



UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Trabajo Fin de Grado

Sistema CRISPR-CAS: La nueva era en genética aplicada

Alumno: Francisco Javier Velasco Carballo

Febrero, 2021



UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Trabajo Fin de Grado

Sistema CRISPR-CAS: La nueva era en genética aplicada

Alumno: Francisco Javier Velasco Carballo

Febrero, 2021

RESUMEN

CRISPR/Cas es un sistema inmune adaptativo bacteriano que actúa frente a los virus. Descubierta en la década de los 70, supuso un antes y un después en la investigación. Este sistema está formado por las secuencias CRISPR (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente interespaciadas) y una endonucleasa Cas que es capaz de cortar el material genético exógeno en sitios específicos mediante un ARN guía. Gracias a su fácil acceso y bajo costo se está utilizando en muchísimas ramas de la investigación y supone a día de hoy una poderosa herramienta para la edición genómica. Es por ello, que posee un gran número de aplicaciones como es, por ejemplo, la detección de la COVID-19.

En esta revisión bibliográfica, se analiza el origen, su estructura, tipos de CRISPR-Cas, así como, otros tipos de técnicas de edición genética, aplicaciones en diversos campos y una discusión ética derivadas de éstas.

Palabras clave: CRISPR-Cas, edición genómica, TALEN, ZFN, NHEJ, HDR, terapia génica, Cas, bioética, ADN, ARN, COVID-19.

ABSTRACT

CRISPR/Cas is a bacterial adaptive immune system that acts against viruses. It was discovered in the 1970s, it marked a turning point in research. This system consists of CRISPR sequences (Clustered Regularly Interspaced Short Interspaced Palindromic Repeats) and Cas, an endonuclease that is capable of cutting site-specific exogenous genetic material by means of a guide RNA. Thanks to its easy accessibility and low cost, it is being used in many branches of research. Nowadays, it is a powerful tool for genomic editing. For this reason, it has a large number of applications such as, the detection of COVID-19.

In this review, the origin, structure, types of CRISPR-Cas, as well as other types of gene editing techniques, applications in various fields and an ethical discussion derived from them are analyzed.

Key words: CRISPR-Cas, genome editing, TALEN, ZFN, NHEJ, HDR, gene therapy, Cas, bioethics, DNA, RNA, COVID-19.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
2. OBJETIVOS	5
3. METODOLOGÍA	5
4. ANTECEDENTES	5
4.1 Otras técnicas de edición genética	5
4.1.1 <i>Recombinación homóloga HDR en la edición del genoma</i>	<i>7</i>
4.1.2 <i>Nucleasas de dedos de zinc, ZFNs</i>	<i>9</i>
4.1.3 <i>Nucleasas Efectoras Activadoras de la Transcripción, TALEN</i>	<i>10</i>
4.2 Origen del sistema CRISPR-Cas	10
4.2.1 <i>Descubrimiento</i>	<i>12</i>
4.2.2 <i>Identificación de los genes Cas</i>	<i>12</i>
4.2.3 <i>Función biológica</i>	<i>13</i>
5. SISTEMA CRISPR-CAS	13
5.1 Estructura	14
5.2 Mecanismo de acción	15
5.3 Tipos	17
5.4 CRISPR-CAS9	19
6. APLICACIONES	19
6.1 <i>Terapia Génica</i>	<i>20</i>
6.2 <i>SARS-CoV-2</i>	<i>23</i>
6.3 <i>CRISPR como solución a las resistencias antibióticas</i>	<i>24</i>
6.4 <i>Biotecnología vegetal</i>	<i>25</i>
6.5 <i>Inconvenientes del sistema CRISPR-Cas9: Off target</i>	<i>26</i>
7. IMPLICACIONES ÉTICAS	26
8. DISCUSION	28
9. CONCLUSIONES	29
10. BIBLIOGRAFÍA	29

1. INTRODUCCIÓN

El sistema CRISPR-CAS se ha convertido en una herramienta casi indispensable hoy en día en investigación. Este sistema procariótico de defensa frente a bacteriófagos y plásmidos se ha convertido en una de las herramientas más utilizadas por su versatilidad, eficiencia y costo reducido en la ingeniería genética (Hryhorowicz *et al.*, 2017). Por otro lado, la capacidad programable de la enzima Cas está revolucionando diversos campos de la investigación médica, la biotecnología y la agricultura (Adli, 2018). Es por ello que está sustituyendo a otras técnicas equivalentes pero que debido a su gran costo y bajo rendimiento suponen un gran problema a efectos prácticos.

