



TRABAJO FIN DE GRADO

EDICIÓN DE GENES MEDIANTE CRISPR-Cas9: MÁS QUE CORTAR Y PEGAR

Pablo Fernández Palacios
Universidad de Sevilla
Facultad de Farmacia
Doble Grado en Farmacia y Óptica y Optometría.
Curso académico 2018-2019



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO

DOBLE GRADO EN FARMACIA Y ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

**EDICIÓN DE GENES MEDIANTE CRISPR-Cas9: MÁS QUE
CORTAR Y PEGAR**

Revisión bibliográfica

**Autor:
Pablo Fernández Palacios**

**Tutora:
Eloísa Pajuelo Domínguez**

Departamento de Microbiología y Parasitología

Sevilla, Julio de 2019

ABREVIATURAS

Cas (CRISPR-associated): genes o proteínas asociados a CRISPR

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats): secuencias palindrómicas cortas repetidas regularmente interespaciadas

CRISPR-Cas: secuencias palindrómicas cortas repetidas regularmente interespaciadas asociadas a nucleasas Cas

cr-ARN (CRISPR ARN): ARN transcrito de CRISPR

dCas (DeadCas9): Cas9 sin actividad nucleasa.

DSB (Double-Strand Break): doble corte en la cadena

HDR (Homology-Directed Repair): Recombinación homóloga directa

nCas9 (Nickase 9): Cas9 mutada para que solo escinda una hebra de ADN

NHEJ (Non-Homologous End Joining): Recombinación no homóloga.

HNH: dominio nucleasa de Cas9 que escinde la cadena complementaria al cr-ARN

PAM (Protospacer Adjacent Motif): motivo adyacente al protoespaciador

pre-crARN: precursor del cr-ARN

RuvC: dominio nucleasa de Cas9 que escinde la cadena complementaria al cr-ARN

sgARN: ARN guía utilizado en terapia génica con sistemas CRISPR-Cas9

tracr-ARN: ARN transactivador

TALEN (Transcription Activator Like Effector Nucleases): nucleasas tipo activadores de transcripción

ZFN (Zinc Finger Nucleases): nucleasas de dedos de zinc

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Los ácidos nucleicos cómo agentes terapéuticos.....	2
1.2 Terapia génica.....	2
1.3 Nucleasas de edición génica	4
1.4 Interés y oportunidad del trabajo	5
2. OBJETIVOS.....	6
3. METODOLOGÍA	6
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4.1 CRISPR-Cas9. Un hallazgo sorprendente	7
4.2 Tipos de sistemas CRISPR-Cas9.....	10
4.3 CRISPR-Cas en procariontas.....	11
4.3.1 Adaptación.....	11
4.3.2 Expresión.....	12
4.3.3 Interferencia.....	13
4.4 CRISPR-Cas9 como terapia génica	15
4.4.1 Mecanismos de reparación de ADN en eucariotas.....	15
4.4.2 Diseño del sistema CRISPR-Cas9 como terapia génica.....	16
4.4.2.1 Codificados en plásmidos	16
4.4.2.2 ARNm de Cas9 y sgARN	17
4.4.2.3 Complejo efector.....	17
4.4.3 Entrega de la copia correcta del gen.....	17
4.5 Vectores usados en CRISPR.....	18
4.6 Ventajas frente a otros tipos de terapia génica.....	20
4.7 Desventajas de la CRISPR-Cas y posibles soluciones	21
4.7.1 Efectos off-target	22
4.7.2 Baja eficiencia HDR.....	23
4.7.3 Anticuerpos anti-CRISPR	24
4.8 Enfermedades tratadas	25
4.8.1 Aplicaciones en terapia génica ocular	26
4.9 Perspectivas futuras y aspectos éticos	29
5. CONCLUSIONES	30
6. BIBLIOGRAFÍA.....	31

RESUMEN

En esta revisión se exponen las características y aplicaciones de CRISPR-Cas9, un sistema inmune adaptativo propio de algunas especies de bacterias y arqueas que lo utilizan para defenderse de bacteriófagos. Fue descubierto por el doctor español Francisco Mojica cuando se encontraba investigando sobre un tipo de arquea en las salinas de Santa Pola (Alicante).

El mecanismo inmune de estos sistemas consta de tres fases donde un ARN guía forma un complejo proteico con una proteína nucleasa llamada Cas9 para así poder escindir el ADN del organismo exógeno y evitar su infección. Debido a la simpleza de su mecanismo, CRISPR-Cas9 lleva siendo utilizado por diversos grupos de investigadores desde 2013 con el objetivo de convertirse en una nueva herramienta de terapia génica que permita modificar el genoma de personas que sufran enfermedades con componente genético. El propósito es introducir los componentes en un vector, viral o no viral, que sea capaz de alcanzar la célula diana y cortar selectivamente una secuencia del ADN que posteriormente será reparada por los métodos de recombinación HDR Y NHEJ.

Los sistemas CRISPR-Cas9 presentan numerosas ventajas frente a otros tipos de terapia génica como ZFN o TALEN como son su bajo coste y su fácil diseño. Sin embargo, la reparación del gen anómalo y los cambios no deseados en el genoma son aspectos que los investigadores deberán de solventar para conseguir una herramienta biológica segura y eficaz.

Por último, se recoge información sobre los últimos avances hasta la fecha y sobre los ensayos preclínicos basados en este sistema, profundizando en las enfermedades hereditarias retinianas debido a las características particulares del ojo que lo convierten en un órgano ideal para ser tratado con sistemas CRISPR-Cas9.

Palabras claves: CRISPR-Cas, terapia génica, ARN guía, Cas9, enfermedades retinianas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los ácidos nucleicos cómo agentes terapéuticos

Tras el establecimiento de la estructura de doble hélice de ADN por Watson y Crick en 1953 y el desciframiento del código genético una década después, se dio paso a una etapa de revolución biológica. Posteriormente W. Arber, D. Nathans y H. Smith introdujeron las enzimas de restricción en 1962 con las que se daba comienzo a diseñar la manera de manipular el ADN.

Debido a que las células procariontas son más simples estructuralmente que las eucariotas, se centraron los estudios en las mismas. Los primeros experimentos científicos para manipular ADN humano en bacterias datan de 1973 cuándo Stanley Cohen y Hebert Boyer lograron introducir material genético de origen humano en un plásmido bacteriano y que éste tuviera capacidad de replicación en la bacteria. (Gómez-Márquez, 2013). Es así como nace la ingeniería genética con el objetivo de realizar cambios en el genoma de células eucariotas.

Con la secuenciación del primer genoma bacteriano en 1977 llegó la primera proteína humana recombinante, la somatostatina. Fueron los investigadores de la empresa Genentech quienes lograron sintetizar esta proteína pequeña, de solo 14 aminoácidos, en *Escherichia coli*. (Curtis *et al.*, 2015). Posteriormente, hubo multitud de avances que ayudaron al desarrollo de las aplicaciones de la ingeniería genética hasta que en el año 2001 se consiguió secuenciar por completo el genoma humano. De esta forma, se obtuvo la información necesaria para sintetizar cualquier proteína de interés.

1.2 Terapia génica

En 1990, el considerado padre de la terapia génica W. French Anderson, estableció como objetivo de esta “el tratamiento de enfermedades hereditarias graves para las que hay pocas esperanzas de encontrar cura por métodos tradicionales”. Entre todas las enfermedades a tratar, la terapia génica va destinada principalmente a aquellas que sean monogénicas, es decir, que sean producidas por la alteración de un único gen cuya reparación o sustitución podría ser eficaz para curar la enfermedad o aliviar los síntomas. En la actualidad existen más de 5000 enfermedades monogénicas conocidas, pero sólo unas cuantas de ellas han sido abordadas por terapia génica cómo son la

fibrosis quística, hemofilia, Distrofia muscular de Duchenne, etc. (Baruteau *et al.*, 2017).

Por ello, los tratamientos biológicos destinados a enfermedades multigénicas como el cáncer o la diabetes y las enfermedades infecciosas como el VIH, no se consideraron terapia génica en un primer momento. No obstante, desde hace más de dos décadas se están realizando ensayos clínicos para lograr tratamientos eficaces con terapia génica para diversos tipos de cáncer. Como se puede observar en la **Figura 1**, el cáncer es la indicación a la que va dirigida la mayor parte de ensayos clínicos basados en terapia génica en el pasado año. La distinta naturaleza de los factores predisponentes para que se formen células cancerígenas dificulta mucho los avances en esta área (Akbulut *et al.*, 2014) aunque existen varios medicamentos de terapia génica autorizados para ciertos tipos de cáncer por la EMA (European Medicines Agency) y la FDA (Food and Drug Administration) como son Imlygic en 2015 y Kymriah en 2017. No obstante, han sido muy pocos los pacientes tratados con este tipo de terapia debido a su alto coste que los hacen inasumibles por los sistemas de salud de los diferentes países.

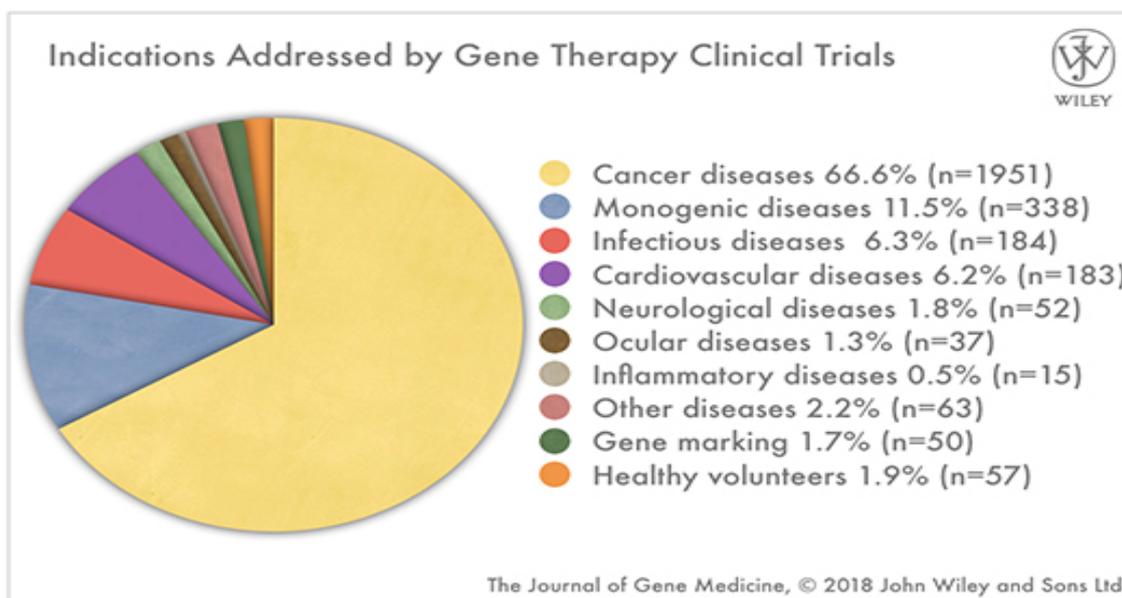


Figura 1. Distribución en número y porcentajes de las indicaciones dirigidas en los ensayos clínicos basados en sistema de terapia génica en el año 2018. Tomado de: Gene Therapy Clinical Trials Worldwide (<http://www.abedia.com/wiley/indications.php>)

En concreto, con la introducción de material genético en las células del huésped se pueden perseguir los siguientes fines:

- Expresar un gen, lo que conlleva a la obtención de una nueva proteína.
- Intervenir en la expresión de un gen impidiendo la síntesis de una proteína.

- Reparación de un gen, sustituyéndolo total o parcialmente por uno correcto. Esta función es la única que permite corregir una anomalía por un gen (del Pozo *et al.*, 2018).

El fundamento de la terapia génica es simple, trata de la utilización de un sistema de expresión o vectores en el que se introduce un gen o genes, denominados transgenes, que a su vez se introduce en la célula diana. De esta forma, el sistema de expresión sintetiza la proteína codificada por el transgén en la célula diana. Dicho proceso recibe el nombre de transfección (Urtti, 2009).

