

CRISPR-Cas9: El futuro de la terapia génica y de la medicina personalizada

CRISPR-Cas9: The future of gene therapy and personalized medicine

José Javier Jaulín Pueyo

Trabajo de Fin de Grado

Grado de Medicina – Universidad de Zaragoza

Directores:

Eva Barrio

Diego Lerma

Índice

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	5
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4.1 Generalidades.....	6
4.1.1 ¿Qué es CRISPR?.....	6
4.1.2 Funcionamiento de CRISPR/Cas9.....	7
4.1.3 Bases de la edición genética: reparación.....	9
4.2 Aplicaciones como terapia génica.....	10
4.2.1 Enfermedades hereditarias.....	11
4.2.2 Terapia antitumoral.....	16
4.2.3 Terapia antiviral.....	17
4.3 Desarrollo de CRISPR/Cas.....	19
4.3.1 Transferencia y vectores.....	19
4.3.2 Efectos “off-target”.....	20
4.3.4 Eficacia y otras aplicaciones.....	20
4.4 Cuestiones éticas y sobre regulación.....	22
5. CONCLUSIONES.....	26
6. BIBLIOGRAFÍA.....	27
7. Listado de abreviaturas.....	33
Anexo: tabla de aplicaciones terapéuticas.....	34

1. Resumen

Desde su descubrimiento hace algo más de dos décadas como mecanismo inmunitario en las bacterias, los sistemas CRISPR-Cas se han convertido en la técnica de edición genética de vanguardia. Dadas las prometedoras cualidades de esta tecnología y su ambicioso horizonte de aplicaciones, numerosas líneas de investigación se han abierto tanto para intentar salvar las limitaciones de su uso (fundamentalmente aumentando el rendimiento a la vez que se evitan las modificaciones no deseadas u "off-target"), como para empezar a probarla frente a las principales enfermedades candidatas a terapia génica.

El considerable número de publicaciones que han aparecido durante los últimos años avala la relevancia de este tema de actualidad en campos como el de la medicina o el de la bioética. En este trabajo analizamos la literatura disponible para exponer el desarrollo de esta tecnología hasta la fecha y las razones por las que constituye un avance con tanto potencial como polémica a sus espaldas.

Palabras clave: CRISPR, Cas9, edición genética, terapia génica, HDR, NHEJ, enfermedad hereditaria, cáncer, VIH, bioética, regulación, ADN, genética, biotecnología, medicina.

Abstract

Ever since its discovery over two decades ago as an immune mechanism of bacteria, CRISPR-Cas systems have become the cutting-edge technique for gene editing. Given the promising qualities of this technology and its broad horizon of applications, many lines of research have been opened both in order to overcome the limitations of its use (mainly by increasing its performance as undesired or “off-target” modifications are avoided) and to start testing it against the main candidate diseases for gene therapy.

The important number of publications that have appeared during the last few years supports the relevance of this emerging issue in fields such as medicine or bioethics. In this essay we analyze the available literature in order to present the development of this technology up until this date and the reasons as to why it constitutes an advance with as much potential as controversy.

Keywords: CRISPR, Cas9, gene editing, gene therapy, HDR, NHEJ, hereditary diseases, cancer, HIV, bioethics, regulations, DNA, genetics, biotechnology, medicine.

2. Introducción

Sin lugar a dudas, a pesar de ser un campo de reciente aparición, la genética médica está experimentando actualmente uno de sus momentos de mayor desarrollo. Para ponernos en contexto, solo tenemos que comprobar la lista de hitos importantes en genética que se han ido encadenando principalmente a lo largo del siglo XX.

Aunque podemos seguir las raíces de esta ciencia hasta la Antigua Grecia (con las hipótesis sobre la transmisión de caracteres), las primeras teorías relevantes sobre la herencia aparecen durante los siglos XVIII y XIX de manos de personalidades como Pierre Louis Maupertuis, Joseph Adams y, por supuesto, Gregor Mendel. Los estudios de este último no son verdaderamente reconocidos y aprovechados hasta principios del siglo XX, cuando se empiezan a vincular sus modelos de herencia con los cromosomas primero (por Walter Sutton y Theodor Boveri) y después con los propios genes (por Thomas Morgan). Durante este periodo predomina la "genética de la transmisión", que a mediados de siglo deja paso a las investigaciones centradas en la naturaleza del material hereditario y en la regulación y expresión de los genes. Cabe remarcar el descubrimiento de la estructura del ADN en 1953 por James Watson y Francis Crick (gracias a las imágenes cristalográficas de rayos X obtenidas por el equipo de Raymond Gosling, Rosalind Franklin y Maurice Wilkins). Los experimentos realizados a partir de la década de los setenta se ven reforzados por las técnicas que trae la "nueva genética" (en palabras del premio Nobel Daniel Nathans): la amplificación, la secuenciación, la fragmentación y la hibridación del ADN. Asimismo, la recombinación genética no tarda en aparecer como método para crear ADN quimérico. En la década de los noventa, se sientan las bases de la terapia génica con el desarrollo del campo de la genómica (finalizando la secuenciación completa del genoma humano en 2016) y de técnicas como la transgénesis, la clonación o la terapia celular (1, 2).

Llegando ya al tema que nos ocupa este trabajo, podemos decir que la tecnología CRISPR/Cas9 no es la primera que se intenta utilizar para modificar de forma permanente el material genético de las células (previamente ya se habían descubierto las nucleasas con dedos de cinc y los

sistemas TALEN), pero sí es la más eficiente y prometedora hasta la fecha. A pesar de ello, sigue contando con importantes limitaciones y ha suscitado cierta polémica en el ámbito de la bioética, como ya harían otros descubrimientos relacionados con la ingeniería genética.

Esta revisión constituye un intento de aunar los conocimientos más actualizados de los que disponemos acerca de CRISPR/Cas9. Trataremos, por tanto, de exponer el desarrollo que ha experimentado desde su descubrimiento, centrándonos sobre todo en sus potenciales aplicaciones terapéuticas y en las reflexiones a las que ha dado lugar desde la perspectiva de la bioética.

3. Material y métodos

La mayor parte de este trabajo se fundamenta en una amplia búsqueda de información a través de diversas fuentes, reflejadas todas ellas en el apartado *Bibliografía*. La estrategia en etapas iniciales ha consistido en utilizar criterios más laxos para asegurar los conocimientos básicos sobre el tema a abordar y sobre el contexto histórico y bioético. Para ello se han encontrado y utilizado libros de divulgación científica (1-4) y revisiones bibliográficas ya existentes sobre las que posteriormente se haría un análisis de las referencias de interés (5-7). Además de esto, se buscaron artículos relevantes sobre el descubrimiento de los sistemas CRISPR.

En un segundo tiempo, se haría una búsqueda en profundidad a través de repositorios y bases de datos como Alcorze, PubMed Central (PMC) o Science Direct; empleando filtros (fecha de publicación a partir de 2014, artículos de revista con acceso a texto completo, búsqueda en título y resumen del artículo) y combinando palabras clave mediante operadores booleanos. Entre estas palabras se incluyen términos generales ("CRISPR", "Cas9", "gene editing", "HDR") y otros más específicos obtenidos de la búsqueda inicial como "off-target", "OTE", "vector", "HIV" o "cancer" (se emplearían sistemáticamente el nombre de las enfermedades más relevantes para el apartado de aplicaciones terapéuticas).

Como gestor de referencias bibliográficas se ha utilizado el programa Mendeley Desktop.

4. Resultados y discusión

4.1 Generalidades

4.1.1 ¿Qué es CRISPR?

Los sistemas CRISPR (del inglés “clustered regularly interspaced short palindromic repeats”, nombre propuesto por Jansen et al. en 2002) fueron descubiertos de forma independiente por varios grupos de investigación en organismos procariontes a finales del siglo pasado, siendo el equipo de Ishino et al. el primero en detectarlos en *Escherichia coli* en 1987 (8). Tratándose de un hallazgo casual, la función de estas regiones de ADN permaneció como una incógnita durante varios años. A pesar de esto, las singulares estructuras que observaron estos investigadores sin duda invitaban a su estudio: una serie de secuencias cortas homólogas, cuyos nucleótidos parecían seguir un orden palindrómico, se encontraban separadas unas de otras a una distancia constante por secuencias espaciadoras de tamaño similar (9).