2. OBJETIVOS

El objetivo de esta revisión bibliográfica es analizar el progreso de las técnicas de edición genómica, centrándonos en el desarrollo de CRISPR/CAS, su estado actual y sus aplicaciones en diversos campos de la ciencia, para finalizar con un análisis de los problemas éticos sobre el uso de esta técnica.

3. METODOLOGÍA

El procedimiento para llevar a cabo este trabajo se basa en una revisión bibliográfica de los artículos publicados sobre esta técnica. Se ha realizado utilizando buscadores específicos de bibliografía científica (*PubMed*, *WorldWideScience* y *Google Scholar* entre otros), además de identificar nodos y sitios relevantes disponibles on-line.

4. ANTECEDENTES

4.1 Primeras técnicas de edición genómica

4.1.1 Recombinación homóloga en la edición del genoma

La recombinación homóloga es un tipo de recombinación genética en la que las secuencias de nucleótidos se intercambian entre dos moléculas similares o idénticas de ADN. Es la más utilizada por las células para reparar roturas nocivas (**Figura 1**) que se producen en ambas hebras de ADN, conocidas como rupturas de doble hebra (*DBS, double strand break*) (Alberts *et al.*, 2002).

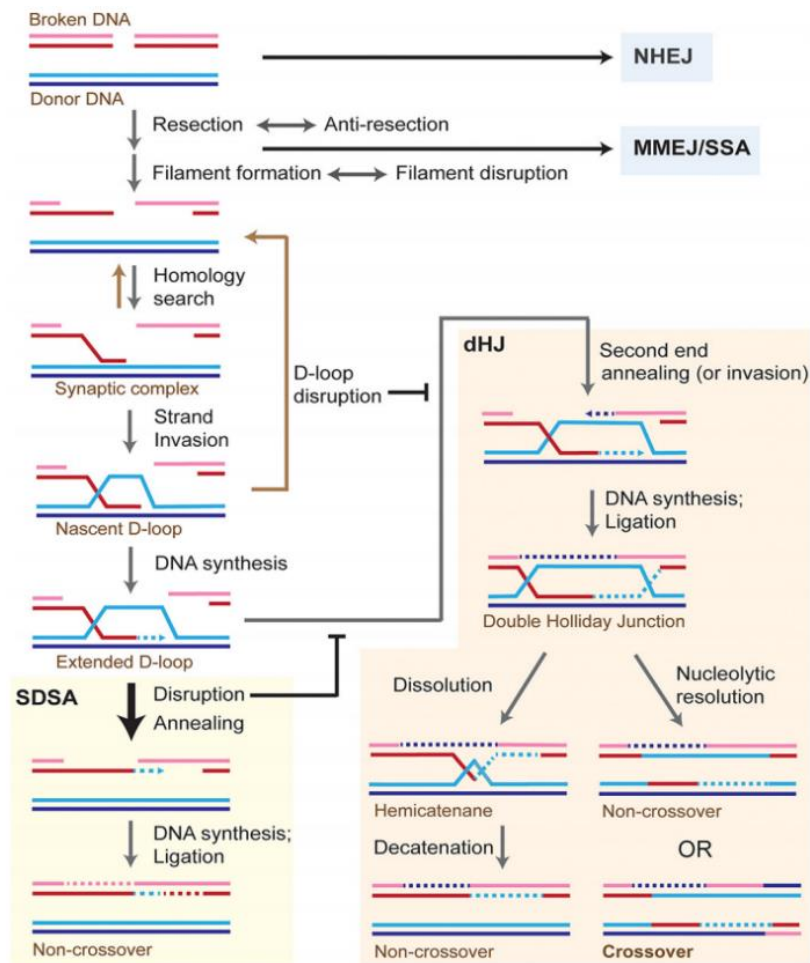


Figura 1. Modelo de reparación de roturas de doble cadena de ADN por recombinación homóloga en células somáticas (Wright et al., 2018)

La recombinación homóloga (también llamada recombinación general) sucede durante la profase I de la meiosis y tiene lugar entre largas regiones de ADN cuyas secuencias son homólogas, es decir altamente similares, aunque no idénticas. Estas nuevas combinaciones de ADN representan la variación genética en la descendencia, que a su vez permite que las poblaciones se adapten durante el curso de la evolución (Harvey et al., 2000).