1.3 Nucleasas de edición génica

Las primeras enzimas con actividad nucleasa se descubrieron entre los años 60 y 70 por los científicos W. Arber, H. Smiths y D. Nathans que usaron el término de enzimas de restricción o restrictasas para catalogar a enzimas encontradas en distintos microorganismos con capacidad de reconocer y realizar cortes en secuencias palindrómicas no metiladas de 4 a 8 pares de bases. Las bacterias que contenían estas enzimas las usaban como método de defensa frente a bacteriófagos (Morley, 2014). La aplicación más importante de estas enzimas es su participación en el proceso de la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR (Polymerase Chain Reaction). Esta técnica permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN que usará para secuenciar dicho fragmento o para clonarlo en plásmidos de bacterias. No obstante, estas enzimas no son viables como método de terapia génica ya que los cortes se encuentran demasiados restringidos.

En estos últimos años se ha ido desarrollando una serie de nucleasas de edición génica capaces de cortar selectivamente secuencias de ADN eucariota (Hsu *et al.*, 2014). Estas nucleasas de edición génica están compuestas por un dominio que es capaz de reconocer una secuencia específica de ADN (dominio de unión) y por unas nucleasas que cortan dicho ADN (dominio de rotura). Una vez obtenida dicha rotura del ADN, la reparación se puede realizar mediante dos métodos, recombinación homóloga y recombinación no homóloga. De esta forma se logra sustituir una proteína anómala por otra, realizando cambios en el genoma. Es lo que se conoce como edición o reparación génica que se posiciona como una nueva herramienta para el tratamiento de una gran cantidad de enfermedades.

Existen diferentes tipos de nucleasas de edición génica:

- Nucleasas de dedos de Zinc (ZFN) (Zinc Finger Nucleases)
- Nucleasas tipo activadoras de transcripción (TALEN) (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)
- Meganucleasas
- Nucleasas de secuencias palindrómicas cortas repetidas regularmente interespaciadas (CRISPR-Cas9) (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats).

1.4 Interés y oportunidad del trabajo

El potencial del sistema CRISPR-Cas9 como herramienta de edición génica es enorme ya que consta de componentes baratos y fáciles de obtener con los cuales podemos corregir cualquier secuencia anómala del genoma del ser humano. De esta manera, muchas de las enfermedades con componentes genéticos pueden ser tratadas con este sistema. El impacto del descubrimiento de estos sistemas se puede asemejar al que en su día generó el desarrollo de la técnica de la PCR allá por 1983, dando paso a la posibilidad de secuenciar el genoma humano. La revolución en el campo de la genética que ha causado el hallazgo de este sistema ha lanzado a multitud de centros de investigadores a centrar sus investigaciones en esta nueva técnica y una muestra de ello es el incremento del número de publicaciones sobre sistemas CRISPR-Cas9 desde su descubrimiento como herramienta de terapia génica en 2013 (**Figura 2**).

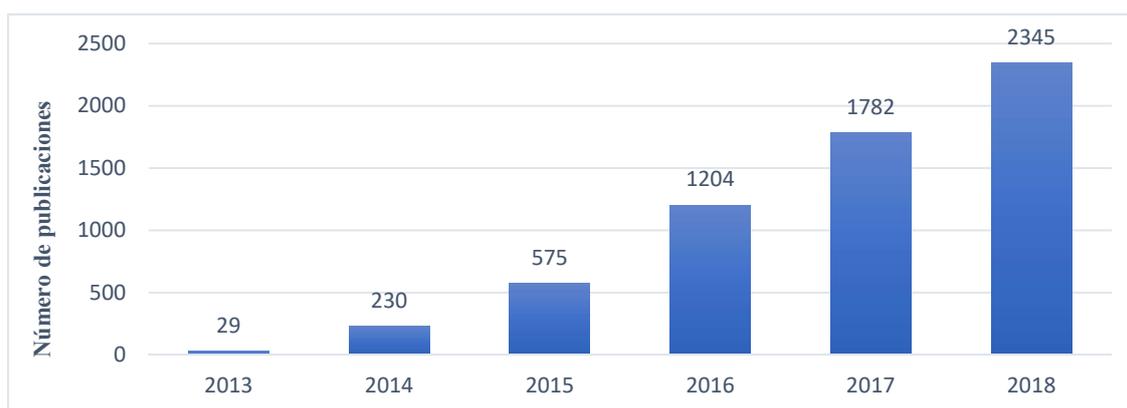


Figura 2. Número de publicaciones sobre sistemas CRISPR-Cas9 desde su descubrimiento como herramienta de edición génica en el motor de búsqueda Pubmed de la base de datos MEDLINE.

La novedad del sistema CRISPR-Cas9 y sus prometedoras expectativas, unido al hecho de que permite tratar enfermedades genéticas oculares, han sido los motivos para elegir este tema en el presente trabajo de fin de grado que combina contenido relacionado con los grados de Farmacia y Óptica y Optometría.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este Trabajo de Fin de Grado es la descripción del sistema de edición de genes CRISPR-Cas9 y sus aplicaciones en el campo de la terapia génica. En concreto se persiguen los siguientes objetivos particulares:

- Descripción de las nucleasas CRISPR-Cas9 y de su función natural en procariotas.
- Desarrollo de la tecnología CRISPR-Cas9 para la edición de genes en eucariotas.
- Aplicaciones de CRISPR-Cas9 en terapia génica, centrándose preferentemente en ejemplos de enfermedades oculares.
- Discusión sobre las ventajas e inconvenientes de esta técnica y de sus perspectivas futuras.

3. METODOLOGÍA

El presente trabajo de fin de grado es una revisión bibliográfica sobre un tema ampliamente documentado y con una elevada evidencia científica.

Para realizar esta revisión bibliográfica se ha llevado a cabo una búsqueda de información en los meses de febrero, marzo, abril y mayo de 2019 utilizando bases de datos como Medline, Scopus y los motores de búsqueda Pubmed y Google Scholar usando las siguientes palabras claves en español y en inglés: CRISPR-Cas9, CRISPR, gene therapy, ocular diseases. Por otro lado, se han consultados otros tipos de fuentes como son los libros “Terapia génica” y “Precision Medicine, CRISPR, and Genome Engineering”, normativa reguladora como Reales Decretos. Como criterios de inclusión, se eligieron artículos de los últimos cinco años para tener una información lo más actualizada posible. Dentro de estos artículos, se han preferido aquellos publicados en revistas internacionales de alto impacto y prestigio en el área de las ciencias y la biotecnología como: Science, Nature, Cell, etc. No obstante, también se usaron varios artículos que excedían estos criterios pero que han sido útiles para obtener información general del tema, aunque no actualizada. Como criterios de exclusión, se rechazaron artículos los cuales no tenían acceso al texto completo.

Este método de terapia génica ha tenido una gran repercusión en los medios de comunicación por lo que también se han incluido en la búsqueda bibliográfica para este trabajo la conferencia “El futuro x venir” (Mojica y Montoliu, 2018) y artículos de

prensa para conocer las noticias más actuales sobre todo lo que concierne al sistema CRISPR-Cas9, con idea de captar el impacto mediático de esta técnica o su repercusión a nivel social, aunque no se haya podido contrastar toda la información (como por ejemplo la edición digital de El País, National Public Radio), así como en publicaciones más especializadas dentro del ámbito de la divulgación científica (MIT, Scienceline).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde su descubrimiento, el sistema CRISPR-Cas9 ha desbancado a las demás técnicas de terapia génica ya existentes como las nucleasas de dedos de zinc (ZFN), TALEN, Meganucleasas, etc., por sus enormes ventajas que se expondrán en este apartado.

El sistema CRISPR-Cas está presente en casi la mitad de las bacterias ya conocidas y en algunas arqueas. En general, cada especie procariota contiene un tipo determinado proteínas Cas que se nombra por las iniciales de la especie bacteriana seguido de la proteína Cas en cuestión. Por ejemplo, la Cas9 de *Staphylococcus aureus* se nombraría SaCas9. No todas las especies bacterianas ni todos los sistemas CRISPR-Cas se van a utilizar como método de terapia génica. Para que dicha tecnología bacteriana se pueda aprovechar en seres humanos primero hay que conocer detalladamente la maquinaria celular por la cual estas bacterias son capaces de hacer frente a las infecciones virales.

4.1 CRISPR-Cas9. Un hallazgo sorprendente

Aunque se habla de CRISPR-Cas9 como una técnica reciente, los primeros pasos se dieron hace más de treinta años. En muchos descubrimientos científicos está presente el azar y este no iba a ser una excepción (Mojica y Montoliu, 2018). El mecanismo se descubre en bacterias y arqueas, pero los investigadores establecen como objetivo aprovechar las características para que este sistema sea de gran utilidad en humanos.

Los primeros indicios de los sistemas CRISPR-Cas9 datan de 1987 cuando unos científicos japoneses de la Universidad de Osaka estaban investigando sobre el gen que producía la enzima Iap que participa en la conversión isoenzimática de la fosfatasa alcalina de la bacteria *Escherichia coli*. Se percataron de la existencia de secuencias repetidas de 29 nucleótidos espaciadas con la misma distancia entre sí a lo largo del ADN bacteriano (Ishino et al., 1987). Sin embargo, el desarrollo del sistema comienza en 1993 con Francisco Mojica, investigador de la Universidad de Alicante que se encontraba estudiando la capacidad de supervivencia de la arquea *Haloferax*

mediterranei en las salinas de Santa Pola (Alicante). Fue ahí donde Mojica encontró secuencias palindrómicas de 30 pares de bases repetidas e interespaciadas por secuencias únicas de 30 a 33 pares de bases y pensó que debería tener alguna función para la arquea. El investigador español no sabía el alcance de la herramienta que había descubierto por lo que siguió con sus investigaciones. En un primer momento, Mojica denominó a estas secuencias cortas repetidas y espaciadas como SRSR (Short Regularly Spaced Repeats) (Mojica y Montoliu, 2018).

En 2002, Mojica y el doctor Ruud Jansen, de la Universidad de Utrecht de los Países Bajos, acordaron nombrar a estas secuencias nucleotídicas como CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) (Jansen et al., 2002). En la misma investigación del doctor Jansen se llegó a varios puntos muy interesantes. Se demostró que estas repeticiones de nucleótidos no están presentes en eucariotas ni en virus, solo en algunos tipos de bacterias y arqueas. Pero el hallazgo con más relevancia fue que, ligados a las secuencias o locus de CRISPR, se localizaron cuatro tipos de genes asociados. Estos genes recibieron el nombre de Cas (CRISPR-associated genes), que codifican nucleasas participes en el metabolismo de los ácidos nucleicos.

El 2005 fue un año importante para el desarrollo de la CRISPR-Cas9. En primer lugar, el grupo del doctor Mojica concluyó que las secuencias espaciadoras provenían de secuencias genéticas ya existentes tanto de origen cromosómico (35%) como de origen extracromosómico (65%). Este último origen estaba ligado a fagos y plásmidos, ambas estructuras genéticas transmisibles (Castro, 2016). Con esta premisa, en la línea de las dos investigaciones, se planteó la hipótesis de que las secuencias CRISPR formaban un sistema que proporcionaban inmunidad frente al ADN exógeno como el de los bacteriófagos. La hipótesis de la inmunidad adaptiva fue aceptada en 2007 cuando el doctor Horvath y su equipo de investigadores de la empresa de alimentos Danisco que empleaban una especie de *Streptococcus* en sus alimentos, demostraron que las CRISPR participaban en dicho proceso inmunológico junto a ciertas proteínas Cas (Barrangou et al., 2007).

A partir de 2010 los hallazgos se aceleran en el tiempo. Investigadores de la Universidad de Laval (Canadá) y de la empresa Danisco demostraron que la proteína cas9 la proteína Cas9 (anteriormente llamada Cas5) lleva a cabo la escisión del ADN foráneo previo reconocimiento de un motivo adyacente al protoespaciador (denominado

PAM, de protospacer adjacent motif) (Garneau et al., 2010). En 2011 se logró transferir el sistema CRISPR-Cas9 de una bacteria a otra (Sapranauskas et al., 2011) y en 2012 varias investigaciones simultáneas concluyeron que la escisión llevada a cabo por la proteína Cas9 orientaba secuencias cortas de ARN que actúan como guía (Jinek et al., 2012).

