premisa que en el inicio: el espermatozoide donante contiene la mutación de MYBPC3 y el óvulo donante contiene el alelo salvaje (sin la mutación). Se inyectó a los óvulos la CRISPR-Cas9-1 junto con los espermatozoides (Figura 9) para así asegurarse de que actuase sobre el gen mutante y de esta manera no produjese mosaicismo en el embrión (esto es debido a que se produciría

una reparación del ADN mediante NHEJ, unión de extremos no homóloga). Una vez inyectado CRISPR-Cas9-1, se procedió a incubar durante 3 días los embriones y observaron que de 54 embriones, 36 eran homocigotos para el alelo de tipo salvaje (sin mutación) en cada blastómero del gen MYBPC3. De esta manera demostraron que con el direccionamiento del gen CRISPR-Cas9 en cigotos humanos puede controlarse la línea germinal y evitar que posibles descendencias puedan manifestar mutaciones que se expresan en edad adulta.

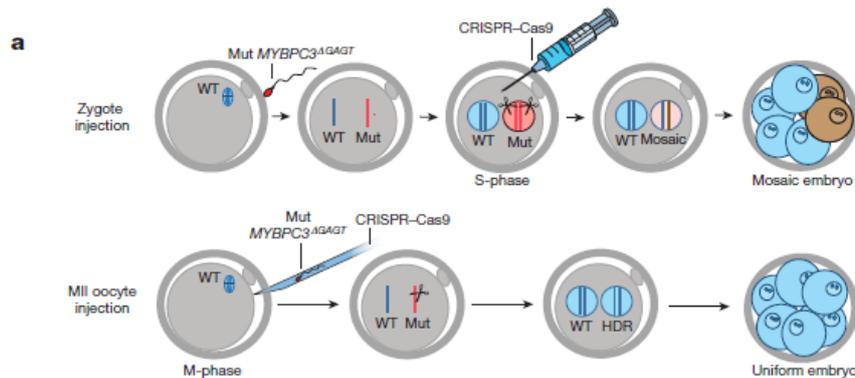


Figura 9: Esquema del proceso de inyección de CRISPR-Cas9 con dirección al gen mutante MYBPC3 en embriones (Ma et al., 2017). De esta manera se produce la edición del genoma en el espermatozoide que contiene la copia del mutante y así se evita el mosaicismo.

Un punto importante a nivel socio-económico que aún no se ha mencionado es el precio de los distintos conceptos de tratamiento. Aunque todavía no hay ningún precio estipulado para un tratamiento clínico con CRISPR-Cas9 (todavía no se ha comercializado o propuesto como producto terapéutico) esta tecnología será muy probablemente más asequible económicamente respecto al resto de terapias génicas. Un ejemplo práctico a la hora de especular sobre el precio de la CRISPR-Cas9 sería compararlo con un producto de la farmacéutica Novartis. Esta farmacéutica aprobó la comercialización a principios de 2018 de una terapia génica para tratar una enfermedad minoritaria de la visión cuyo mecanismo emplea AAV cuyo coste aproximado del tratamiento es de 850.000 € en total. En cambio, como se observa en la Tabla 2, el coste de los productos y maquinaria necesaria para llevar a cabo la edición con CRISPR-Cas9 es relativamente barato. A este coste se tendrá que añadir el gasto para la aprobación del fármaco pero cabe esperar que siga siendo lejos de alcanzar la cifra mencionada anteriormente respecto al tratamiento mediado por AAV. Cabe destacar que en este caso, solo haría falta realizar una sola compra de la maquinaria por laboratorio o centro de salud donde se realice el proceso, por lo que cada vez que se quisiera tratar a un paciente con la tecnología CRISPR-Cas9 solo sería necesario volver a

comprar aquellos productos que sean necesarios. En esta tabla no se incluye el material de laboratorio que podría emplearse ni la mano de obra.

Nombre del producto	Precio (€)
TrueCut™ Cas9 Protein v2 500ug	720
Kit de ADN de donante TrueTag™, GFP	498
TrueGuide™ Synthetic sgRNA	83,4
GeneArt™ CRISPR Nuclease Vector with CD4 Enrichment Kit (with competent cells)	710
Platinum™ II Hot-Start Green PCR Master Mix (2X)	75,75
Neon™ Transfection System	7090
ProFlex™ 96-well PCR System	9550
PureLink™ RNA Mini Kit	152
Total	18879,15

Tabla 2: Presupuesto para llevar a cabo la edición genética mediante el uso de CRISPR-Cas9 con plásmidos. Se incluyen los aparatos electrónicos para la transfección (Neon™ Transfection System) y para la clonación (ProFlex™ 96-well PCR System). Empresa distribuidora: Thermo Fisher Scientific.