El equipo de Mojica et al. realizó el correspondiente descubrimiento en el dominio *Archaea* (10) y, en el año 2000, este mismo autor publicó una revisión concluyendo que estos sistemas pertenecían a una familia de secuencias repetidas conservadas durante el proceso de evolución de distintas especies procariontes (11).

Investigaciones posteriores en esta materia, con el objetivo de indagar más en la composición de estas regiones, llevaron al descubrimiento de una “secuencia líder” y de unos genes denominados CAS (“CRISPR associated”) adyacentes a las repeticiones descritas (12); describiéndose así los últimos componentes de lo que hoy día conocemos como sistemas CRISPR/Cas **[Figura 1]**.

En estudios sucesivos se comprobó la capacidad de transcripción de los espaciadores y la homología e incompatibilidad de los mismos con el material genético exógeno transportado por bacteriófagos (9). Esto llevó a los investigadores a pensar que la función de estos sistemas podía ser de

naturaleza inmune y, poco después, un equipo demostró la adquisición de resistencias en *Streptococcus thermophilus* a través de CRISPR (13).

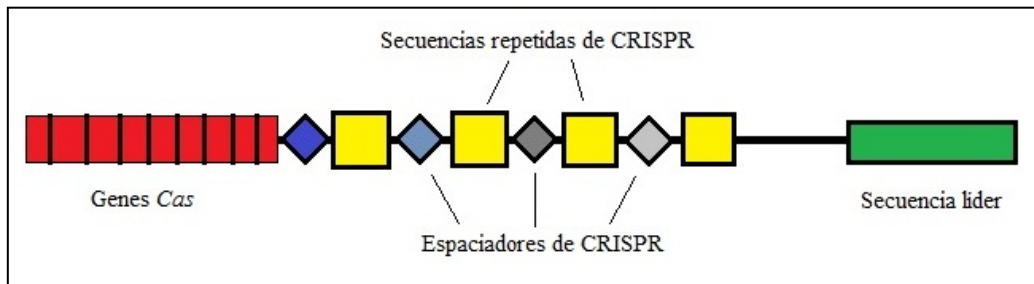


Fig 1. Estructura típica de los sistemas CRISPR/Cas en procariotas.

4.1.2 Funcionamiento de CRISPR/Cas9

Aunque el descubrimiento de CRISPR constituye en sí mismo uno de los grandes hitos de los últimos años, el máximo potencial de este hallazgo se alcanzó con su adaptación como tecnología de edición genética. Esto fue posible gracias a la comprensión de su funcionamiento natural en las bacterias, tal como lo describimos a continuación.

Gran parte del mecanismo de acción de estos sistemas inmunes depende de las proteínas codificadas por los genes CAS. Con actividad nucleasa, estos productos son capaces de degradar el material genético extraño (tarea realizada por Cas1 y Cas2, presentes en todas las especies) e integrarlo como un nuevo espaciador en la región CRISPR, preferentemente en el extremo proximal a la secuencia líder (9). A partir de este punto, los distintos tipos de sistema CRISPR divergen en la forma de procesar los transcritos primarios de los espaciadores para convertirlos en secuencias guía (denominadas crARN), que posteriormente servirán a la bacteria para identificar las bases complementarias del bacteriófago y defenderse de forma efectiva. En los sistemas tipo I y III, el ARN guía está constituido por una sola cadena de nucleótidos; mientras que en los sistemas tipo II, una cadena de tracrARN ("crARN trans-activador") complementaria al crARN se une al mismo para formar un ARN guía de doble cadena (14).

El paso final es la unión del crARN con una proteína Cas endonucleasa que varía según el sistema. En el de tipo II, Cas9 es capaz de realizar un corte

de tipo romo en la doble hebra de ADN mediante sus dominios catalíticos HNH y RuvC [Figura 2]. Para el reconocimiento de la región diana por parte de la enzima es necesario que en el ADN la secuencia homóloga a crARN esté próxima a una región PAM ("protospacer adjacent motif"), cuya estructura depende de la proteína Cas y su origen. En el caso de Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (la variante más comúnmente utilizada por sus propiedades) PAM consiste en un triplete en el que cualquier nucleótido va seguido de otros dos con base guanina, -NGG-. Una vez completado el reconocimiento, Cas9 realiza el corte entre el tercer y cuarto nucleótido "corriente arriba" desde PAM (5, 14). En cierto sentido, podemos comparar estas proteínas Cas con las enzimas de restricción tradicionales, siendo únicas por su capacidad de utilizar el ARN como guía en lugar de proteínas (3).

Una vez desentrañados estos mecanismos, varios equipos de investigación propusieron la adaptación de Cas9 al terreno de la ingeniería genética. Esto se llevó a cabo gracias a la posibilidad de crear secuencias de ARN sintéticas (normalmente de unos 20 nucleótidos) capaces de guiar a la enzima hasta cualquier punto de una molécula de ADN. Desde entonces, CRISPR/Cas9 ha sido protagonista de multitud de publicaciones científicas y, tal como se predijo en sus inicios, ha demostrado ser una alternativa eficiente, económica y versátil (capaz de modificar varios loci a la vez) frente a sus predecesores en el campo de la edición genética (7, 14).

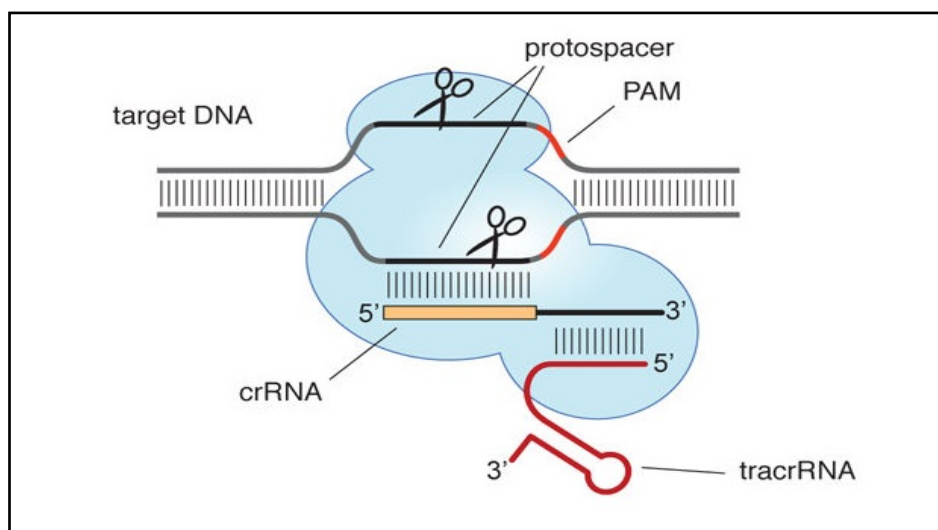


Fig 2. Mecanismo de acción de Cas9 (azul) con ARN guía. Los dominios catalíticos cortan la región complementaria al ARN y próxima a PAM. Jinek M. et al. (14)

4.1.3 Bases de la edición genética: reparación

La escisión en la doble hebra de ADN constituye solo el primer paso de este proceso de manipulación de genes. Las distintas modificaciones que pueden tener lugar dependen en gran medida del mecanismo de reparación que utilice la célula, que puede ser inespecífico (más conocido por las siglas en inglés NHEJ, “non-homologous end joining”) o mediado por homología (HDR, “homology directed repair”) (1). El primero es más frecuente a lo largo de todo el ciclo celular (aunque preferentemente ocurre en fase G1), generando pequeñas inserciones o deleciones inespecíficas (“indels”) en el sitio de rotura que pueden dar lugar a codones stop y desplazamientos del marco de lectura. Por este motivo, NHEJ es más utilizado para la disrupción de genes y fabricación de modelos “knock-out”. Por otro lado, la vía de la homología se da únicamente en las fases S y G2 (por lo que solo es relevante en tejidos con alta tasa de replicación); pero es más versátil y precisa, ya que permite modificar genes según el modelo que proporcionemos en una cadena de ADN “donante”. Dicha cadena, a modo de molde, debe estar constituida por la secuencia que queremos introducir, que a su vez estará flanqueada por los mismos nucleótidos que se encuentren a ambos lados del sitio de rotura **[Figura 3]**. De esta forma, la maquinaria enzimática reconoce la homología y “copia” la secuencia deseada, que idealmente coincidirá con el corte (aunque en la práctica podemos insertarla en las proximidades del mismo) (5-7).