Las investigadoras Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna fueron las primeras en ver el potencial de este sistema para generar cambios en seres humanos al estudiar el mecanismo de CRISPR-Cas9 completo en bacterias (Jinek et al., 2012). Sin embargo fue el grupo liderado por Feng Zhang del Instituto de Tecnología de Massachusetts (MIT) en Cambridge (EE.UU.) en ser el primero en conseguir adaptar el sistema CRISPR-Cas9 a células eucariotas, realizando modificaciones en el genoma de células de ratón (Cong et al., 2013). La **Figura 3** muestra los principales hitos en el conocimiento de CRISPR-Cas y su desarrollo como herramienta de edición génica.

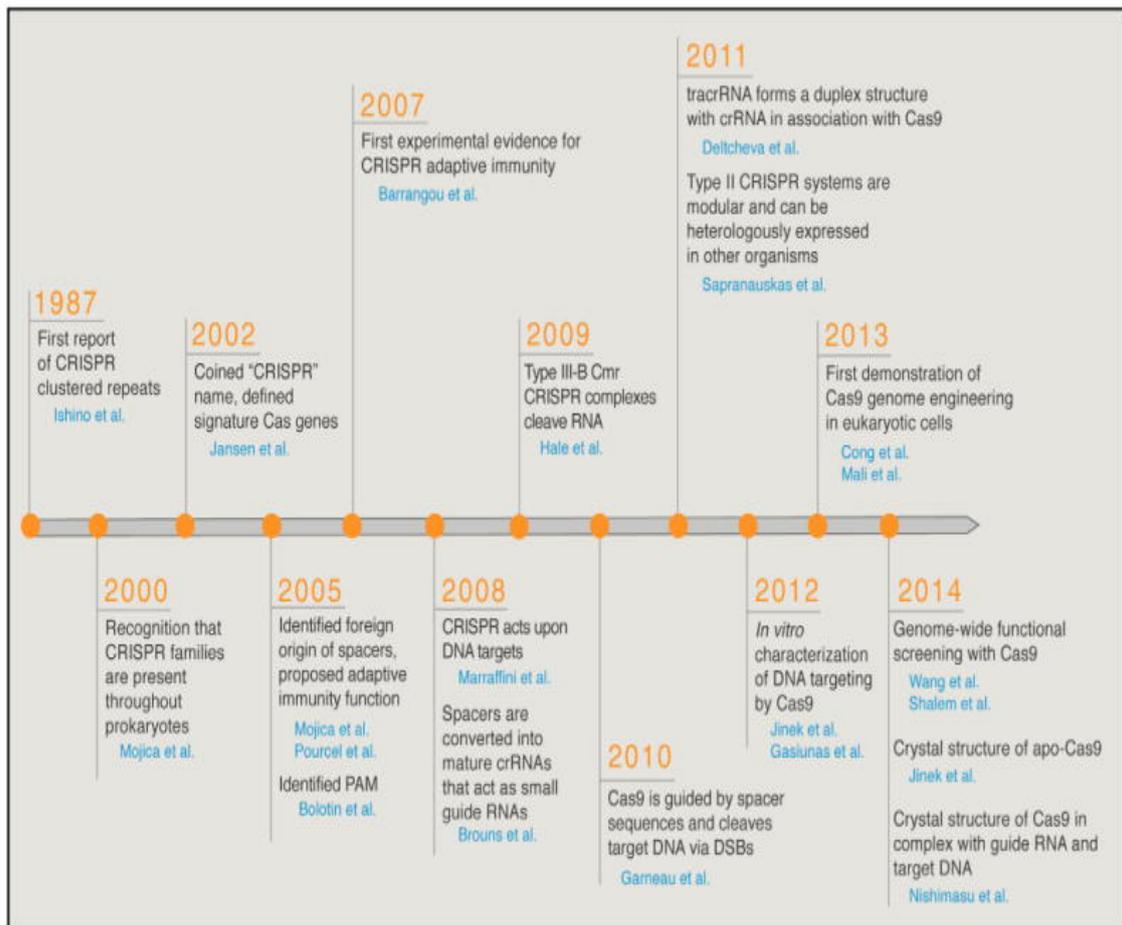


Figura 3. Acontecimientos más importantes durante el desarrollo del método de la CRISPR-Cas9. Tomado de: (Hsu et al, 2014).

4.2 Tipos de sistemas CRISPR-Cas9

En función de las proteínas Cas los sistemas de CRISPR-Cas se clasifican en seis tipos. Cada tipo, a su vez, se divide en subtipos que contienen proteínas diferenciadoras entre ellos. Los tres primeros son los que antes se descubrieron y de los que se tiene más información siendo los sistemas de tipo IV, V y VI más recientes y menos caracterizados a día de hoy.

La proteína característica del tipo I es la Cas3 la cual tiene dominios con función nucleasa y helicasa para degradar el ADN viral. Esta proteína forma parte del complejo efector Cascade (CRISPR-associated complex for antiviral defense) junto con otras proteínas y fragmentos de ARN de bacterias (Wright *et al.*, 2016). El tipo II contiene la Cas9 que actúa como complejo efector por lo que no necesita la asociación con otras proteínas para realizar cortes en el ADN invasivo. Por último, la Cas10 es la que diferencia al tipo III formando parte de un sistema efector similar al del tipo I (Lino *et al.*, 2018). Cabe destacar que todos los tipos de sistemas CRISPR tienen como diana el ADN salvo el subtipo III-B que realiza roturas en el ARN.

Entre todos los tipos de sistemas CRISPR-Cas los investigadores eligieron el tipo II como modelo para poder utilizar el sistema como herramienta de ingeniería genética. La elección se hizo en base a la simpleza de dicho tipo ya que para permite adaptarlo en un sistema de expresión más fácilmente. Además, se demostró que de todas las proteínas Cas, la Cas9 de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* son las que presentan mayor eficiencia en el corte de ADN (Charpentier *et al.*, 2015) (Makarova *et al.*, 2015).

Estos seis grupos se agrupan en dos clases en base a las unidades que forman los complejos efectores. Los sistemas CRISPR tipo I, III y IV pertenecen a la Clase 1 mientras que los tipos II, V y VI a la Clase 2 (Burmistrz y Pyrc, 2015). La **Figura 4** representa una clasificación de los sistemas CRISPR-Cas.

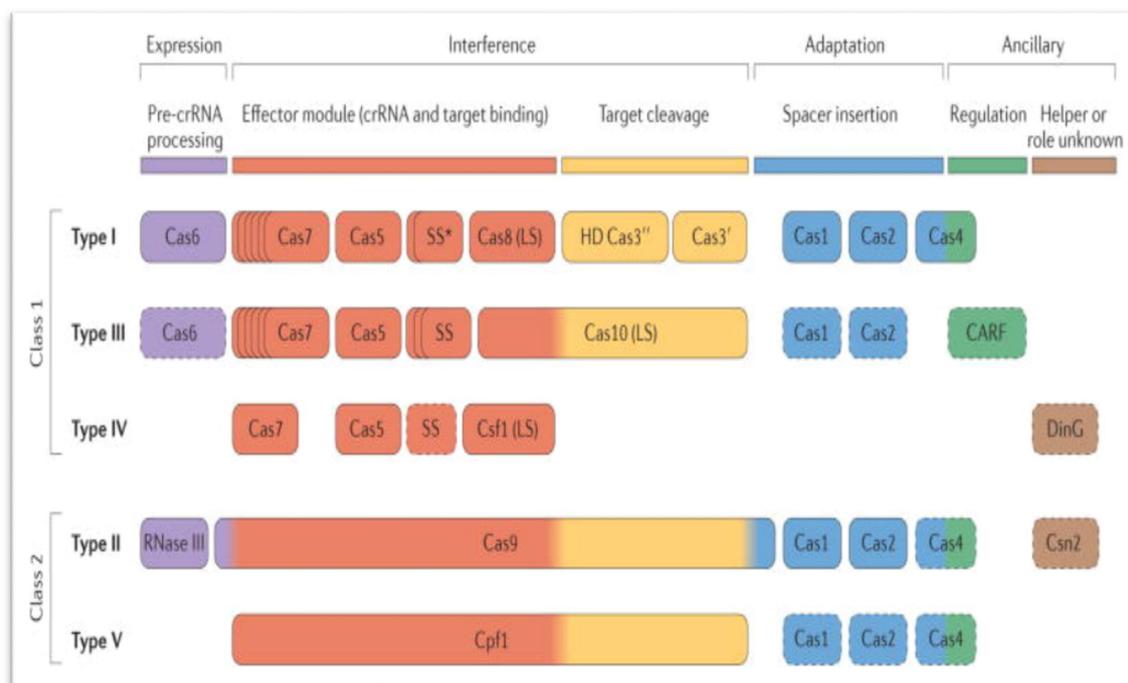


Figura 4. Clasificación funcional de las proteínas Cas. En color morado se encuentran las proteínas Cas que participan en la maduración del cr-ARN. El color rojo y amarillo representan las proteínas Cas que forman parte del complejo efector y del reconocimiento del material genético a escindir. Las proteínas Cas que intervienen en el proceso de adaptación están coloreadas en azul. El verde y el marrón representa otras proteínas que realizan otras funciones o funciones desconocidas. Tomado de: (Makarova *et al.*, 2015).

4.3 CRISPR-Cas en procariontas

La utilidad del sistema de CRISPR-Cas9 difiere mucho en función del tipo de células donde se localice. Las células procariontas lo usan como mecanismo de protección, dotando a la bacteria de inmunidad adquirida e impidiendo el ataque futuro de nuevos virus. En concreto, el proceso consta de tres etapas: adaptación, expresión e interferencia. El mecanismo de acción se basa en la introducción de secuencias virales de ADN que sirven como modelo para la obtención final de un complejo de ARN y proteínas que elimine dicho contenido genético. Las 3 etapas difieren según el tipo de sistema CRISPR que se considere.

4.3.1 Adaptación

En la primera fase se realiza la identificación de las secuencias virales de ADN catalogadas como “spacers” o espaciadores y su posterior incorporación al sistema CRISPR-Cas. Esta etapa no se ha llegado a caracterizar totalmente pero sí se conocen los elementos más importantes que aparecen en ella. Cada vez que un bacteriófago

consiga infectar dicha bacteria, esta integrará parte de su genoma viral para reconocer a dicho agente invasor ante una futura reinfección. Cada spacer tiene contiguo una secuencia de 3-5 nucleótidos llamada PAM (Protospacer Adjacent Motif). Esta secuencia PAM solo está presente en el ADN vírico por lo que no se incorpora al genoma bacteriano y es la secuencia que reconoce la Cas9 antes de escindir el ADN. (Jiang y Doudna, 2017). La secuencia PAM que se escoge como referencia es la que reconoce la proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes* y la constituye la secuencia 5'-NGG-3' siendo N cualquier nucleótido. En el sistema CRISPR tipo II las proteínas Cas1 y Cas2 participan en el reconocimiento, escisión y en la incorporación de los spacers virales al locus CRISPR. El resultado de este proceso es una leyenda de las infecciones que ha sufrido la bacteria a lo largo de su vida la cual se plasma en el locus de CRISPR bacteriano en secuencias víricas interespaciadas (spacers) entre sí por secuencias repetidas o “repeats” (Xiong *et al.*, 2016).

4.3.2 Expresión

En la segunda fase se produce la expresión del locus de CRISPR, que contiene secuencias de los spacers, de un ARN transactivador (tracr-ARN) y de las proteínas Cas. El resultado de dicho proceso es la expresión de las proteínas Cas, del tracr-ARN, y un precursor de ARN llamado pre-crARN que proviene de las secuencias contenidas en los spacers. (Kim *et al.*, 2017a) (**Figura 5**).