Conclusión

La tecnología de CRISPR-Cas9 para editar genes está obteniendo resultados muy beneficiosos a nivel *in vitro*. Esta herramienta permite con una eficiencia y simplicidad muy altas la modificación precisa del genoma así como una regulación transcripcional de genes. Esto dota al sistema CRISPR-Cas9 el potencial de realizar tratamientos de enfermedades humanas de una manera personalizada haciendo que las posibles aplicaciones terapéuticas sean prácticamente ilimitadas siempre y cuando se conozca la región del genoma a tratar.

Un problema real en este contexto podría ser la lentitud del poder legislativo para establecer un marco jurídico claro porque no hay estipuladas unas políticas que regulen el uso de esta tecnología hoy en día debido a su avance extremadamente rápido. Un caso con mucha repercusión en el ámbito ético fue el nacimiento de gemelos genéticamente modificados por CRISPR que tuvo lugar en China. El Dr. He editó el gen CCR5 en los embriones de los gemelos para que en un futuro el VIH no pudiera infectar a sus glóbulos blancos y aparentemente realizó este experimento sin la aprobación del comité ético de su universidad por lo que no hay constancia de sus resultados salvo un artículo del propio Dr. He que no está disponible públicamente (Greely, 2019). Es por ello que en el futuro, a la par que la tecnología de CRISPR-Cas9 sigue avanzando también lo ha de hacer la creación de leyes que lo regulen y supervisen de manera estricta.

Bibliografía

- Appelbaum, F. R. (2007). Hematopoietic-Cell Transplantation at 50. *New England Journal of Medicine*, 357(15), 1472-1475. <https://doi.org/10.1056/nejmp078166>
- Barreda Bonis, A. C. ., González Casado, I. ., & Gracia Bouthelier, R. . (2011). Síndrome de Turner. *Protocolos diagnósticos y terapéuticos en Pediatría*, 1, 218-227.
- Bratke, K. A., & McLysaght, A. (2008). Identification of multiple independent horizontal gene transfers into poxviruses using a comparative genomics approach. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-67>
- Carlson, R. W., Allred, D. C., Anderson, B. O., Burstein, H. J., Carter, W. B., Edge, S. B., Erban, J. K., Farrar, W. B., Forero, A., Giordano, S. H., Goldstein, L. J., Gradishar, W. J., Hayes, D. F., Hudis, C. A., Ljung, B. M., Mankoff, D. A., Marcom, P. K., Mayer, I. A., McCormick, B., ... Zellars, R. (2011). Invasive breast cancer: Clinical practice guidelines in oncology. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 9(2), 136-222. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2011.0016>
- Chen, Y., & Zhang, Y. (2018). Application of the CRISPR/Cas9 System to Drug Resistance in Breast Cancer. *Advanced Science*, 5(6). <https://doi.org/10.1002/adv.201700964>
- Cyranoski, D. (2016). CRISPR gene editing tested in a person. *Nature*, 539(7630), 479.
- Daya, S., & Berns, K. I. (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), 583-593. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-08>
- Dunbar, C. E., High, K. A., Joung, J. K., Kohn, D. B., Ozawa, K., & Sadelain, M. (2018). Gene therapy comes of age. *Science*, 359(6372). <https://doi.org/10.1126/science.aan4672>
- El-Mounadi, K., Morales-Florian, M. L., & Garcia-Ruiz, H. (2020). Principles, Applications, and Biosafety of Plant Genome Editing Using CRISPR-Cas9. *Frontiers in Plant Science*, 11(February), 1-16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00056>
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., & Danielsen, M. (1987). *Lipofection : A highly efficient , lipid-mediated DNA-transfection procedure*. 84(November), 7413-7417.
- Firth, A. L., Menon, T., Parker, G. S., Qualls, S. J., Lewis, B. M., Ke, E., Dargitz, C. T., Wright, R., Khanna, A., Gage, F. H., & Verma, I. M. (2015). Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Reports*, 12(9), 1385-1390. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.062>