A pesar del considerable potencial que CRISPR/Cas9 ofrece con estos mecanismos, hay que tener en cuenta los importantes riesgos (como la toxicidad debida a mutaciones no deseadas) y limitaciones que presentan. Estos problemas constituyen en sí mismos un argumento en el debate bioético y han sido una fuente de investigaciones que, con el objetivo de optimizar esta tecnología, han producido prometedoras alternativas y modificaciones que analizaremos en los correspondientes apartados.

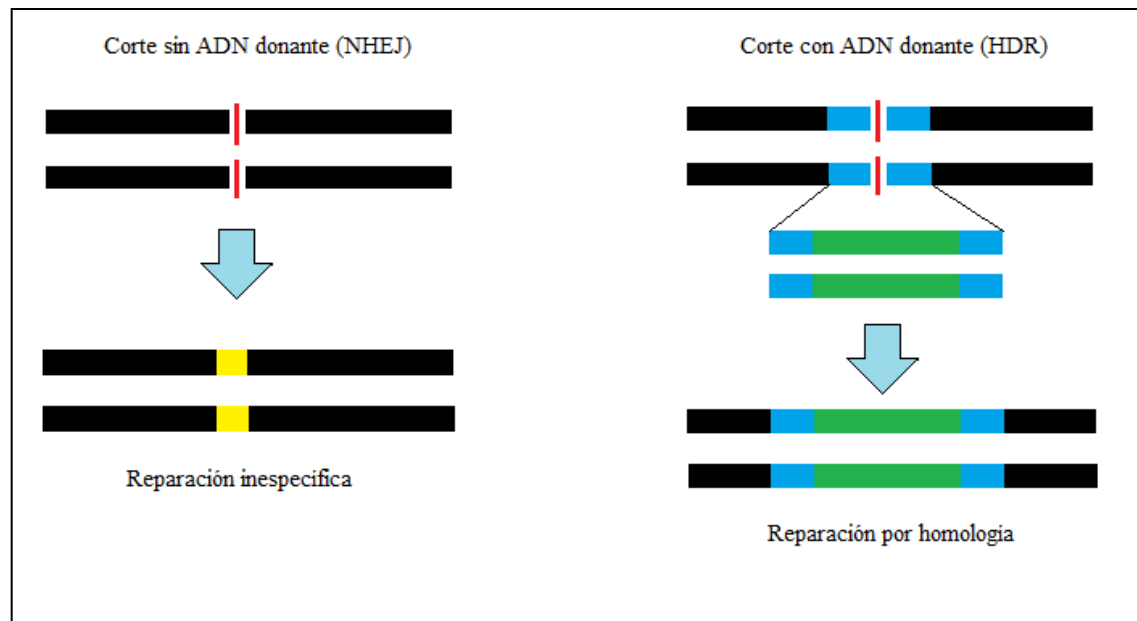


Fig 3. Mecanismos de reparación del ADN en la célula.

4.2 Aplicaciones como terapia génica

A la hora de plantear el abordaje terapéutico de una enfermedad genética, solemos contar con varias alternativas. Por un lado, tenemos los tratamientos convencionales, que no actúan directamente sobre el material genético en ninguna de sus formas; como pueden ser la restitución enzimática o de productos deficitarios, la restricción de fármacos o alimentos o incluso el trasplante. Al margen de estos se encuentra el grupo de las terapias génicas, que buscan conseguir un efecto beneficioso mediante la introducción de ácidos nucleicos en las células. Comprende métodos como la transferencia de ADN con genes terapéuticos, la modificación en la lectura del ARN mensajero (mediante oligonucleótidos antisentido o ARN de interferencia) y la edición o corrección genética. Este último es el que se basa en nucleasas como las de dedos de cinc, las TALENs y, por supuesto, CRISPR/Cas (1).

Actualmente, la mayor parte de las líneas de investigación en el campo de la terapia génica basan sus ensayos en la transferencia "ex vivo" del material genético a células madre hematopoyéticas. Esto se debe al mejor rendimiento que ofrece la selección de células modificadas correctamente

in vitro y su posterior administración a modo de terapia celular (6, 7). Por ello, cobra una gran importancia como posible alternativa en tratamientos antitumorales y antivirales y en enfermedades hereditarias en las que estén involucradas células sanguíneas (como la talasemia o algunas inmunodeficiencias).

Siguiendo con los principios de esta clase de terapias, es posible plantear el abordaje "in vivo" mediante vectores virales (los más frecuentes) como alternativa en enfermedades que no entren en los supuestos ya citados (como es el caso de la fibrosis quística). De forma general, Cas9 es más eficaz cuando se usa frente a enfermedades monogénicas recesivas, experimentándose mejoras graduales con discretos cambios al obtenerse una copia "sana" del gen. Por contra, para tratar las dominantes (sobre todo las que producen acúmulo de productos patogénicos), se requiere inactivar el gen patológico en una cantidad importante de tejido. No obstante, estas últimas podrían ser candidatas a la reparación no mediada por homología (5-7).

La terapia sobre células germinales también ha sido estudiada en animales, aunque constituye un tema más relevante en el apartado sobre bioética.

A continuación, desglosamos las distintas enfermedades frente a las que se han comprobado con mayor interés los efectos de CRISPR/Cas (recogidas asimismo en la tabla-resumen anexada).

4.2.1 Enfermedades hereditarias

Comenzando con las de herencia recesiva, podemos destacar las que afectan a las células sanguíneas. Una de las más estudiadas es la **β -talasemia**, provocada por mutaciones en el gen de la subunidad beta de la hemoglobina (*HBB*) en ambos alelos, que pueden presentarse en homocigosis o en heterocigosis compuesta (lo cual no es raro en este tipo de enfermedades). Como causa de anemia severa, su tratamiento la mayor parte de las veces se realiza a partir de transfusiones periódicas, siendo una alternativa curativa el trasplante de células madre hematopoyéticas de

un donante compatible. Habiéndose comprobado la viabilidad de la inserción del gen por vectores virales, el equipo de Xie et al. decidió ir un paso más allá y emplear Cas9 en combinación con el transposón “piggyBac” en células pluripotenciales (15). Dicha tecnología tiene como función el transporte del ADN “donante” a modo de cassette desde un vector (en el caso de este estudio, un plásmido) hasta el sitio de corte, dejando únicamente el material de interés en el genoma. Con la corrección del gen mutado en ambos alelos, se comprobó un aumento sustancial en la transcripción del gen *HBB*, aunque la preferencia de los eritrocitos por la síntesis de hemoglobina fetal seguía siendo importante.

En un estudio posterior, el equipo de Liang et al. utilizó CRISPR/Cas frente a *HBB* en cigotos tripronucleares humanos (inviabiles y por ello aceptables para la investigación in vitro) con el fin de analizar la especificidad y fiabilidad de esta técnica (16). Entre las limitaciones que encontraron, cabe destacar la baja tasa de edición por homología y el uso de genes endógenos parecidos para realizar la misma (como *HBD*, que codifica para la subunidad delta de la hemoglobina). Un problema común con otros modelos fue la formación de mosaicismos en los embriones (encontrándose distintos tipos de alelos), así como las siempre presentes mutaciones “off-target”.