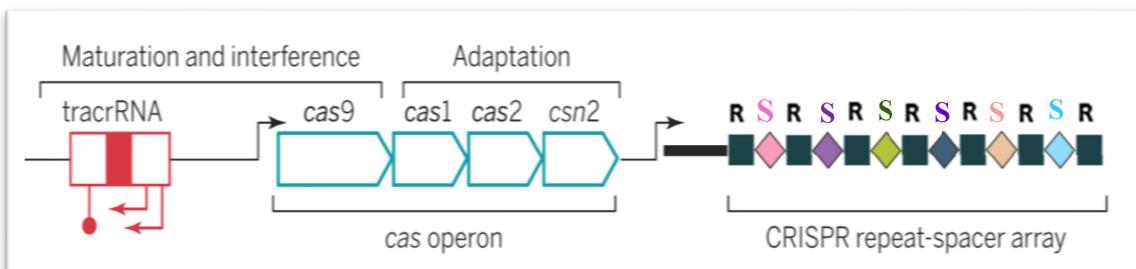


Figura 5. Contenido codificante del locus CRISPR. Contiene los genes que codifican para el tracr-ARN y las proteínas Cas, los distintos spacers (S) provenientes de las diferentes infecciones virales sufridas por la bacteria y las secuencias repetidas o repeats (R). A partir de las secuencias de los spacers se obtiene el pre-crARN. Modificado de: (Doudna y Charpentier, 2014).

El tracr-ARN es un fragmento de ARN de 24 nucleótidos que se une al precr-ARN por complementariedad de bases a los “repeats” contiguos a cada spacer viral formando híbridos de ARN. Este híbrido de ARN será procesado por la enzima Ribonucleasa III formando pequeños fragmentos de ARN maduros denominados cr-ARN que constarán,

cada uno, de un espaciador viral seguidos de una secuencia repetidora la cual está unida al tracr-ARN formando así el híbrido (tracr-ARN:cr-ARN) (Lino *et al.*, 2018). La transcripción de los spacers necesita que exista un “leader” o promotor para que se ponga en marcha el proceso.

4.3.3 Interferencia

Esta última fase se pone en marcha cuando un bacteriófago infecta de nuevo a la célula. El híbrido de ARN se une a la proteína Cas9 y se forma así el complejo efector denominado heteroduplex o complejo ternario (tracr-ARN: cr-ARN: Cas9). El tracr-ARN guiará al complejo hasta el sitio exacto del ADN viral donde la Cas9 deberá de realizar el corte. Una vez allí, el spacer que forma parte del cr-ARN se une a su secuencia homóloga viral por complementariedad de bases y da a lugar a un complejo cuaternario (tracr-ARN: cr-ARN: Cas9: ADN) (Tsang, 2017).

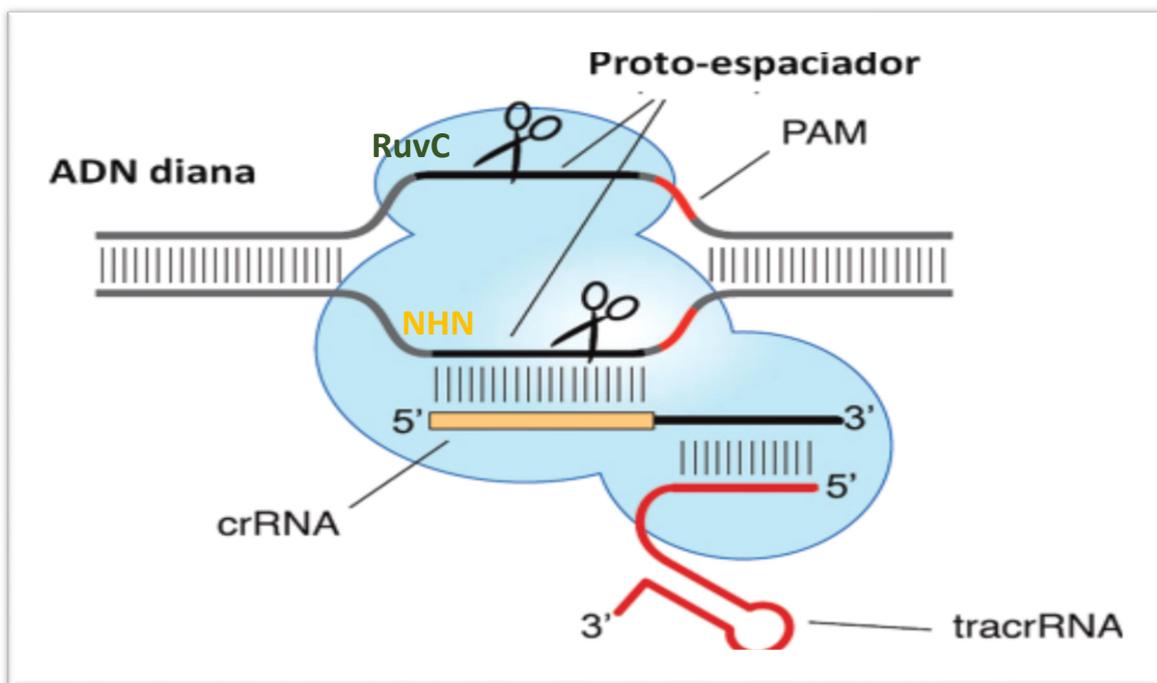


Figura 6. Fase de interferencia del sistema CRISPR-Cas9 que conlleva la eliminación del ADN del agente invasivo. Se puede observar la homología existente entre el spacer viral y el cr-ARN como de los repeats con el tracr-ARN. El dominio RuvC escinde la cadena de ADN viral no homóloga mientras que el dominio NHN hace lo propio con la cadena homóloga. Modificado de: (Jinek *et al.*, 2012).

El último paso es la generación de un corte en el ADN por parte de Cas9 el cual solo será posible si reconoce antes la secuencia PAM. Se ha demostrado que el tracr-ARN juega un papel muy importante en todo el proceso. Por un parte, es necesario para

agilizar la maduración del precr-ARN por la Ribonucleasa III. Por otra parte, es esencial para guiar a la Cas9 al lugar exacto donde deberá destruir el ADN foráneo.

La proteína Cas 9 está constituida por los dominios RuvC, NHN y PI. El proceso de destrucción del ADN viral comienza con el reconocimiento de la secuencia PAM por parte del dominio PI. Cuando se reconoce correctamente la señal, el heteroduplex (tracrARN: crARN: Cas9), con carga positiva, se inserta en un canal existente entre los dominios RuvC y NHN que se encuentra cargado negativamente (Nishimasu et al., 2014). Una vez allí, el dominio con actividad nucleasa RuvC es el encargado de realizar cortes sobre la cadena de ADN viral no complementario al cr-ARN mientras que el segundo dominio NHN los realiza sobre la secuencia de ADN complementario (Wang et al., 2016) (**Figura 6**). El resultado de dicho proceso es la generación de una rotura de ADN de doble cadena en su término anglosajón “Double Strand Break” (DSB) que desemboca en la destrucción del ADN vírico. El proceso global que constituye estas tres fases está representado en la **Figura 7**.

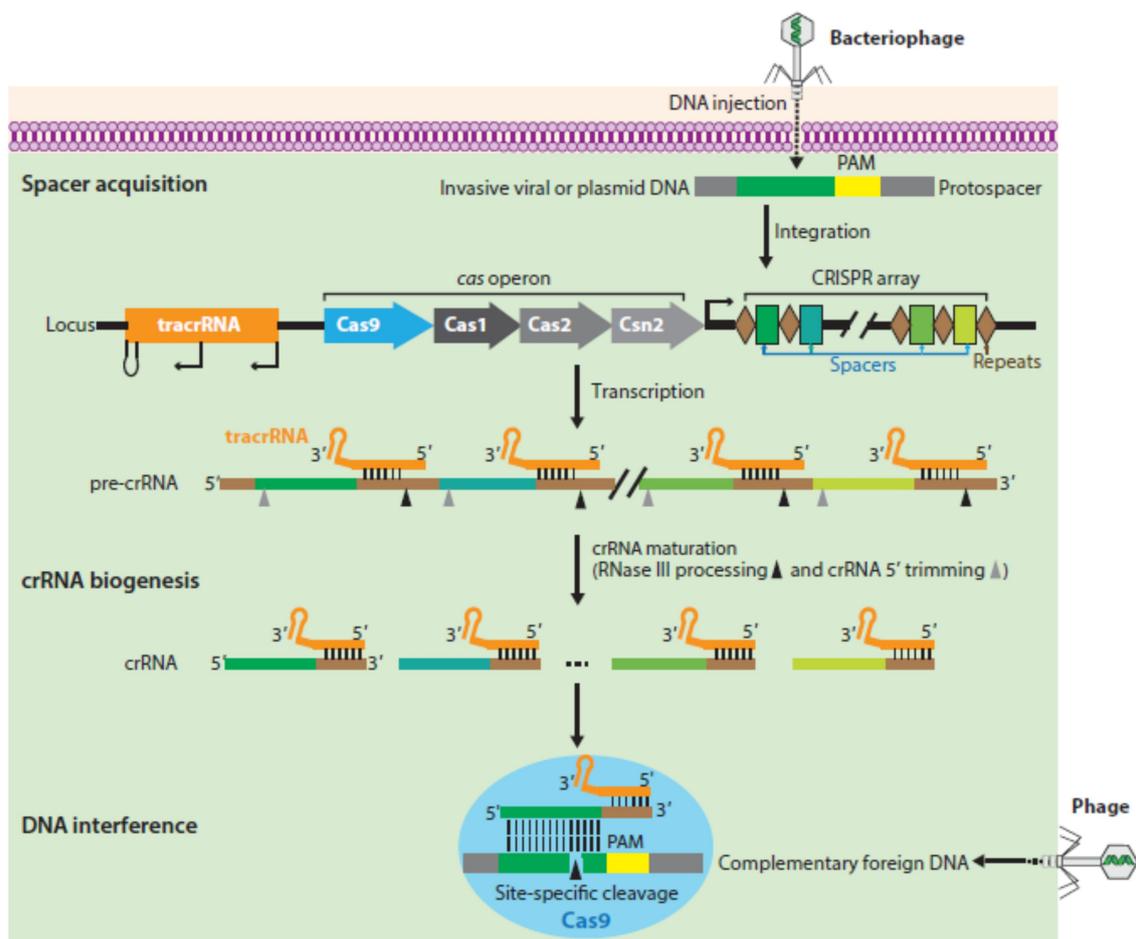


Figura 7. Representación esquemática de las tres fases que forman parte del proceso de defensa inmune de las bacterias frente a bacteriófagos. Tomado de: (Jiang y Doudna, 2017).

4.4 CRISPR-Cas9 como terapia génica

Como idea principal, para modificar el ADN eucariota mediante el sistema CRISPR-Cas9 bastaría con hacer llegar a la célula diana, a través de un vehículo adecuado, los dos componentes fundamentales del sistema: la proteína Cas9 y un ARN guía (sgARN) que simule la acción del híbrido de ARN presente en procariontes (formado por el tracrARN y el cr-ARN) (Liu *et al.*, 2019). La proteína Cas9 deberá de reconocer la secuencia PAM de la misma forma que lo hace en las bacterias. Tras la rotura del genoma eucariota en el sitio específico y la eliminación de la secuencia nucleotídica responsable, se introducirá una copia sana de dicha secuencia que sustituirá a la anómala. De esta forma ya se habrá editado genéticamente el organismo portando este la copia correcta del gen que provocaba la enfermedad. Por último, solo quedaría validar y comprobar que se ha llevado a cabo la corrección genética por cualquier método que conlleve la secuenciación del genoma del organismo diana.

4.4.1 Mecanismos de reparación de ADN en eucariotas

La idea de los investigadores era extrapolar el DSB que se genera en el genoma vírico por parte de la Cas9 a las células eucariotas. En ellas dicha rotura del genoma puede ser reparada por dos tipos de recombinación: la homóloga o también denominada Homology-Directed Repair (HDR) y no homóloga, Non-Homologous End Joining (NHEJ). Los dos mecanismos de recombinación se pueden observar en la **Figura 8**.