- Frangoul, H., Altshuler, D., Cappellini, M. D., Chen, Y.-S., Domm, J., Eustace, B. K., Foell, J., de la Fuente, J., Grupp, S., Handgretinger, R., Ho, T. W., Kattamis, A., Kernysky, A., Lekstrom-Himes, J., Li, A. M., Locatelli, F., Mapara, M. Y., de Montalembert, M., Rondelli, D., ... Corbacioglu, S. (2021). CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *New England Journal of Medicine*, 384(3), 252-260. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2031054>
- Gallo, R. C. (1986). The First Human Retrovirus the groundwork for identifying the related virus that causes. *Scientific American*, 255(6), 88-101.
- Gilboa, E. (1986). Retrovirus vectors and their uses in molecular biology. *BioEssays*, 5(6), 252-257. <https://doi.org/10.1002/bies.950050605>
- González-Lamuño Leguina, D., & García Fuentes, M. (2008). Enfermedades de base genética. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 31(SUPPL. 2), 105-126. <https://doi.org/10.4321/s1137-66272008000400008>
- Greely, H. T. (2019). CRISPR'd babies: Human germline genome editing in the «He Jiankui affair». *Journal of Law and the Biosciences*, 6(1), 111-183. <https://doi.org/10.1093/jlb/lisz010>
- Griffiths, D. J. (2001). Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome Biology*, 2(6), 1-5. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-6-reviews1017>
- Hollon, T. (2000). Researchers and regulators reflect on first gene therapy death. *Nature Medicine*, 6(1), 6. <https://doi.org/10.1038/71545>
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). *CRISPR – Cas9 Structures and Mechanisms*. 505-531.
- Khadempar, S., Familghadakchi, S., Motlagh, R. A., Farahani, N., Dashtiahangar, M., Rezaei, H., & Gheibi Hayat, S. M. (2019). CRISPR–Cas9 in genome editing: Its function and medical applications. En *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 234, Número 5, pp. 5751-5761). <https://doi.org/10.1002/jcp.27476>
- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: The present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8), 3173-3178. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>
- Krause, B. D. S., Fackler, M. J., Civin, C. I., & May, W. S. (1996). Society of. *Discovery*, 87(1).
- Lander, E. S. (2016). The Heroes of CRISPR. *Cell*, 164(1-2), 18-28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.041>

- Lanza, F., Healy, L., & Sutherland, D. R. (2001). Structural and functional features of the CD34 antigen: An update. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 15(1), 1-13.
- Liu, C., Zhang, L., Liu, H., & Cheng, K. (2017). Delivery Strategies for CRISPR-Cas9 Gene-Editing Systems. *HHS Public Access J Control Release.*, 266(816), 17-26.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.012.Delivery>
- Liu, H., Fu, Y., Jiang, D., Li, G., Xie, J., Cheng, J., Peng, Y., Ghabrial, S. A., & Yi, X. (2010). Widespread Horizontal Gene Transfer from Double-Stranded RNA Viruses to Eukaryotic Nuclear Genomes. *Journal of Virology*, 84(22), 11876-11887. <https://doi.org/10.1128/jvi.00955-10>
- Lu, Y. (2018). A phase I clinical study of PD-1 knockout engineered T cells treating patients with advanced Non-Small Cell Lung Cancer Protocol No. : MHC-001. *Chengdu MedGenCell*, 1(9), 126.
- Lu, Y., Xue, J., Deng, T., Zhou, X., Yu, K., Deng, L., Huang, M., Yi, X., Liang, M., Wang, Y., Shen, H., Tong, R., Wang, W., Li, L., Song, J., Li, J., Su, X., Ding, Z., Gong, Y., ... Mok, T. (2020). Safety and feasibility of CRISPR-edited T cells in patients with refractory non-small-cell lung cancer. *Nature Medicine*, 26(5). <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0840-5>
- Ma, H., Marti-Gutierrez, N., Park, S. W., Wu, J., Lee, Y., Suzuki, K., Koski, A., Ji, D., Hayama, T., Ahmed, R., Darby, H., Van Dyken, C., Li, Y., Kang, E., Park, A. R., Kim, D., Kim, S. T., Gong, J., Gu, Y., ... Mitalipov, S. (2017). Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*, 548(7668), 413-419. <https://doi.org/10.1038/nature23305>
- Mars, T., Strazisar, M., Mis, K., Kotnik, N., Pegan, K., Lojk, J., Grubic, Z., & Pavlin, M. (2015). Electrotransfection and Lipofection Show Comparable Efficiency for In Vitro Gene Delivery of Primary Human Myoblasts. *Journal of Membrane Biology*, 248(2), 273-283.
<https://doi.org/10.1007/s00232-014-9766-5>
- Michael R. Knowles, M.D., and Peter R. Durie, M. D. (2002). What Is Cystic Fibrosis? *The New England Journal of Medicine*, 347(6), 439-442.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174-182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Mollanoori, H., & Teimourian, S. (2018). Therapeutic applications of CRISPR/Cas9 system in gene therapy. *Biotechnology Letters*, 40(6), 907-914. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2555-y>
- Monteys, A. M., Ebanks, S. A., Keiser, M. S., & Davidson, B. L. (2017). CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele In Vitro and In Vivo. *Molecular Therapy*, 25(1), 12-23.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.11.010>

- Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L., & Strohl, W. R. (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs*, 31(4), 317-334. <https://doi.org/10.1007/s40259-017-0234-5>
- Posada De la Paz, M., Martín-Arribas, C., Ramírez, A., Villaverde, A., & Abitua, I. (2008). [Rare diseases. Concept, epidemiology and state of the question in Spain]. *Anales del sistema sanitario de Navarra*, 31 Suppl 2, 9-20. <https://doi.org/10.4321/S1137-66272008000400002>
- Qing, K., Li, W., Zhong, L., Tan, M., Hansen, J., Weigel-Kelley, K. A., Chen, L., Yoder, M. C., & Srivastava, A. (2003). Adeno-Associated Virus Type 2-Mediated Gene Transfer: Role of Cellular T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase in Transgene Expression in Established Cell Lines In Vitro and Transgenic Mice In Vivo. *Journal of Virology*, 77(4), 2741-2746. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.4.2741-2746.2003>
- Rees, D. C., Williams, T. N., & Gladwin, M. T. (2010). Sickle-cell disease. *The Lancet*, 376(9757), 2018-2031. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61029-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61029-X)
- Robert C. Stern, M. D. (1997). *The Diagnosis of Cystic Fibrosis*. 487-491.
- Rubinsky, B. (2007). Irreversible electroporation in medicine. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 6(4), 255-259. <https://doi.org/10.1177/153303460700600401>
- Scully, R. (2000). Role of BRCA gene dysfunction in breast and ovarian cancer predisposition. *Breast Cancer Research*, 2(5), 324-330. <https://doi.org/10.1186/bcr76>
- Seoane, J., Yankelevich, T., Dechesne, A., Merkey, B., Sternberg, C., & Smets, B. F. (2011). An individual-based approach to explain plasmid invasion in bacterial populations. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(1), 17-27. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00994.x>
- Shin, J. W., Kim, K. H., Chao, M. J., Atwal, R. S., Gillis, T., MacDonald, M. E., Gusella, J. F., & Lee, J. M. (2016). Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. *Human Molecular Genetics*, 25(20), 4566-4576. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw286>
- Soucy, S. M., Huang, J., & Gogarten, J. P. (2015). Horizontal gene transfer: Building the web of life. *Nature Reviews Genetics*, 16(8). <https://doi.org/10.1038/nrg3962>
- Svoboda, J., Hejnar, J., Geryk, J., Elleder, D., & Vernerová, Z. (2000). Retroviruses in foreign species and the problem of provirus silencing. *Gene*, 261(1). [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00481-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00481-9)
- Verma, I. M., & Somia, N. (1997). Gene therapy - Promises, problems and prospects. *Nature*, 389(6648), 239-242. <https://doi.org/10.1038/38410>
- Wu, J., Zhao, W., Zhong, L., Han, Z., Li, B., Ma, W., Weigel-Kelley, K. A., Warrington, K. H., &

- Srivastava, A. (2007). Self-complementary recombinant adeno-associated viral vectors: Packaging capacity and the role of Rep proteins in vector purity. *Human Gene Therapy*, 18(2). <https://doi.org/10.1089/hum.2006.088>
- Xiao, X., Li, J., & Samulski, R. J. (1996). Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *Journal of virology*, 70(11), 8098-8108. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.11.8098-8108.1996>
- Yamano, S., Dai, J., & Moursi, A. M. (2010). Comparison of transfection efficiency of nonviral gene transfer reagents. *Molecular Biotechnology*, 46(3), 287-300. <https://doi.org/10.1007/s12033-010-9302-5>
- Yang, H., Jaeger, M. L., Walker, A., Wei, D., Leiker, K., & Weitao, T. (2018). Break breast cancer addiction by CRISPR/Cas9 genome editing. *Journal of Cancer*, 9(2), 219-231. <https://doi.org/10.7150/jca.22554>
- You, L., Tong, R., Li, M., Liu, Y., Xue, J., & Lu, Y. (2019). Advancements and Obstacles of CRISPR-Cas9 Technology in Translational Research. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 13(June), 359-370. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.02.008>
- Zaiss, A.-K., Liu, Q., Bowen, G. P., Wong, N. C. W., Bartlett, J. S., & Muruve, D. A. (2002). Differential Activation of Innate Immune Responses by Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors. *Journal of Virology*, 76(9), 4580-4590. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.9.4580-4590.2002>