Otra enfermedad provocada por mutación en *HBB* es la **anemia drepanocítica o de células falciformes**, aunque en este caso se debe al cambio de una base concreta y, por tanto, de un único aminoácido en la proteína codificada (se sustituye glutamato por valina). Esta discreta modificación tiene consecuencias importantes, ya que cambia la estructura cuaternaria de la hemoglobina y hace que el hematíe sea más propenso a la deformación (adquiriendo la característica forma de hoz); provocando a su vez daño vascular y, en última instancia, afectación multiorgánica. Los efectos de CRISPR/Cas ante esta entidad fueron comprobados por DeWitt et al., que utilizaron ribonucleoproteínas (RNPs) en lugar de vectores virales para transportar por electroporación Cas9 y ARN guía junto con el ADN donante a células madre hematopoyéticas (17). Gracias a esto, consiguieron cierto nivel de reparación y aumentaron los niveles de transcripción de productos no patológicos; concluyendo que, aunque lograr

en un futuro la curación de la enfermedad sería una tarea difícil, al menos se podría conseguir una mejoría clínica relevante. El bajo rendimiento de la reparación por homología fue una vez más un problema, pero se evitó la inserción de material viral y se redujo la tasa de mutaciones indeseadas gracias a las propiedades de la ribonucleoproteína como vector.

Las **inmunodeficiencias primarias** son buenas candidatas a estos tratamientos al poder aplicarse en las series mieloide y linfoide. Con la adición génica no reparadora como predecesora en la línea de la terapia génica, las técnicas de edición genética (en concreto, CRISPR/Cas) ya han demostrado su potencial en entidades como la inmunodeficiencia combinada severa o la enfermedad granulomatosa crónica ligada a X (18).

La corrección en células pluripotenciales del gen *JAK3*, cuyas mutaciones son responsables de uno de los fenotipos de la inmunodeficiencia combinada severa (T-B+NK-), dio lugar en un estudio realizado por Chang et al. a una mejora sustancial en la maduración de linfocitos T y NK (19). En cuanto a la enfermedad granulomatosa crónica ligada a X, caracterizada por la incapacidad de las células fagocíticas de producir especies reactivas de oxígeno, Sürün et al. consiguieron un porcentaje aceptable (en torno al 25%) de reparación del gen *CYBB* mediante cambios inespecíficos compatibles con la expresión del mismo, generados por NHEJ (20). La inactivación de dicho gen, que se encuentra en el cromosoma X y codifica para una subunidad catalítica de la NADPH-oxidasa, es la que provoca la enfermedad. Por último, la reparación del gen *CD40LG* (también en el cromosoma X y codificante del ligando de CD40) en el síndrome hiper-IgM ligado a X fue estudiado por el equipo de Kuo et al. En este caso, las mutaciones cursan con fallos en la interacción entre linfocitos B y T, dando lugar a una ausencia de inmunoglobulinas de tipo G, A y E. Los resultados que obtuvieron con el uso de virus adenoasociados fueron prometedores tanto in vitro (a nivel de células madre y de linfocitos T diferenciados) como clínicamente una vez trasplantadas las células en modelos murinos, recuperándose niveles basales de síntesis de CD40L (21).

Dejando a un lado las líneas sanguíneas, podemos destacar a continuación algunas enfermedades menos susceptibles a las terapias ex vivo y por las

que se busca mejorar el transporte de CRISPR/Cas hasta las células en el propio organismo. A pesar de esto, encontramos que la mayoría de los artículos disponibles se basan también en estudios *in vitro*.

La **fibrosis quística** es una enfermedad autosómica recesiva provocada por mutaciones en el gen *CFTR*, que codifica para los canales de cloro de la membrana apical de las células epiteliales. Aunque se han identificado más de 300 mutaciones patogénicas, aproximadamente el 70% de los casos presentan la misma delección de tres pares de bases que codifican para un residuo fenilalanina en posición 508 ($\Delta F508$) (22). Principalmente se manifiesta con importantes alteraciones, tanto respiratorias como digestivas, que reducen considerablemente la esperanza de vida y la calidad de la misma.

Uno de los primeros ensayos con CRISPR/Cas para esta enfermedad fue realizado por Firth et al., quienes consiguieron corregir la delección en células pluripotenciales valiéndose de las ventajas del transposón "piggybac" (23). Varios de los estudios que lo siguieron hicieron uso de los nuevos métodos para aumentar el rendimiento y la especificidad de Cas9, como por ejemplo la transfección mediante RNPs por Ruan et al. (22). Aunque aún queda un largo camino para poder probar esta tecnología *in vivo* en ensayos clínicos, algunos autores (como Xia et al.) ya han puesto el foco en vectores como el adenovirus dependiente de cooperador para realizar dicha tarea. Los beneficios que se han reportado de su uso incluyen el aumento en la capacidad de carga (pudiendo transportar a la vez Cas9-ARN guía y largas secuencias de ADN donante) y la disminución de la inmunogenicidad y las inserciones indeseadas por la rápida desaparición del vector (24).

Un estudio algo diferente a los anteriores es el de Bjursell et al. sobre el **déficit de $\alpha 1$ -antitripsina**, en el que utilizaron Cas9 para provocar una disrupción por reparación no homóloga en alelos mutados (PiZ) del gen *hSERPINA1* (25). Esto se llevó a cabo *in vivo* en modelos murinos, empleando adenovirus como vectores. Pasado un tiempo se comprobó una mejoría a nivel histológico en el hígado (menos fibrosis e inflamación), al no formarse agregados proteicos anómalos. Quedaron en el aire, sin embargo,

las repercusiones del déficit de α 1-antitripsina en el pulmón (más marcadas en homocigotos PiZZ).

En cuanto a enfermedades representativas en este campo de la herencia ligada al cromosoma X, podemos destacar en primer lugar la **hemofilia A**. Este trastorno, condicionado por un déficit en el factor VIII de la coagulación, tiene como causas más prevalentes las inversiones cromosómicas que afectan al gen *F8*. Park et al. consiguieron reparar el reordenamiento en un discreto porcentaje de células madre pluripotenciales in vitro, que posteriormente (diferenciadas en células endoteliales) sirvieron para rescatar ratones con hemofilia A (26).

Compartiendo modelo de herencia con la anterior, la **distrofia muscular de Duchenne** ha gozado del interés de varios grupos de investigación desde los inicios de la terapia génica. Se han utilizado numerosos métodos para intentar corregir las mutaciones en el gen de la distrofina (*DMD*). Entre los estudios más representativos encontramos el de Xu et al., quienes aprovecharon la elevada eficacia de la reparación no homóloga para eliminar un exón mutado y restaurar así el marco de lectura del gen (lo cual recuerda a las tradicionales técnicas de "exon-skipping"). Gracias al aumento en la síntesis de proteínas funcionales, lograron mejoras tanto a nivel celular (comprobadas in vitro) como en modelos murinos con la transfección de cigotos (27). El equipo de Lee et al. optó por un abordaje completamente distinto: la reparación in vivo por homología, con la que buscaron recuperar la proteína en su estado original (no truncada) en ratones afectados. Para ello, administraron novedosos complejos con partículas de oro compuestas por Cas9 RNP, el ADN donante y polímeros catiónicos que permiten la endocitosis del complejo en las células. Tras dos semanas pudo comprobarse que en el tejido muscular de los ratones habían aumentado los niveles de distrofina (28).

Para terminar, podemos destacar dos enfermedades con herencia autosómica dominante que pueden ser candidatas al tratamiento con CRISPR/Cas. Se trata de la **distrofia miotónica de Steiner** y la **enfermedad de Huntington**, derivadas de la expansión anómala de repeticiones de nucleótidos en los genes *DMPK* y *HTT* respectivamente.

Como ya hemos comentado anteriormente, este tipo de enfermedades (AD) pueden beneficiarse en mayor medida de la reparación no homóloga. Así se comprueba en los estudios de van Agtmaal et al. y Monteys et al., que emplean un método similar basado en el corte a ambos lados de la región con repeticiones (29, 30). Con la distrofia miotónica, una enfermedad multisistémica aunque con clara afectación muscular, se comprobó en mioblastos cultivados una mejora en la distribución de sus componentes citoplasmáticos. En el caso de la enfermedad de Huntington, de manifestaciones predominantes a nivel cerebral, se observó un menor acúmulo de proteínas tóxicas tanto en fibroblastos como en tejido cerebral de ratones expuestos in vivo.