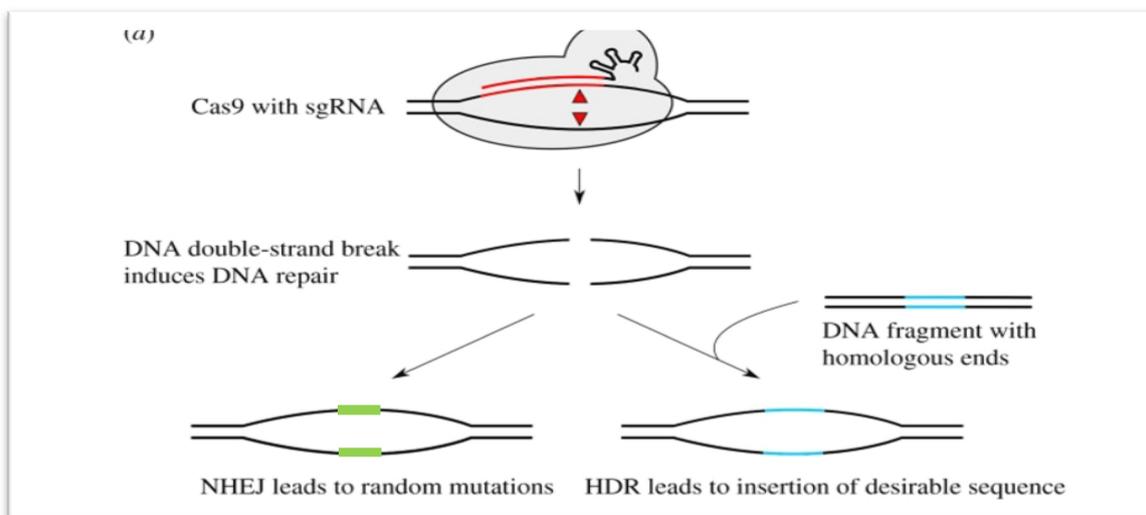


Figura 8. Esquema de los dos tipos de recombinación que presentan las células eucariotas: la recombinación homóloga (HDR) y la no homóloga (NHEJ). Se puede apreciar en la imagen el “template” (en azul) utilizado en la HDR. Modificado de: (Hille y Charpentier, 2016).

Por un lado, la NHEJ es el tipo de recombinación predominante en las células, aunque es más propensa a errores que otros tipos de recombinación ya que tras un DSB, se introduce o elimina nucleótidos cuando se produce la recombinación entre las dos cadenas de ADN dando a lugar a posibles inserciones o deleciones (denominadas “indels”) (Liu *et al.*, 2019). Si estos indels se producen en exones codificantes pueden ocasionar codones de parada produciendo el silenciamiento de genes o bien, mutaciones que produzcan proteínas anómalas. Por otro lado, la HDR es el método de reparación deseada para la terapia génica ya que es mucho más eficiente. En este tipo de recombinación se introduce un modelo o “template” exógeno que se insertará en el sitio generado por el DSB y deberá ser complementario a las secuencias que se encuentran alrededor del corte. De esta manera, se reduce la posibilidad de mutaciones (Tsang, 2017). No obstante, las células eucariotas disponen de los dos mecanismos reparadores, aunque la incidencia de NHEJ es mucho mayor que la de HDR.

4.4.2 Diseño del sistema CRISPR-Cas9 como terapia génica

Existen diferentes estrategias para hacer llegar los componentes del sistema CRISPR-Cas9 a la célula eucariota objetivo como son: codificados en plásmidos bacterianos, introducir ciertos componentes sintetizados y otros por sintetizar y, por último, añadir el complejo efector directamente en el citoplasma de la célula.

4.4.2.1 Codificados en plásmidos

La primera estrategia de ingeniería genética usando el sistema CRISPR-Cas9 es la de incluir los genes codificantes de la proteína Cas9 y del sgARN en un plásmido de origen bacteriano que tendrá que alcanzar el núcleo eucariota para poder expresar su contenido. De esta manera el organismo humano realiza la transcripción del ADN codificante del sgARN y de la Cas9 formándose los correspondientes ARN mensajeros (ARNm). Posteriormente se traduce en los ribosomas el ARNm que codifica la proteína Cas9. De esta forma ya tenemos dentro de la célula diana los dos componentes fundamentales del sistema CRISPR-Cas9 (Blenke *et al.*, 2016). Dicha estrategia es la más simple de todas además de ser la que menos probabilidad de sufrir transfección de material no deseado en la célula objetivo. No obstante, presenta varias desventajas como son los efectos off-target, es decir, posibles mutaciones en sitios fuera del ADN diana, así como la dificultad de introducir el plásmido en el interior del núcleo celular. Además, se necesita más tiempo que en las otras estrategias para obtener la Cas9 y el sgARN ya que es el

organismo eucariota el responsable de la formación de esos dos componentes (Liu *et al.*, 2017). Una vez sintetizados los componentes en el citoplasma se introducen de nuevo en el núcleo para realizar los cambios pertinentes en el ADN del organismo humano.

4.4.2.2 ARNm de Cas9 y sgARN

Otra alternativa al uso de plásmidos es introducir directamente en el citoplasma de la célula diana el ARNm de la Cas9 y el sgARN directamente. Por lo tanto, solo se tendría que llevar a cabo la traducción para obtener la Cas9. Comparando este método con el uso de plásmidos es cierto que de esta manera se consigue reducir los posibles efectos “off-target”, así como el tiempo de obtención de los componentes. Sin embargo, la poca estabilidad del ARN es una desventaja de este tipo de estrategia (Liu *et al.*, 2017).

4.4.2.3 Complejo efector

La última estrategia es la que más se ha estado investigando en los últimos años. En ella se trata de introducir directamente en el citoplasma de la célula diana el complejo efector que forma la Cas9 y el sgARN. Las ventajas de esta estrategia frente a las otras dos son bastantes: efecto más rápido, menos efectos off-target y menos toxicidad. En la actualidad existen varios vectores que incluyen en su interior dicho complejo ya sea viral o no-viral (Liu *et al.*, 2017).

4.4.3 Entrega de la copia correcta del gen

Una vez generado el DSB en la célula eucariota, la introducción de secuencia correcta en dicho genoma es el aspecto que está generando mayores problemas. En una reciente entrevista el biólogo e investigador del Centro Nacional de Biotecnología, Lluís Montoliu indicó que “las CRISPR cortan muy bien, pero los sistemas de reparación pegan muy mal. Pegar, todavía no sabemos”.

Esta es el área que más se está investigando en la actualidad y continuamente surgen nuevas alternativas para poder introducir el gen correcto. Hasta el momento, existen dos técnicas por la cual es viable la introducción del gen correcto en el genoma objetivo. En primer lugar, se pueden usar oligodesoxinucleótidos sintéticos monocatenarios (ssODN), es decir, una secuencia corta de ADN de una cadena, en el caso de querer insertar secuencias cortas de hasta 200 bases. En segundo lugar, la otra manera de realizarlo es mediante un ADN de doble cadena (dsADN) que admiten la inserción de

hasta varios miles de bases (Jacobi *et al.*, 2017). Ambos caminos de inserción de ADN constan de los denominados “brazos de homología”, complementarios a los extremos sin ligar generados por el DSB. Además, recientes estudios han demostrado la eficacia de los ADN monocatenarios largos (ssADN) como modelos para la HDR sin precisar esos brazos de homología (Yoshimi *et al.*, 2016).

4.5 Vectores usados en CRISPR

Es importante mencionar que toda la maquinaria celular expuesta anteriormente necesita un vehículo que haga llegar todo ese contenido a las células diana. Para conseguirlo se utilizan vectores que pueden ser de dos tipos: virales y no virales. Los vectores usados hasta la fecha que acoplan los sistemas CRISPR-Cas no difieren mucho con los empleados en otros tipos de terapia génica.

Los vectores virales no son más que virus que son capaces de portar genes que van a expresar su contenido en las células diana pero que han sido modificados genéticamente para que no se puedan replicar en el interior de ellas. Esta pérdida de la virulencia del virus se realiza editando los genes que codifican proteínas vitales para la replicación de dicho virus. El tipo de virus usado como vector va a depender de varios factores: si son virus de ADN o ARN, el tamaño de la secuencia a introducir, la célula diana, la duración de la expresión génica o la capacidad de integrar su contenido en el genoma diana. Los virus tipo adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, lentivirus son los más utilizados hasta el momento (Hsu *et al.*, 2015). Cabe resaltar que un tipo de virus adenoasociado es el que se usa como vector en Glybera®, el único medicamento aprobado como terapia génica *in vivo* por la EMA. Una alternativa a los vectores virales es el empleo de métodos físicos y químicos que permitan la entrada del contenido de los sistemas de terapia génica en la célula diana. Estos métodos constituyen los vectores no virales que intentan simular la acción transportadora de los virus.

Por un lado, los métodos físicos están basados en la introducción del material genético aplicando sobre las células fuerzas físicas que alteran la permeabilidad de sus membranas. Existen distintas técnicas basadas en métodos físicos: la microinyección, en la que se introduce el material genético directamente en el núcleo de las células mediante una micro aguja, la sonoporación que combina ultrasonidos para desestabilizar la membrana y microburbujas para incluir el contenido o la electroporación, donde se crean poros en la membrana celular, mediante impulsos eléctricos, por los cuales se

introducirán el material genético. Asimismo, es importante reseñar que los ensayos clínicos que han empleado dichos vectores han sido de tipo *ex vivo*. Por otro lado, existen métodos químicos que encapsulan en su interior el material genético a transferir mediante liposomas, polímeros o péptidos. Estos sistemas son más susceptibles a ser usados en terapias *in vivo* debido a su mayor facilidad de alcanzar las células del órgano o tejido diana (Lino *et al.*, 2018). Las principales ventajas e inconvenientes de los dos tipos de vectores están recogidas en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Ventajas e inconvenientes de los vectores virales y no virales.

VECTORES VIRALES	VECTORES NO VIRALES
Ventajas	Ventajas
Alta eficacia en la transfección.	No hay limitación en el tamaño del material genético a transferir.
	Fáciles de producir a gran escala.
Inconvenientes	Inconvenientes
Limitación en el tamaño del material genético a transferir.	Baja eficacia en la transfección.
Transferencias erróneas conducen a procesos de oncogénesis y mutagénesis.	La mayoría sólo se pueden administrar <i>in vitro</i> .
Limitación a la hora de purificar cantidades de vector para la aplicación terapéutica.	

Comparando los dos tipos de vectores, los vectores virales son los que más se han usado en los ensayos clínicos de terapia génica hasta la fecha. El motivo es su principal ventaja respecto a los vectores no virales; su alta eficacia en la transfección. Además, la integración en el genoma huésped es duradera lo que permite una expresión de los componentes codificados estable en el tiempo. Sin embargo, este aspecto también genera un problema como es la posibilidad de potenciar la aparición de tumores y mutaciones debidas a transfecciones de material no deseado. Los vectores no virales están constituyendo, cada vez más, una alternativa al uso de vectores virales. Su principal ventaja con respecto a los vectores virales es que permiten alojar en su interior material genético de mayor tamaño. En contraposición, su baja eficacia en la transducción lastra, por el momento, el empleo de estos sistemas como vehículos eficientes en terapia génica (del Pozo *et al.*, 2018).

4.6 Ventajas frente a otros tipos de terapia génica

Antes del descubrimiento del sistema CRISPR-Cas y de su posicionamiento como herramienta de terapia génica, los investigadores centraban sus estudios en los demás sistemas conocidos como “nucleasas de edición génica”. En este grupo se engloban las nucleasas de dedos de zinc (ZFN) y las nucleasas tipo activadores de transcripción (TALEN). Debido a su fácil diseño y su alta especificidad, los sistemas CRISPR-Cas han ocupado todo el foco para lograr una herramienta útil de ingeniería genética en un futuro.

Las primeras nucleasas de edición génica fueron las denominadas “dedos de zinc” o “tijeras moleculares” cuyo hallazgo data de 1996 (Kim *et al.*, 1996) en el seno de una investigación que buscaba lograr mayor especificidad de las enzimas de restricción. Para ello, las ZFN combinan la FokI como dominio de rotura y varios dedos de zinc que constituyen el dominio de reconocimiento y unión al ADN diana. Cada dedo de zinc contiene alrededor de 30 aminoácidos e identifica una región del genoma de tres pares de bases por lo que se suelen agrupar varios dedos de zinc para aumentar su eficacia y especificidad. La rotura del ADN corre a cargo de la enzima de restricción FokI que debe de encontrarse en forma de dímero para poder realizar el DSB (cada dímero realiza el corte en una de las cadenas del ADN). Las ZFN han demostrado ser efectivas escindiendo el ADN, no obstante, su principal inconveniente es que debe de reconocer obligatoriamente la secuencia 5'-GNNGNNGNN-3' (N: cualquier nucleótido) presente en el ADN diana a escindir (Lee *et al.*, 2016).

Posteriormente, las nucleasas tipo activadores de transcripción (TALEN) fueron halladas en el patógeno de plantas *Xantomonas campestris* en 2009. Las TALEN también usan la FokI como dominio de rotura del ADN, pero se diferencia de las ZFN en el dominio de unión, usando conjuntos de 30-35 aminoácidos denominados TALE. Estos sistemas son más específicos que sus predecesoras ya que reconocimiento del ADN diana se realiza por pares de bases a diferencia de las ZFN que usan un conjunto de dedos de zinc que identifican por separado tres pares de bases (del Pozo *et al.*, 2018). Aunque su diseño es relativamente sencillo, es un proceso largo y costoso que hacen inviable, por el momento, el empleo de los sistemas TALEN en edición genómica (LaFountaine *et al.*, 2015). A continuación, en la **Tabla 2** aparecen las diferencias entre los tres tipos de terapia génica que se han expuesto con anterioridad.

Tabla 2. Características de los sistemas de terapia génica: nucleasas de dedos de zinc (ZFN), nucleasas tipo activadores de transcripción (TALEN) y nucleasas de secuencias palindrómicas cortas repetidas regularmente interespaciadas (CRISPR-Cas9).

	ZFN	TALEN	CRISPR-Cas9
Unión al ADN	Dedos de Zinc	Proteínas TALE	ARN guía
Longitud de la secuencia de reconocimiento	18-36 pb	30-35 pb	22 pb
Escisión del ADN	FokI	FokI	Cas9
Diseño	Muy complejo y costoso	Complejo y costoso	Sencillo y rápido. Menos costoso
Toxicidad	Variable	Baja	Baja
Modificación de forma simultánea distintas partes del genoma	No	No	Si

En primer lugar, la principal ventaja del sistema CRISPR-Cas frente a ZFN y TALEN radica en el diseño de los componentes de identificación del ADN. El proceso de desarrollo de los dedos de zinc y de las proteínas TALE es caro y laborioso ya que necesita técnicas de ingeniería proteica y del ensamblaje de sus dominios. El desarrollo de sistemas CRISPR-Cas9 consta de una sola etapa, la obtención del ARN guía que deberá ser complementario a una de las cadenas pertenecientes a la secuencia que se pretende a escindir. El rápido diseño de estos ARN guías permite la opción de introducir en la célula diana diferentes sistemas CRISPR-Cas dirigidos a secuencias distintas del genoma (Eid y Mahfouz, 2016). En segundo lugar, los ensayos clínicos basados en técnicas de CRISPR-Cas9 han resultado ser menos citotóxicos, en general, que los realizados con ZFN o TALEN. En tercer lugar, el tamaño del ARN guía es mucho menor que el de los dedos de zinc y de la proteína TALE lo que ocasiona que sea más fácil de introducir en el sistema de expresión (Bailou *et al.*, 2018).

4.7 Desventajas de la CRISPR-Cas y posibles soluciones

Aunque los sistemas CRISPR-Cas han supuesto una nueva esperanza para la obtención de herramientas de edición génica útiles y eficaces aún tienen inconvenientes por saldar. Asimismo, desde que los investigadores tuvieron constancia de estas desventajas se han puesto manos a la obra para poder solucionarlas. Fruto de sus estudios han podido empear nuevas técnicas y sistemas para poder hacer frente a los inconvenientes de los sistemas CRISPR-Cas.

4.7.1 Efectos off-target

Las posibles modificaciones no deseadas que se producen en el genoma del organismo diana cuando los componentes del sistema CRISPR-Cas se encuentran en él constituye el principal obstáculo que tienen que superar los investigadores para que la herramienta CRISPR-Cas sea útil en un futuro. Estas modificaciones reciben el nombre de efectos “off-target” (fuera de la diana). Por ejemplo, en la fase de reconocimiento de secuencia diana por el sgARN basado en el sistema CRISPR-Cas9 de *Streptococcus pyogenes* se toleran unos errores de entre 2 y 3 pares de bases. El hecho de que este sistema por sí solo no sea cien por cien eficaz produce la aparición de ciertas modificaciones en secuencias que no son las que nos interesan editar. Estas modificaciones, si se producen en secuencias codificantes, pueden producir el silenciamiento o activaciones de genes pudiendo ser una fuente potencial de mutaciones (Cong *et al.*, 2013). Además, los efectos off-target son impredecibles por lo que distintos investigadores han centrado sus estudios en resolver este problema.

En el seno de estas investigaciones es donde nace las nickasas (nCas9) que no son más que dos proteínas Cas9 las cuales han sufrido un proceso de modificación en uno de sus dominios catalíticos (RuvC o NHN) para que solo escinda una hebra de las dos que componen a la cadena de ADN. De esta forma se combinarán dos nickasas, una de ellas tendrá mutado el dominio RuvC para que solo realice el corte el dominio NHN en la cadena complementaria al sgARN y viceversa. La combinación de las dos nickasas genera cortes en cada una de las dos hebras de ADN denominados “nick” que simulan la acción de la Cas9 cuando forma un DSB. La característica esencial de estos sistemas es la programación de dos sistemas sgARN: nCas9 para que el corte del ADN se produzca a una distancia determinada (improbable que el sistema pueda encontrar las mismas repeticiones nucleotídicas a una distancia determinada en el genoma diana). Además, si se produjese una modificación no deseada, una rotura en una de las cadenas se repara mucho más fácil que cuando ocurre en las dos. Es cierto que con estas nickasas se consiguen bajar la proporción de efectos off-target en la célula diana, pero también se ha demostrado que la eficiencia en el corte baja en comparación con la Cas9 convencional. Otro problema que tienen las nickasas es la necesidad de introducir en el organismo diana dos sistemas de expresión que contengan los dos complejos de edición génica (Hryhorowicz *et al.*, 2017).

Las deadCas (dCas9) fue otra de las modificaciones que se le realizó a la proteína Cas9. Esta variante presenta los dominios catalíticos mutados para que solo actúe como elemento de reconocimiento. El objetivo de esta mutación es el uso de estas proteínas como elemento regulador de la transcripción sin efectuar cambios en el ADN diana, es decir, que la dCas actúe junto con el sgARN como un elemento de interferencia que impidan la expresión de un determinado gen (Cui *et al.*, 2017). Por consiguiente, diversas modificaciones sobre la estructura proteica de la Cas9 han permitido obtener variaciones de la Cas9 nativa como son las eSpCas9 (enhanced specificity Cas9) y Cas9-HF (Cas9-high Fidelity) que mejoran sustantivamente la especificidad de la proteína. (Lee *et al.*, 2017).

4.7.2 Baja eficiencia HDR

La introducción de la secuencia correcta del gen a reparar es otro de los aspectos en los que debe mejorar los sistemas CRISPR-Cas9. Cabe recordar que la incidencia de la NHEJ sobre la HDR en células eucariotas es mucho mayor y el hecho de que la célula repare su ADN por cualquiera de estos métodos de recombinación se debe a la fase del ciclo celular en la que se encuentre. Bajo estas premisas se han desarrollado algunas técnicas para potenciar la prevalencia de HDR sobre NHEJ.

Por un lado, existe la opción de inhibir la NHEJ evitando la formación de los componentes necesarios para su funcionamiento. Por ejemplo, usando SCR7, un inhibidor de la ligasa IV cuyo papel es fundamental para reparar los DSB. La administración de la molécula de SCR7 aumentó 13 veces la inserción de modelos donadores de ADN en cultivos celulares (Maruyama *et al.*, 2015). Además, el uso de ARN de interferencia frente a la formación de las proteínas Ku, primera proteína que participa en la vía NHEJ, es otra alternativa para inhibir este tipo de recombinación. Por otro lado, se puede aumentar la incidencia de HDR administrando proteínas implicadas en la reparación del ADN por esta vía como son las proteínas de la familia RAD. Aunque estas estrategias han mejorado el porcentaje de reparaciones por HDR junto a sistemas CRISPR-Cas9, estas modificaciones en los dos mecanismos de reparación son difíciles de controlar y pueden ocasionar desregulaciones en el ciclo celular y en la reparación normal del material genético de la célula diana (Liu *et al.*, 2019).

Mención aparte merece los editores de bases, unas nuevas herramientas que solucionan parte de los problemas de CRISPR-Cas9. Este sistema complementario fue desarrollado

por el equipo del investigador David Liu de la Universidad de Harvard en 2016, con el objetivo de realizar cambios en las bases nitrogenadas del genoma sin generar un DSB, lo que provoca que estas herramientas presenten un gran potencial terapéutico. De esta forma se evita introducir una secuencia de ADN exógena en la célula diana a la par de que se reduce los efectos indeseados off-target al ser más específicos, sobre todo en mutaciones causadas por pocos errores en bases nitrogenadas. Sin embargo, los investigadores a cargo de Liu solo fueron capaces de diseñar editores de bases que convertían los pares G-C (G: Guanina, C: citosina) por A-T (A: Adenina, T: Timina) (Komor *et al.*, 2016). Posteriormente, el mismo equipo investigador logró crear editores de bases con capacidad de convertir la pareja de bases A-T en G-C (Gaudelli *et al.*, 2017) y un reciente estudio ha desarrollado los primeros editores de bases que permiten cambiar C-G por G-C (Gajula, 2019). El empleo de estos editores de bases aplicados a sistemas CRISPR-Cas9 han logrado aumentar la eficiencia en la edición génica y disminuir en gran medida los efectos off-target en modelos animales (Molla y Yang, 2019).

4.7.3 Anticuerpos anti-CRISPR

A parte de los efectos off-target y de la baja proporción de HDR como método de reparación del genoma, existen otros aspectos a mejorar en el funcionamiento de los sistemas CRISPR-Cas9 como método de terapia génica.

En primer lugar, no hay que olvidar que la proteína Cas9 no deja de ser una proteína de origen bacteriano presente en una gran cantidad de especies de bacterias y otros tipos de procariontes por lo que se trata de un agente extraño para el organismo diana. La Cas9 que se ha usado proviene de especies bacterianas comunes como *Streptococcus* y *Staphylococcus*, por lo que es fácil que hayamos sido expuestos a estos microorganismos. Así, investigadores del laboratorio de Matthew Porteus de la Universidad de Stanford han hallado anticuerpos frente a la proteína Cas9 en un gran porcentaje de los pacientes ensayados (Mojica y Montoliu, 2018). Estos anticuerpos pueden causar una respuesta inmune que provoque la destrucción del material transferido y/o la célula diana, lo que añade otro escollo a salvar para los investigadores (Charlesworth *et al.*, 2019). Una posible solución sería usar agentes inmunosupresores que eviten dicha respuesta o emplear proteínas Cas9 de bacterias que no hayan estado en contacto con el ser humano.

4.8 Enfermedades tratadas

Desde que en 2013 la herramienta CRISPR-Cas9 se posicionó como una fuente potencial de edición génica, un gran número de ensayos preclínicos se han realizado en todo el mundo. Estos ensayos se basan en modelos animales proporcionando la información sobre seguridad y eficacia que existen hasta la fecha con respecto a CRISPR-Cas9. Los resultados de dichos estudios son los que han avalado a esta herramienta como un sistema eficaz y seguro a la misma vez que ha presentado los inconvenientes a solventar para que pueda ser aprovechable en seres humanos. Por otra parte, el uso de células madres pluripotentes inducidas (iPSCs) ha contribuido en gran medida a las investigaciones. Son células adultas de un tejido, generalmente de la piel, las cuales han sufrido un proceso de transfección para incorporar genes exógenos que las doten de las características diferenciadoras propias de células embrionarias, a partir de las cuales se pueden conseguir cualquier tipo de célula del cuerpo. Se han usado células madres pluripotentes tanto de ratón como de seres humanos.