4.2.2 Terapia antitumoral

Entre los intentos por incluir CRISPR/Cas al conjunto de estrategias contra el cáncer, cobra fuerza la modulación de los linfocitos T. La modificación a nivel genético en la expresión de moléculas como PD-1 o CTLA4, implicadas en la interacción con la célula tumoral y actualmente dianas de algunas inmunoterapias, es una de las propuestas más prometedoras en este sentido. Dada la naturaleza de los linfocitos, al igual que ocurría en las inmunodeficiencias, es viable y efectivo realizar ediciones ex vivo y seleccionar posteriormente las células que vayan a ser administradas de nuevo al paciente (5). Este modelo constituye un importante exponente de la medicina personalizada, siendo muchos de los componentes que intervienen específicos para cada paciente (sin ir más lejos, las propias células autólogas) y cada tipo de tumor.

Schumann et al. consiguieron reducir la síntesis de PD-1 (cuya activación disminuye la respuesta inmune) y CXCR4 (correceptor responsable de la internalización del VIH) en la membrana de linfocitos manipulados (31). Además de esto, destacaron una vez más las ventajas de utilizar ribonucleoproteínas como elemento transportador de Cas9 frente a plásmidos o virus (menos eficientes y más tóxicos al permanecer más tiempo dentro de las células).

Eyquem et al. también basaron sus ensayos en la modificación de linfocitos T, aunque en este caso introdujeron secuencias codificantes de receptores quiméricos ("CARs") en uno de los locus de los receptores de células T (*TRAC*). Estos receptores, diseñados específicamente contra CD19 (prevalentes en las neoplasias de linfocitos B), en combinación con la disrupción del gen *TRAC*, mejoraron la actividad de los linfocitos T en modelos murinos con leucemia linfoblástica (32).

La potenciación de linfocitos no es la única estrategia en este campo, puesto que otros grupos han utilizado como diana algunos de los genes de las propias células tumorales. Es el caso de un reciente estudio de Wei et al., en el que utilizaron CRISPR/Cas para inutilizar el gen de los receptores de andrógenos en células tumorales prostáticas hormonosensibles (33). Tras observar la evolución de los cultivos celulares in vitro, pudieron objetivar una inhibición en la proliferación de estas células y un aumento de los fenómenos de apoptosis frente a controles.

4.2.3 Terapia antiviral

El uso de la edición genética como herramienta contra las infecciones virales es, sin duda, otra de las grandes aplicaciones terapéuticas que podemos analizar en este trabajo. Aunque la mayoría de las investigaciones se centran, al igual que en el apartado anterior, en la modulación de células del sistema inmune (como con los ya comentados correceptores CXCR4); otros autores han propuesto la rotura del propio ADN viral (o proviral) como alternativa terapéutica. En cuanto a los principales candidatos a esta tecnología, destaca el virus de la inmunodeficiencia humana; seguido por otros virus con potencial oncogénico como el de la hepatitis B.

Dos de los estudios que podemos destacar se basan precisamente en la disrupción de los correceptores CXCR4 y CCR5. El equipo de Hou et al. consiguió, usando lentivirus como vectores, la transfección de Cas9 y ARN guía frente a *CXCR4* en células T CD4+. Tras verificar la ausencia de expresión del gen, comprobaron que la resistencia de los linfocitos aumentó en contacto con cepas de VIH (34). Por otro lado, Ye et al. utilizaron como

modelo la mutación CCR5 Δ 32, que ocurre de forma natural en la población, para construir una secuencia de ADN donante. La introducción de Cas9 y los demás componentes en células madre pluripotenciales dio como resultado el silenciamiento del gen tanto por la reparación homóloga como por la no homóloga. Posteriormente, diferenciaron las células en macrófagos y determinaron que estos eran más resistentes frente al VIH (35).

Kaminski et al. realizaron un abordaje diferente al guiar a Cas9 hasta las repeticiones terminales (regiones LTR) del ADN proviral integrado en células infectadas por VIH (36). El análisis sobre las células T modificadas confirmó que el número de copias virales se había reducido de forma sustancial a lo largo de los cromosomas.

Respecto al virus de la hepatitis B, grupos de investigación como el de Ramanan et al. han querido buscar una solución a la persistencia de ADN viral episomal (no integrado en el genoma de las células), uno de los mayores obstáculos en la curación de la infección crónica. En un artículo describen cómo consiguieron inducir la mutagénesis y eliminación del ADN episomal, creando ARN guía homólogo a regiones conservadas del virus. Dada la especificidad de dichas secuencias, se redujo considerablemente la cantidad de efectos "off-target" en el genoma propio de las células (37).

Vistos todos estos ejemplos, queda patente el potencial que podría tener en un futuro CRISPR/Cas como opción terapéutica en humanos. No obstante, su utilidad puede ir más allá y entrar en el campo de la prevención primaria; tal como se refleja en las conclusiones de un ensayo realizado por Ding et al., en el que lograron reducir los niveles de colesterol plasmático hasta en un 40% en ratones. Para ello emplearon adenovirus cargados con Cas9 dirigido contra el gen *PCSK9*, que codifica una proteína antagonista de los receptores de LDLc hepáticos (38).

4.3 Desarrollo de CRISPR/Cas

Las limitaciones documentadas en estudios como los del apartado anterior suponen un importante obstáculo para el uso de esta tecnología en humanos. Desde su adaptación para la edición genética en células eucariotas, han surgido numerosas propuestas y modificaciones destinadas tanto a resolver estos problemas como a ampliar el rango de aplicaciones de CRISPR/Cas.

4.3.1 Transferencia y vectores

Ya sea ex vivo o dentro del propio organismo, los métodos de transferencia de CRISPR/Cas han ido cambiando con la búsqueda de una mayor seguridad y eficacia. Entre los vectores convencionales, encontramos los plásmidos, los liposomas y los virus; siendo estos dos últimos los más utilizados in vivo (1, 3). El hecho de que muchos vectores virales provoquen mutagénesis insercional y respuesta inmune ha incentivado el uso de candidatos concretos como los virus adenoasociados. Estos tienen un menor potencial inmunógeno e insercional, aunque su capacidad de carga es limitada, por lo que no pueden transportar todos los componentes juntos hasta las células (7). La respuesta a este inconveniente podría ser la adaptación de otras variedades de nucleasas Cas, como la Cas9 de *Staphylococcus aureus* utilizada por Ran et al., de un peso menor a SpCas9 pero de eficacia similar (39). Los virus dependientes de cooperador, como ya hemos comentado, comparten algunas de las ventajas de los adenoasociados y además su capacidad de carga es mayor (7, 24).

Actualmente, uno de los métodos nuevos que más se está empleando es el transporte en forma de complejos de ribonucleoproteínas, dada su menor estabilidad que hace que Cas9 esté menos tiempo en contacto con el genoma (produciendo por tanto menos cortes fuera de lugar). Su uso no se restringe a la edición ex vivo (17, 22), puesto que como hemos visto se pueden combinar con partículas de oro y polímeros catiónicos para su distribución por el organismo (28).

4.3.2 Efectos “off-target”

Un problema recurrente en la mayoría de ensayos que utilizan CRISPR/Cas son los cortes que realiza la nucleasa fuera de la región deseada. Esto se debe sobre todo a la similitud entre los ARN guía y otras secuencias de ADN repartidas a lo largo del genoma. Se ha reportado que Cas9 puede tolerar hasta un total de cinco nucleótidos discordantes (“mismatches”) entre el ARN guía y el ADN al que se acople. Es por ello que se han desarrollado herramientas informáticas como T7E1 o Surveyor capaces de hacer una aproximación predictiva de los cortes que realizará Cas9 con un ARN determinado (7).

Se han propuesto diversas modificaciones tanto en el ARN guía como en la propia nucleasa para aumentar la especificidad frente al sitio de corte. El equipo de Fu et al. comprobó una importante reducción cuantitativa de los efectos “off-target” (a la vez que se conservaba la eficacia) utilizando secuencias de ARN truncadas para dirigir Cas9 (40). Estas secuencias, de 17 a 18 nucleótidos, eran más cortas que las convencionales de 20. Otros autores, como Kleinstever et al., han diseñado variantes de Cas9 con alta especificidad, capaces de reducir los cortes indeseados a niveles prácticamente indetectables (41).

4.3.3 Eficacia y otras aplicaciones

Una complicación adicional que surge al utilizar secuencias de ADN donante es la alta tasa de reparaciones no homólogas (NHEJ), en detrimento de las inserciones mediadas por homología (HDR). Para aumentar la eficacia de estas últimas, que suele rondar el 20% en la mayoría de los casos, se ha estudiado el efecto de los inhibidores de la ADN-ligasa IV, una enzima fundamental en la vía con la que compite. Maruyama et al. utilizaron Scr7 junto con Cas9 para este fin en células in vitro y en ratones, alcanzando tasas muy superiores de recombinación por homología (42).

Es importante destacar que el rango de aplicaciones de CRISPR/Cas se ha ido incrementando a medida que surgían nuevas modificaciones en su

diseño. Un ejemplo de esto es la variante de Cas9 fusionada con la enzima citidina deaminasa (Komor et al.), capaz de realizar conversiones de citidina a uridina y, por tanto, de sustituir nucleótidos de forma individual (en concreto, citosina por timina y guanina por adenina). Esta técnica se basa del mismo modo en secuencias guía de ARN pero no induce roturas en la doble hebra de ADN (43).

Otra aproximación interesante surge de la propuesta de regular la transcripción en lugar de modificar los mismos genes. Uno de los primeros equipos en seguir esta tendencia fue el de Qi et al., que utilizó Cas9 sin capacidad catalítica en *Escherichia coli* para frenar la elongación de la región objetivo y la unión de enzimas y factores relacionados con la transcripción (44). Los efectos de este sistema, al que denominaron CRISPRi ("CRISPR interference") son reversibles y pueden involucrar a varios genes simultáneamente. Por otro lado, varios estudios han incidido en la contribución que CRISPR/Cas podría hacer en el cada vez más presente campo de la epigenética. La fusión de Cas9 desactivadas (sin capacidad catalítica) con enzimas "epiefectoras" permite silenciar o reactivar genes por distintos mecanismos reversibles, como la metilación o la acetilación (45).

Por último, podemos resaltar el posible valor diagnóstico de esta tecnología más allá de todas las aplicaciones terapéuticas ya comentadas. Un ejemplo del mismo es la plataforma SHERLOCK ("Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking"), diseñada por el equipo de Gootenberg et al. y basada en una variante especial de proteína Cas con actividad ARNasa: Cas13a. El uso de esta enzima junto con ARN guía y ARN señalizador ("reporter", fluorescente al ser escindido) permite detectar in vitro de forma específica material genético de patógenos como el virus del Zika o algunas bacterias, así como ciertas mutaciones oncogénicas (46).

4.4 Cuestiones bioética y sobre regulación

El descubrimiento de la tecnología basada en CRISPR ha abierto de nuevo un intenso debate ético sobre el alcance de la ingeniería genética. Sin duda, el tema más controvertido en este sentido es la edición genética de células germinales, estando prohibida su aplicación reproductiva en muchos países. Esta técnica se realiza mediante la microinyección de la nucleasa en embriones en etapas precoces o en células espermatozógenas (más eficaz para evitar mosaicismos). La obtención de estas muestras depende de la legislación vigente en cada país, pudiendo crearse embriones en laboratorio si esta lo permite o recurriendo a embriones descartados de programas de fecundación in vitro o de cribado preimplantacional en otros casos (47). Diversos grupos a lo largo de los últimos años han solicitado el endurecimiento de las regulaciones y la paralización de la investigación con dichas células, sobre todo a raíz de estudios como el de Liang et al. con cigotos triplicados (16, 48, 49).

Nos encontramos frente al último eslabón de una cadena cuyo principio podemos situar en la Conferencia de Asilomar de 1975, uno de los primeros hitos de la bioética en el campo de la manipulación genética, en la que se discutieron las implicaciones del desarrollo de la tecnología del ADN recombinante (48). Desde entonces, a pesar de que los avances en el campo de la genética suelen ir un paso por delante de las normas éticas y jurídicas, ya se han establecido ciertos consensos y herramientas que permiten regular este tipo de prácticas. Como ejemplos, podemos citar la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos de 1997, que a su vez impulsó la creación de comités plurales de bioética, o el Convenio sobre Derechos Humanos y Biomedicina del mismo año, también conocido como "Convenio de Oviedo". En este último, se estipula la posibilidad de modificar el genoma humano únicamente con razones preventivas, terapéuticas o diagnósticas y siempre que no se altere el material genético de la descendencia (2).

Las fuertes limitaciones y las preocupaciones en torno a la experimentación en línea germinal en una parte importante del panorama internacional han hecho que la mayoría de las investigaciones se centren en las células

somáticas. Prácticamente todos estos estudios están supervisados por instituciones y comisiones correspondientes a distintos países, como la Food and Drug Administration en Estados Unidos o el Gene Therapy Advisory Committee en Reino Unido (1).

En cuanto a los problemas éticos de esta tecnología, la necesidad de minimizar los riesgos inherentes a la misma es un punto importante a tener en cuenta en este apartado. Algunos de estos peligros, como la mutagénesis de inserción o la inmunogenicidad que provocan los vectores virales, ya han sido comentados en este trabajo. Sin embargo, cabe mencionar también un problema no menos preocupante, como es la dotación de resistencias o genes de virulencia a los vectores utilizados. Esta posibilidad, que apareció con el desarrollo del ADN recombinante y los organismos transgénicos, sigue estando presente (en menor medida) a pesar de las medidas adoptadas en materia de protección biológica y física (2, 4).

Para que la aplicación de CRISPR en humanos se considere éticamente aceptable, además de cumplir unos estándares de seguridad, debería evidenciarse su beneficio como terapia frente a alternativas menos efectivas o que suponen mayores riesgos. De esta forma, el desarrollo de esta técnica en líneas somáticas podría llegar a cumplir idealmente (si se llegasen a salvar las desigualdades a la hora de acceder a ella) los cuatro principios de Beauchamp y Childress: beneficencia, no maleficencia, autonomía y justicia (2).

Pasando a analizar los aspectos específicos de la manipulación de células germinales, podemos comenzar por un argumento preventivo basado en el "efecto bola de nieve" o "*slippery slope*" (1): al autorizar y normalizar este tipo de técnicas (aunque sea con fines terapéuticos), la evolución de las mismas podría descontrolarse y dar lugar a problemas más importantes. Un ejemplo de esto sería la ingeniería perfectiva, es decir, la edición genética de células germinales sin intención preventiva ni terapéutica. Ya conocemos las consecuencias más previsibles de esta práctica, puesto que estaríamos sometiendo a un futuro individuo (y probablemente a las generaciones sucesivas) a un riesgo innecesario sin aportarle ningún beneficio. Sin

embargo, las repercusiones en la sociedad como colectivo podrían alcanzar niveles distópicos si se retomasen teorías eugenésicas como las que surgieron en el siglo XX, que podrían hacernos perder gran parte de nuestro "patrimonio genético" (2, 4, 48, 50).

Pese a esto, a medida que se incrementen tanto el consenso social como la seguridad de las técnicas de edición genética, es de esperar que muchos países (sobre todo los más permisivos en estas cuestiones) creen condiciones más favorables para la investigación en línea germinal e incluso empiecen a aplicarla en la práctica clínica. Las repercusiones en el acervo genético de la población serían discretas si nos ceñimos al uso como terapia génica, afectando sobre todo a subgrupos determinados (como ya pasaría por ejemplo con el síndrome de Down tras la implantación del cribado prenatal) (50).