No obstante, existe poca información sobre ensayos clínicos destinados a seres humanos hasta el momento. China fue el primer país que aprobó la realización de un ensayo clínico con seres humanos sobre el sistema CRISPR-Cas9 en 2015 aunque no ha sido hasta octubre de 2016 cuando los pacientes han recibido el tratamiento (Nature, 2016). El estudio está dirigido sobre 10 pacientes que sufren un tipo severo de cáncer de pulmón. Tras el país asiático, el siguiente país dónde se puso en marcha un ensayo clínico de CRISPR-Cas9 con seres humanos ha sido Estados Unidos. Investigadores de la Universidad de Pennsylvania se encuentran dirigiendo un ensayo clínico desde septiembre de 2018 sobre pacientes que sufren tres tipos de cáncer: mieloma múltiple, melanoma y sarcoma sinovial combinado con un tipo de liposarcoma (National Public Radio, 2019). Por último, los ensayos clínicos sobre CRISPR-Cas9 han llegado también a Europa con la empresa biotecnológica suiza CRISPR Therapeutics la cual está llevando a cabo un ensayo clínico con pacientes que sufren β -talasemia, un tipo de talasemia (anemia hereditaria) que se caracteriza por un déficit en la producción de las cadenas beta de hemoglobina (MIT, 2017). En la actualidad, existen alrededor de 15 ensayos clínicos en diferentes países que tratan enfermedades mediante técnicas basadas en el sistema CRISPR-Cas9, aunque hay pocos resultados oficiales hasta el momento.

4.8.1 Aplicaciones en terapia génica ocular

Entre todas las enfermedades candidatas a ser tratadas con sistemas CRISPR-Cas9, una patología retiniana ha sido la primera en pertenecer a un ensayo clínico *in vivo* con seres humanos. En diciembre del pasado año las autoridades estadounidenses han aprobado un ensayo clínico destinados a 15 pacientes que sufren un tipo de distrofia retiniana hereditaria llamada Amaurosis Congénita de Leber que afecta a dos de cada 100.00 nacidos.

Las características de la retina lo convierten en una diana ideal para ser el destinatario de los sistemas de edición génica debido a que es un tejido accesible, pequeño y altamente compartimentalizado (Petit *et al.*, 2016). Además, las barreras físicas dotan al ojo de ser un órgano aislado lo que facilita el tratamiento de las patologías oculares al disminuir los efectos sistémicos no deseados. Este aislamiento dota al ojo de ser un órgano inmunoprivilegiado, es decir, es menos propenso a desencadenar respuestas inmunogénicas frente a antígenos. Esta característica facilita que el organismo no provoque una respuesta inmune frente al material genético transferido y así evitar un posible fracaso en la terapia génica (Kumaran *et al.*, 2018). Otra ventaja que presenta el ojo frente a otros órganos del cuerpo es su transparencia lo que permite visualizar fácilmente mediante diferentes técnicas si existe efecto terapéutico o no.

Las propiedades del ojo ya mencionadas han hecho que la terapia génica ocular siempre haya estado presente en los ensayos clínicos de las dos últimas décadas. Las enfermedades retinianas que más han sido objeto de estudio en los ensayos clínicos con los distintos tipos de terapia génica son las denominadas distrofias retinianas hereditarias donde se encuentran la Amaurosis congénita de Leber (LCA), la Retinosis Pigmentaria (RP), la enfermedad de Stargardt (SGTD) y la coroideremia. Estos tipos de patologías se caracterizan por una disfunción de los fotorreceptores (bastones y conos), del epitelio pigmentario de la retina y de la coroides que producen un deterioro en la visión (del Pozo *et al.*, 2018). Este grupo de enfermedades se caracteriza por tener una alta heterogeneidad genética, es decir, la enfermedad puede estar causada por varias mutaciones de un mismo gen o por mutaciones de distintos genes. Hasta la fecha se han descubierto alrededor de 250 genes implicados en estas enfermedades lo que las convierten en el grupo de enfermedades hereditarias más comunes entre los seres humanos (Chacón-Camacho y Zenteno, 2017).

La LCA supone más del 15% de los casos de ceguera congénita producidos por mutaciones en alrededor de 20 genes conocidos hasta el momento que codifican proteínas esenciales para el correcto funcionamiento de los fotorreceptores. Estas mutaciones clasifican a la enfermedad en varios tipos en función del gen afectado en ella. La forma más común de LCA es la que afecta al gen RPE65 (LCA2) que codifica para una proteína con el mismo nombre que regula compuestos derivados de la vitamina A, fundamentales para que fotorreceptores puedan detectar la luz y transformarla en impulsos nerviosos (Peng *et al.*, 2017) (Chacón-Camacho y Zenteno, 2017). Las personas que sufren LCA sufren desde el nacimiento o durante los primeros meses de vida una gran pérdida de agudeza visual llegando a estados ceguera completa entre la primera y segunda década de vida. En la actualidad no existe tratamiento y es por lo que la terapia génica con sistemas CRISPR-Cas9 forma una gran esperanza para hacer frente a esta enfermedad.

Otras de las enfermedades retinianas hereditarias más comunes son las retinitis pigmentaria o retinosis pigmentosa (RP). Esta patología retiniana se caracteriza principalmente por una afectación de los bastones, los fotorreceptores responsables de la visión nocturna y periférica. Es por ello por lo que el primer síntoma de la RP es una marcada ceguera nocturna acompañada de una pérdida progresiva del campo visual periférico detectada en distintos estadios de la vida del ser humano. Estos síntomas la diferencian con respecto a la LCA, dónde la pérdida es total y se detecta durante el primer año de vida. Asimismo, un 20% de los pacientes que sufren esta enfermedad llevan asociados hasta 30 síndromes (Chan *et al.*, 2017). El síndrome de Usher es el más común y se califica por una hipoacusia neurosensorial. La RP tiene un componente genético causal muy variado que depende de si la enfermedad se manifiesta de manera autosómica recesiva, dominante o ligada al cromosoma X. Uno de los genes que en mayor número aparece afectado en la RP es el gen RHO que codifica para la rodopsina, el pigmento del fotorreceptor encargado de absorber el fotón de luz. Sin este pigmento no se puede producir la fototransducción y desemboca así en los síntomas característicos de la enfermedad (del Pozo *et al.*, 2018).

Tabla 3. Algunos ejemplos de resultados de ensayos preclínicos realizados con sistemas CRISPR-Cas9. Glosario de términos: Retinitis pigmentosa (RP), Amaurosis congénita de Leber (LCA), Degeneración Macular asociada a la edad (AMD), Virus Adeno-Asociados (AAV), Recombinación homóloga (HDR), Recombinación no homóloga (NHEJ), células madres pluripotentes inducidas (iPSCs), Silenciamiento genético por CRISPR-Cas9 (CRISPRi). El concepto de silenciamiento genético engloba a la modificación de un gen para que este no exprese su contenido.

Enfermedad	Gen modificado	Vector	Reparación	Modelos	Tipo de ensayo	Eficacia	Referencias
RP	Pde6b	Microinyección	HDR	Ratones (cigotos)	In vivo	36%	Wu <i>et al.</i> , 2016.
RP autosómico dominante	Rho ^{S334}	Electroporación	CRISPRi	Ratas (cigotos)	In vivo	35%	Bakondi <i>et al.</i> , 2016
RP ligado al cromosoma X	RPGR	Microinyección	HDR	iPSCs	Exvivo	13%	Bassuk <i>et al.</i> , 2016
RP autosómico dominante	Rho	Electroporación	NHEJ	Ratas	In vivo	70-80%	Latella <i>et al.</i> , 2016
LCA	KCNJ13	Microinyección	CRISPRi	Ratones (cigotos)	In vivo	80%	Zhong <i>et al.</i> , 2015
LCA10	CEP290	AAV	NHEJ	Ratones (adultos)	In vivo	80%	Ruan <i>et al.</i> , 2017
AMD	Vegfa/ Hif1a	AAV	NHEJ	Ratones (adultos)	In vivo	30-35%	Kim <i>et al.</i> , 2017b Chan <i>et al.</i> , 2017

Como se puede apreciar en la **Tabla 3** se han realizado ensayos preclínicos con otras enfermedades como con la Degeneración Macular asociada a la Edad (AMD). Esta enfermedad multifactorial es la principal causa de pérdida de visión central en adultos sobre todo en países desarrollados (Damián *et al.*, 2006). Uno de los factores causantes es la aparición de neovasos en la retina propiciados por un incremento del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En la actualidad existe un tratamiento a base de anticuerpos monoclonales como son bevacizumab y ranibizumab con el objetivo de disminuir dicho exceso de VEGF. El tratamiento presenta diversas reacciones adversas por lo que la terapia génica con CRISPR-Cas9 puede ser una alternativa para los pacientes que sufran esta patología ocular (Chan *et al.*, 2017).

Los resultados de los ensayos recogidos en la **Tabla 3** no son del todo satisfactorios (mostrando porcentajes de eficacia entre el 13 y el 80%) por lo que confirman la necesidad de seguir investigando para mejorar los sistemas CRISPR-Cas9. Asimismo, es importante reseñar que algunos de los ensayos fueron los primeros en realizarse de tipo *in vivo*, por lo que es lógico pensar que los resultados no sean los deseados. Por último, también existen ensayos clínicos y preclínicos con sistemas CRISPR-Cas9 destinados a enfermedades sistémicas como la distrofia muscular de Duchenne, hemofilias A y B, virus de la hepatitis B, VIH, diferentes tipos de cáncer...etc. Se demuestra así el potencial terapéutico de CRISPR-Cas9, una herramienta capaz de tratar cualquier enfermedad con algún componente genético causal.

4.9 Perspectivas futuras y aspectos éticos

Según el tipo de célula que recibe el material genético existen dos tipos de terapia génica: la realizada sobre células germinales (reproductoras) y sobre células somáticas (no reproductoras). La diferencia entre las dos modalidades es que, en la primera, la modificación genética se transmite a la descendencia. Por consideraciones éticas, la terapia génica en células germinales no está autorizada actualmente en ningún país. En España, el Real Decreto 1090/2015, de 4 de diciembre, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos, los Comités de Ética de la Investigación con medicamentos y el Registro Español de Estudios Clínicos, en su artículo 17 indica: “Quedan prohibidos los ensayos clínicos con medicamentos de terapia génica que produzcan modificaciones en la identidad génica de la línea germinal de la persona”.

Por otro lado, los sistemas CRISPR-Cas9 requieren aún más ensayos clínicos que avalen su seguridad y eficacia, sobre todo en seres humanos. La terapia génica mediante este sistema que llegue en un futuro a los pacientes enfermos deberá de garantizar la seguridad de estos a la misma vez que sea eficaz y no produzcan reacciones adversas graves. En ese contexto, los experimentos del científico chino He Jiankui a finales del pasado año afirmando que había modificado genéticamente los primeros bebés utilizando sistemas CRISPR-Cas9 para inmunizarlos frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) han alertado del peligro de hacer un uso inadecuado de los sistemas CRISPR-Cas9 (<https://elpais.com/elpais/2018>). Todo hace indicar que esta nueva herramienta de edición génica supondrá la solución a las enfermedades hereditarias que sufren personas en todo el mundo en un futuro a medio-largo plazo siempre y cuando se respeten la ética y la integridad de dichas personas. Además, se deberán de diseñar sistemas asumibles por los sistemas de salud de los países para que la población tenga un fácil acceso y el fin de sus enfermedades sea una realidad.

5. CONCLUSIONES

1. El sistema CRISPR-Cas es un método de inmunidad adaptativa que usan ciertos tipos de bacterias y arqueas para hacer frente a infecciones por bacteriófagos. Debido a que estos sistemas realizan cortes en el genoma de manera selectiva, distintos investigadores han desarrollado una herramienta basada en estos sistemas para poder manipular el genoma en seres humanos.
2. Hasta la fecha se dispone de poca información sobre enfermedades tratadas con estos sistemas siendo la mayoría de los ensayos clínicos realizados sobre modelos animales. No obstante, las enfermedades hereditarias retinianas parten en buena posición por ser las primeras en recibir un tratamiento de terapia génica basado en estos sistemas debido a las características particulares del ojo.
3. Con respecto a los métodos de terapia génica ya existentes, el sistema CRISPR-Cas9 mejora a sus antecesores principalmente en selectividad y en la facilidad del diseño. En contraposición, se debe mejorar en las técnicas de reparación del gen en cuestión y minimizar los efectos no deseados.
4. En definitiva, la terapia génica basada en sistemas CRISPR-Cas9 cambiará la vida de muchos seres humanos en un futuro no muy lejano.