El conflicto que surge con los principios fundamentales de la bioética también es un tema muy discutido, siendo el de beneficencia el que suele contraponerse a los otros tres. Aunque muchos autores coinciden que los padres son los más indicados para tomar decisiones, se sigue poniendo en cuestión el cumplimiento de la autonomía del embrión. El principio de justicia se ve comprometido por las diferencias entre regiones, culturas y estatus socioeconómicos; que limitan el acceso a esta tecnología. Tan es así, que de llegar aplicarse podría incrementar dichas desigualdades y convertir las enfermedades genéticas en algo relegado a ciertos grupos poblacionales. En cuanto a la no maleficencia, hay que tener presentes los diversos puntos de vista respecto a esta técnica; ya que en algunas culturas la manipulación genética del embrión podría interpretarse como un ataque a la dignidad, la identidad y el estatus moral del futuro recién nacido. Esto, a su vez, podría menoscabar en ciertos supuestos la aceptación incondicional del mismo por parte de los padres (49, 50).

Más allá de todas estas preocupaciones, algunos investigadores consideran que el beneficio potencial de esta tecnología debería obligarnos moralmente a perseguir su adaptación y aplicación a la práctica clínica. Entre los argumentos de los defensores de la edición de células germinales, están el mayor control sobre las enfermedades genéticas (evitando daños en las

primeras etapas del desarrollo) y la posibilidad de actuar a niveles difícilmente accesibles con la terapia de células somáticas (como las neuronas). Otro punto a favor podría ser la desaparición definitiva de la mutación patológica en todas las células del sujeto, sin posibilidad de ser transmitida a la descendencia a diferencia de lo que ocurre con la edición en células no germinales (se especula que esta podría contribuir a aumentar la proporción de genes deletéreos en la población) (2, 48).

Por otra parte, también existe cierta inquietud por la posibilidad de que diversos grupos con intereses económicos aprovechen este nuevo nicho y lo dirijan a su antojo. Esto se une a la preocupación de que surjan productos o tratamientos que no estén lo suficientemente validados (48).

En definitiva, aunque hay opiniones polarizadas al respecto, una gran cantidad de autores mantienen una actitud mesurada y expectante respecto al desarrollo de la manipulación genética en líneas germinales; teniendo en consideración tanto las repercusiones de su uso en humanos como las del abandono de su investigación. Sigue siendo necesario profundizar en los beneficios y los riesgos de esta tecnología, así como consultar e involucrar al resto de la sociedad en el debate sobre sus posibles usos y problemas éticos (2, 49).

5. Conclusiones

- CRISPR/Cas ha demostrado tener el potencial para convertirse en un valioso recurso terapéutico frente a enfermedades hereditarias, virus y neoplasias.
- A falta de encontrar métodos que mejoren todavía más la eficacia de esta tecnología, las mejores candidatas para la edición genética ex vivo serían las células precursoras de las series mieloide y linfoide, por la posibilidad de seleccionarlas antes de su administración al paciente.
- La adaptación de esta técnica a la práctica clínica pasa por el diseño de vectores óptimos para la transferencia de los componentes necesarios a las células, la desaparición de las mutaciones indeseadas y la mejora de la eficacia global de la misma.
- El debate ético en torno a CRISPR/Cas se centra en las cuestiones relativas a la edición de células germinales, siendo su deriva no terapéutica la mayor preocupación.
- La mejora en las condiciones de seguridad y la incorporación de otras esferas de la sociedad son fundamentales para la aceptación de esta técnica.

6. Bibliografía

1. Turnpenny PD, Ellard S. Emery. Elementos de genética médica. 15ª ed. Barcelona: Elsevier; 2018.
2. Lacadena JR. Genética y bioética. 2ª ed. Madrid: Universidad Pontificia Comillas; 2003.
3. Izquierdo Rojo M. Ingeniería genética y transferencia génica. Madrid: Pirámide; 1999.
4. Ho M-W. Ingeniería genética: ¿sueño o pesadilla? Barcelona: Gedisa Editorial; 2001.
5. 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;53(2):443–68.
6. Conboy I, Murthy N, Etienne J, Robinson Z. Making gene editing a therapeutic reality. *F1000Research*. 2018;7:1970.
7. Lockyer EJ. The potential of CRISPR-Cas9 for treating genetic disorders. *Biosci Horizons*. 2016;9:1–10.
8. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakamura A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987;169(12):5429–33.
9. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*. 2009;155(3):733–40.

10. Mojica FJ, Juez G, Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol.* 1993;9(3):613–21.
11. Mojica FJM, 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(1):244–6.
12. Ruud. J, Van EJDA, Wim. G, M. SL. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 2002;43(6):1565–75.
13. 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):1709–12.
14. 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(6096):816–21.
15. Xie F, Cas C, Ye L, Chang JC, Res G, Beyer AI, et al. Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome Res.* 2014;1526–33.
16. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell.* 2015;6(5):363–72.
17. DeWitt MA, Magis W, Bray NL, Wang T, Berman JR, Urbinati F, et al. Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. *Sci Transl Med.* 2016;8(360).
18. Kohn DB, Kuo CY. New frontiers in the therapy of primary immunodeficiency: From gene addition to gene editing. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(3):726–32.

19. Chang CW, Lai YS, Westin E, Khodadadi-Jamayran A, Pawlik KM, Lamb LS, et al. Modeling Human Severe Combined Immunodeficiency and Correction by CRISPR/Cas9-Enhanced Gene Targeting. *Cell Rep.* 2015;12(10):1668–77.
20. Sürün D, Schwäble J, Tomasovic A, Ehling R, Stein S, Kurrle N, et al. High Efficiency Gene Correction in Hematopoietic Cells by Donor-Template-Free CRISPR/Cas9 Genome Editing. *Mol Ther-Nucleic Acids.* 2018;10(March):1–8.
21. Kuo CY, Long JD, Campo-Fernandez B, de Oliveira S, Cooper AR, Romero Z, et al. Site-Specific Gene Editing of Human Hematopoietic Stem Cells for X-Linked Hyper-IgM Syndrome. *Cell Rep.* 2018;23(9):2606–16.
22. Ruan J, Hirai H, Yang D, Ma L, Hou X, Jiang H, et al. Efficient Gene Editing at Major CFTR Mutation Loci. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2019;16(June):73–81.
23. Firth A, Menon T, Parker G, Qualls S, Lewis B, Ke E et al. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Reports.* 2015;12(9):1385-1390.
24. Xia E, Duan R, Shi F, Seigel KE, Grasemann H, Hu J. Overcoming the Undesirable CRISPR-Cas9 Expression in Gene Correction. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2018;13(December):699–709.
25. Nitsch R, Bjursell M, Porritt MJ, Ericson E, Taheri-Ghahfarokhi A, Clausen M, et al. Therapeutic Genome Editing With CRISPR/Cas9 in a Humanized Mouse Model Ameliorates α 1-antitrypsin Deficiency Phenotype. *EBioMedicine.* 2018;29:104–11.
26. Park C-Y, Kim DH, Son JS, Sung JJ, Lee J, Bae S, et al. Functional Correction of Large Factor VIII Gene Chromosomal Inversions in Hemophilia A Patient-Derived iPSCs Using CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell.* 2015;17(2):213–20.
27. Xu L, Park KH, Zhao L, Xu J, El Refaey M, Gao Y, et al. CRISPR-mediated genome editing restores dystrophin expression and function in mdx mice. *Mol Ther.* 2016;24(3):564–9.

28. Lee K, Conboy M, Park H, Jiang F, Kim H, Dewitt M et al. Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair. *Nat Biomed Eng.* 2017;1(11):889-901.
29. van Agtmaal EL, André LM, Willemse M, Cumming SA, van Kessel IDG, van den Broek WJAA, et al. CRISPR/Cas9-Induced (CTG·CAG) n Repeat Instability in the Myotonic Dystrophy Type 1 Locus: Implications for Therapeutic Genome Editing. *Mol Ther.* 2017;25(1):24–43.
30. Monteys AM, Ebanks SA, Keiser MS, Davidson BL. CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele In Vitro and In Vivo. *Mol Ther.* 2017;25(1):12–23.
31. Schumann K, Lin S, Boyer E, Simeonov DR, Subramaniam M, Gate RE, et al. Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112(33):10437–42.
32. Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, van der Stegen S, Hamieh M, Cunanan K et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature.* 2017;543(7643):113-117.
33. Wei C, Wang F, Liu W, Zhao W, Yang Y, Li K, et al. CRISPR/Cas9 targeting of the androgen receptor suppresses the growth of LNCaP human prostate cancer cells. *Mol Med Rep.* 2018;17(2):2901–6.
34. Hou P, Chen S, Wang S, Yu X, Chen Y, Jiang M, et al. Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. *Sci Rep.* 2015;5:1–12.
35. Ye L, Wang J, Beyer AI, Teque F, Cradick TJ, Qi Z, et al. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 Δ 32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(26):9591–6.

36. Kaminski R, Chen Y, Fischer T, Tedaldi E, Napoli A, Zhang Y, et al. Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Sci Rep.* 2016;6(December 2015):1–15.
37. Ramanan V, Shlomai A, Cox DBT, Schwartz RE, Michailidis E, Bhatta A, et al. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus. *Sci Rep.* 2015;5(1):1–9.
38. Ding Q, Strong A, Patel KM, Ng SL, Gosis BS, Regan SN, et al. Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ Res.* 2014;115(5):488–92.
39. Ran FA, Cong L, Yan W, Scott D, Gootenberg J, Kriz A et al. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature.* 2015;520(7546):186-191.
40. Fu Y, Sander J, Reyon D, Cascio V, Joung J. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature Biotechnology.* 2014;32(3):279-284.
41. Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 variants with undetectable genome-wide off-targets. *Nature.* 2016;528(7587):490–5.
42. Maruyama T, Dougan SK, Truttmann M, Bilate AM, Ingram JR, Ploegh HL. Inhibition of non-homologous end joining increases the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing. *Nat Biotechnol.* 2015;33(5):6.
43. 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.
44. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell.* 2013;152(5):1173–83.

45. Xie N, Zhou Y, Sun Q, Tang B. Novel Epigenetic Techniques Provided by the CRISPR/Cas9 System. *Stem Cells Int.* 2018;2018:1–12.
46. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science.* 2017;356(6336):438-442.
47. Ishii T. Germline genome-editing research and its socioethical implications. *Trends Mol Med.* 2015;21(8):473–81.
48. Chan S, Medina Arellano M. Genome editing and international regulatory challenges: Lessons from Mexico. *Ethics, Med Public Heal.* 2016;2(3):426–34.
49. Howard HC, Van El CG, Forzano F, Radojkovic D, Rial-Sebbag E, De Wert G, et al. One small edit for humans, one giant edit for humankind? Points and questions to consider for a responsible way forward for gene editing in humans. *Eur J Hum Genet.* 2018;26(1):1–11.
50. Ormond KE, Mortlock DP, Scholes DT, Bombard Y, Brody LC, Faucett WA, et al. Human Germline Genome Editing. *Am J Hum Genet.* 2017;101(2):167–76.

7. Listado de abreviaturas

CRISPR - "clustered regularly interspaced short palindromic repeats"/ repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas

CAS - "CRISPR associated"/ asociado a CRISPR (gen/proteína)

ADN/ARN - ácido desoxirribonucleico/ ácido ribonucleico

HDR - "homology directed repair"/ reparación dirigida por homología

NHEJ - "non-homologous end joining"/ unión de extremos no homóloga

TALEN - "transcription activator-like effector nuclease"/ nucleasa de actividad similar a activador de transcripción

OTE - "off-target effect"/ efecto (mutación) fuera de lugar

crARN/tracrARN - CRISPR-ARN/CRISPR-ARN trans-activador

PAM - "protospacer adjacent motif"/ motivo adyacente al protoespaciador

HBB/HBD - gen de la subunidad beta/delta de la hemoglobina (respectivamente)

RNP - ribonucleoproteína

JAK3 - "Janus kinase 3 gene"/ gen de Janus quinasa 3

CYBB - gen de la cadena beta del citocromo B-245

CD - "cluster of differentiation"/ grupos de diferenciación

CFTR - "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene"/ gen del regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística

PiZ - "protease inhibitor Z"/ inhibidor de proteasa variante Z

hSERPINA1 - "serpin family A member 1 gene"/ gen del miembro 1 de la familia A de las serpinas

F8 - gen del factor VIII de la coagulación

DMD - "Duchenne muscular dystrophy gene"/ gen de la distrofia muscular de Duchenne

DMPK - "dystrophia myotonica protein kinase gene"/ gen de la proteína quinasa de la distrofia miotónica

HTT - "huntingtin gene"/ gen de la huntingtina

AD/AR/LXR - autosómico dominante/autosómico recesivo/ligado a X recesivo

PD-1 - "programmed cell death protein 1"/ proteína 1 de muerte celular programada

CTLA-4 - "cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4"/ proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos

CXCR4 - "CXC chemokine receptor 4"/ receptor 4 de quimiocinas CXC

VIH - Virus de la inmunodeficiencia humana

CAR - "chimeric antigen receptor"/ receptor quimérico de antígenos

TRAC - "T-cell receptor alpha constant gene"/ gen de constante alfa del receptor de células T

CCR5 - "CC chemokine receptor 5"/ receptor 5 de quimiocinas CC

LTR - "long terminal repeat"/ repeticiones terminales largas

PCSK9 - "proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 gene"/ gen de la proproteína convertasa subtilisina/kexina 9

LDLc - "low-density lipoprotein cholesterol"/ colesterol de lipoproteínas de baja densidad

SHERLOCK - "specific high sensitivity enzymatic unlocking"/ detección enzimática específica de alta sensibilidad

Anexo: tabla de aplicaciones terapéuticas

Tabla 1. Ejemplos de potenciales aplicaciones terapéuticas de CRISPR/Cas.
AR: herencia autosómica recesiva. LXR: herencia ligada a X recesiva. AD:
herencia autosómica dominante. HDR: reparación mediada por homología.
NHEJ: reparación inespecífica

Enfermedad	Gen objetivo	Mecanismo/vector	Resultado	Referencias
β -talasemia (AR)	<i>HBB</i>	HDR, piggyBac e inyección en cigotos	Reparación del gen/ Síntesis de globina β	15, 16
Anemia drepanocítica (AR)	<i>HBB</i>	HDR, transfección por RNPs	Incremento en la síntesis de hemoglobina normal	17
Inmunodeficiencia combinada severa (AR)	<i>JAK3</i>	HDR, lentivirus	Maduración de linfocitos T y NK	19
Enfermedad granulomatosa crónica (LXR)	<i>CYBB</i>	NHEJ ("indels" compatibles), lentivirus	Recuperación de gen funcional	20
Síndrome hiper-IgM (LXR)	<i>CD40LG</i>	HDR, virus adenoasociados	Unión a receptores CD40	21
Fibrosis quística (AR)	<i>CFTR</i>	HDR; piggyBac, RNPs y virus dependientes de cooperador	Restauración del gen y del canal de cloro	22-24
Déficit de α 1-antitripsina (AR)	<i>hSERPINA1</i>	NHEJ, adenovirus	Menor fibrosis a nivel hepático	25
Hemofilia A (LXR)	<i>F8</i>	HDR, plásmidos	Actividad F8 y rescate de ratones con la enfermedad	26
Distrofia muscular de Duchenne (LXR)	<i>DMD</i>	NHEJ generando proteína truncada, HDR con partículas de oro	Síntesis de proteínas funcionales, mejoras a nivel celular y en ratones	27, 28
Distrofia miotónica de Steiner (AD)	<i>DMPK</i>	NHEJ, plásmidos	Distintas mejoras a nivel celular	29
Enfermedad de Huntington (AD)	<i>HTT</i>	NHEJ, virus adenoasociados y plásmidos	Menor depósito tóxico en fibroblastos y ratones	30
Cáncer	<i>PDCD1, TRAC, AR</i>	NHEJ (contra <i>PDCD1</i> en linfocitos y genes de receptores tumorales) y HDR (introducción de receptores quiméricos contra CD19)	Aumento de la actividad linfocitaria/ Inhibición de los estímulos de proliferación.	31-33
Infección por VIH	<i>CXCR4, CCR5, ADN proviral</i>	NHEJ (contra <i>CXCR4</i> en linfocitos y ADN proviral) y HDR (introducción de delección en <i>CCR5</i>)	Aumento de la resistencia de los linfocitos T/ Eliminación de copias virales.	34-36