6. BIBLIOGRAFÍA

Akbulut H, Ocal M, Sonugur G. Cancer gene therapy. In “Gene Therapy - Principles and Challenges” (Doaa Hashad, Ed.), chapter 1, pp. 1-37. IntechOpen. 2015. doi: 10.5772/61775.

Baliou S, Adamaki M, Kyriakopoulos AM, Spandidos DA, Panayiotidis M, Christodoulou I *et al.* CRISPR therapeutic tools for complex genetic disorders and cancer (Review). *Int J Oncol.* 2018; 52(2): 443–468

Bakondi B, Lv W, Lu B, Jones MK, Tsai Y, Kim KJ *et al.* In Vivo CRISPR/Cas9 Gene Editing Corrects Retinal Dystrophy in the S334ter-3 Rat Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Mol Ther.* 2016; 24(3): 556-563. doi: 10.1038/mt.2015.220.

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007; 315(5819): 1709-1712. doi: 10.1126/science.1138140.

Bassuk AG, Zheng A, Li Y, Tsang SH, Mahajan VB. Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells. *Sci Rep.* 2016; 6:19969. doi: 10.1038/srep1996

Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology.* 2005; 151: 2551-2561. doi: 10.1099/mic.0.28048-0

Burmistrz M, Pyrc M. CRISPR-Cas Systems in Prokaryotes. *Pol J Microbiol.* 2015; 64(3): 193-202.

Castro JC, Cobos M. El sistema molecular CRISPR/Cas: una fascinante historia de descubrimientos científicos. *Conoc. amaz.* 2017; 8(1): 67-82.

Chacón-Camacho O, Zenteno JC. Terapia génica para la restauración de la visión en pacientes con amaurosis congénita de Leber (LCA) por mutación en el gen RPE65: el inicio de la fase IV. *Gac Med Mex.* 2017; 153: 276-278.

Chan L, Mahajan VB, Tsang SH. Genome Surgery and Gene Therapy in Retinal Disorders. *Yale J Biol Med.* 2017; 90(4): 523-532.

- Charlesworth CT, Deshpande PS, Dever DP, Camarena J, Lemgart VT, Cromer MK *et al.* Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nat Med.* 2019; (2): 249-254. doi: 10.1038/s41591-018-0326-x.
- Charpentier E, Richter H, Van der Oost J, White MF. Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. *FEMS Microbiol Rev* 2015; 39:428-441. doi: 10.1093/femsre/fuv023.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013; 339(6121): 819–823. doi: 10.1126/science.1231143.
- Cui J, Chew SJL, Shi Y, Gong Z, Shen HM. CRISPR system for genome engineering: the application for autophagy study. *BMB Rep.* 2017; 50(5): 247-256.
- Curtis H, Massari A, Sue Barnes N, Schnek A. *Invitación a la biología.* 7ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2015.
- Damián J, Pastora R, Armada F, Arias L. Epidemiología de la degeneración macular asociada con la edad. Situación en España. *Aten Primaria.* 2006; 38(1): 51-57.
- Del Pozo A, Rodríguez A, Solinís M^aA. *Terapia Génica.* Madrid: Síntesis; 2018.
- Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature.* 2011; 471: 602–607.
- Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. 2014; 346(6213): 1258096. doi: 10.1126/science.1258096.
- Eid A, Mahfouz M. Genome editing: the road of CRISPR/Cas9 from bench to clinic. *Exp Mol Med.* 2016; 48(10): e265.
- Gajula KS. Designing an Elusive C•G→G•C CRISPR Base Editor. *Trends Biochem Sci.* 2019; 44(2): 91-94. doi: 10.1016/j.tibs.2018.
- Garneau JE, Dupuis M-È, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval *et al.* The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature.* 2010; 468, 67-71.

Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI *et al.* Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*. 2017; 551(7681): 464-471. doi: 10.1038/nature24644.

Gómez-Márquez J. La revolución de la ingeniería genética. *NAAC*. 2013; 20: 13-21.

Gonçalves GAR, Paiva RMA. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein (Sao Paulo)*. 2017; 15(3): 369-375. doi: 10.1590/S1679-45082017RB4024.

Hille F, Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2016; 371(1707): 20150496. doi: 10.1098/rstb.2015.0496

Hryhorowicz M, Lipiński D, Zeyland J, Słomski R. CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017; 65(3): 233-240. doi: 10.1007/s00005-016-0427-5.

Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 2014.; 157(6):1262-1278. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.010.

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. *J. Bacteriol*. 1987; 169: 5429-5433. doi: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.

Jacobi AM, Rettig GR, Turk R, Collingwood MA, Zeiner SA, Quadros RM *et al.* Simplified CRISPR tools for efficient genome editing and streamlined protocols for their delivery into mammalian cells and mouse zygotes. *Methods*. 2017; 121-122:16-28. doi: 10.1016/j.ymeth.

Jansen R, Embden JDA van, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with AND repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol*. 2002; 43(6): 1565-1575.

Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys*. 2017; 46: 505-529. doi: 10.1146/annurev-biophys-062215-010822.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012; 337:816–821. doi: 10.1126/science.1225829.

- Kim E, Kang K, Ju J. CRISPR-Cas9: a promising tool for gene editing on induced pluripotent stem cells. *Korean J Intern Med.* 2017a; 32(1): 42–61. doi: 10.3904/kjim.2016.198
- Kim E, Koo T, Park SW, Kim D, Kim K, Cho HY *et al.* In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. *Nat Commun.* 2017b; 8:14500. doi: 10.1038/ncomms14500.
- Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(3): 1156–1160.
- Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature.* 2016; 533(7603): 420-424. doi: 10.1038/nature17946.
- Kumaran N, Michaelides M, Smith AJ, Ali RR, Bainbridge JWB. Retinal gene therapy. *Br Med Bull.* 2018; 126(1): 13-25. doi: 10.1093/bmb/ldy005.
- LaFontaine JS, Fathe K, Smyth HD. Delivery and therapeutic applications of gene editing technologies ZFNs, TALENs, and CRISPR/Cas9. *Int J Pharm.* 2015; 494(1): 180-194. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.08.029.
- Latella MC, Di Salvo MT, Cocchiarella F, Benati D, Grisendi G, Comitato A *et al.* In vivo Editing of the Human Mutant Rhodopsin Gene by Electroporation of Plasmid-based CRISPR/Cas9 in the Mouse Retina. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2016; 5(11): e389. doi: 10.1038/mtna.2016.92
- Lee HB, Sundberg BN, Sigafos AN, Clark KJ. Genome Engineering with TALE and CRISPR Systems in Neuroscience. *Front Genet.* 2016; 7: 47. doi: 10.3389/fgene.2016.00047
- Lee JK, Jeong E, Lee J, Jung M, Shin E, Kim Y. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature.* 2017; 550(7676): 407–410. doi: 10.1038/nature24268
- Lino C, Harper J, Carney J, Timlin J. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv.* 2018; 25(1): 1234–1257. doi: 10.1080/10717544.2018.1474964.

Liu C, Zhang L, Liu H, Cheng K. Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *J Control Release*. 2017; 266: 17-26. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.09.012.

Liu M, Rehman S, Tang X, Gu, K, Fan Q, Chen D. Methodologies for Improving HDR Efficiency. *Front Genet*. 2019; 9: 691. doi: 10.3389/fgene.2018.00691

Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P *et al*. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9(6):467-477. doi: 10.1038/nrmicro2577

Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ *et al*. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2015; 13:722-736. doi: 10.1038/nrmicro3569

Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, Ingram JR, Ploegh HL. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat. Biotechnol*. 2015; 33: 538–542. doi: 10.1038/nbt.3190

Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol*. 2000; 36, 244-246.

Molla KA, Yang Y. CRISPR/Cas-Mediated Base Editing: Technical Considerations and Practical Applications. *Trends Biotechnol*. 2019; S0167-7799(19): 30053-30058. doi: 10.1016/j.tibtech.2019.03.008

Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae *et al*. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 2014; 156(5): 935–949. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001 doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001

Pellagatti A, Dolatshad H, Valletta S, Boulwood J. Application of CRISPR/Cas9 genome editing to the study and treatment of disease. *Arch Toxicol*. 2015; 89(7): 1023-1034. doi: 10.1007/s00204-015-1504-y.

Peng YQ, Tang LS, Yoshida S, Zhou YD. Applications of CRISPR/Cas9 in retinal degenerative diseases. *Int J Ophthalmol*. 2017; 10(4): 646–651. doi:10.18240/ijo.2017.04.23

Petit L, Khanna H, Punzo C. Advances in Gene Therapy for Diseases of the Eye. *Hum Gene Ther.* 2016; 27(8): 563-579. doi: 10.1089/hum.2016.040.

Ruan GX, Barry E, Yu D, Lukason M, Cheng SH, Scaria A. CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing as a Therapeutic Approach for Leber Congenital Amaurosis 10. *Mol Ther.* 2017; 25(2): 331-341. doi: 10.1016/j.ymthe.2016.

Sapranauskas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(21): 9275–9282. doi: 10.1093/nar/gkr606.

Sashital DG, Wiedenheft B, Doudna JA. Mechanism of foreign DNA selection in a bacterial adaptive immune system. 2012; *Mol. Cell* 46(5): 606–615. doi: 10.1016/j.molcel.2012.03.020.

The Journal Gene Medicine. *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide.* 2018 [en línea]. [Consultado en febrero de 2019]. Disponible en: <http://www.abedia.com/wiley/indications.php>

Tsang SH. Precision Medicine, CRISPR, and Genome Engineering Moving from Association to Biology and Therapeutics. Cham: Springer International Publishing, 2017.

Urti A. Promise of ocular gene therapy. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2009; 84 (2): 59-60.

Wang, H., La Russa, M. Qi, L. S. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annual review of biochemistry.* 2016; 85(1): 227–264. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014607

Wu WH, Tsai YT, Justus S, Lee TT, Zhang L Lin CS *et al.* CRISPR Repair Reveals Causative Mutation in a Preclinical Model of Retinitis Pigmentosa. *Mol Ther.* 2016; 24(8): 1388-1394. doi: 10.1038/mt.2016.107

Xiong X, Chen M, Lim WA, Zhao D, Qi LS. CRISPR/Cas9 for Human Genome Engineering and Disease Research. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2016; 17:131-154. doi: 10.1146/annurev-genom-083115-022258

Zhong H, Chen Y, Li Y, Chen R, Mardon G. CRISPR-engineered mosaicism rapidly reveals that loss of Kcnj13 function in mice mimics human disease phenotypes.

CRISPR-engineered mosaicism rapidly reveals that loss of Kcnj13 function in mice mimics human disease phenotypes. *Sci Rep.* 2015; 5:8366. doi: 10.1038/srep08366.

OTRAS FUENTES

Conferencia: “El Futuro X Venir: Francis Mojica y Lluís Montoliu”. Organizado por la Fundación Telefónica en septiembre de 2018. [Consultado en abril de 2019]. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=mC4JeBohwFo>

El País. Autorizada la edición genética con CRISPR dentro de personas enfermas. 2018 [en línea]. [Consultado en mayo de 2019]. Disponible en: https://elpais.com/elpais/2018/12/19/ciencia/1545243580_218250.html

National Public Radio. First U.S. patients treated with CRISPR as human gene-editing trials get underway. 2019 [en línea]. [Consultado en mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.npr.org/sections/health-shots/2019/04/16/712402435/first-u-s-patients-treated-with-crispr-as-gene-editing-human-trials-get-underway>

Nature. CRISPR gene editing tested in a person. 2016 [en línea]. [Consultado en mayo de 2019]. Disponible en: https://www.nature.com/news/polopoly_fs/1.20988!/menu/main/topColumns/topLeftColumn/pdf/nature.2016.20988.pdf

MIT Technology Review. 2018: el año en que CRISPR puede llegar a alguien que usted conoce. 2017 [en línea]. [Consultado en mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.technologyreview.es/s/9870/2018-el-ano-en-que-crispr-puede-llegar-alguien-que-usted-conoce>

Real Decreto 1090/2015, de 4 de diciembre, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos, los Comités de Ética de la Investigación con medicamentos y el Registro Español de Estudios Clínicos. [en línea]. [Consultado en marzo 2019]. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2015/12/24/pdfs/BOE-A-2015-14082.pdf>