La sustitución dirigida de genes en mamíferos ofrece la posibilidad de analizar la función de los genes en los procesos biológicos. Es por ello que en la década de los 80 se comenzó a investigar la inserción dirigida de ADN en células de ratón (**Figura 2**). Durante la sustitución dirigida de genes las células utilizaban la recombinación homóloga para sustituir una copia endógena por el ADN exógeno introducido. Esto pudo demostrarse utilizando un marcador seleccionable “positivo” (normalmente un gen de resistencia a neomicina que permite el crecimiento de las células que han

incorporado el marcador en presencia de este antibiótico) y un marcador “negativo” (generalmente era un gen de la quinasa de timidina del virus del herpes simple que permite eliminar las células que han incorporado el vector mediante inserción aleatoria, pero no cuando se produce la recombinación homóloga). Según esto, para seleccionar qué células contienen el gen insertado mediante recombinación homóloga, las células se cultivan en un medio con (G418 análogo de la neomicina) y ganciclovir (elimina las células que poseen el gen *tk* del virus). Las células que crecen en este medio serán aquellas en las que se han producido inserciones dirigidas y no aleatorias. Es por ello que no era necesario examinar directamente el ADN para identificar qué había ocurrido (Capecchi M. R., 1989).

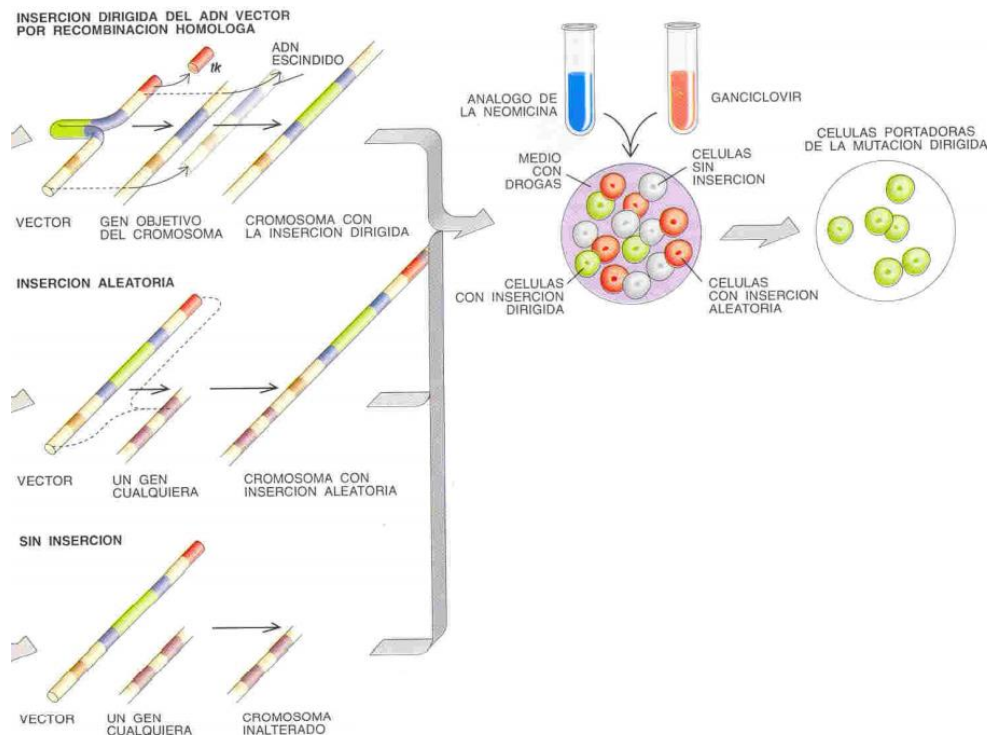


Figura 2. Inserción dirigida del ADN Vector por Recombinación homóloga (Capecchi M. R., 1994)

4.1.2 Nucleasas de dedos de zinc, ZFNs

La edición genómica mediante recombinación homóloga es poco eficiente en ratón y su aplicación a otros modelos animales no es sencilla.

Uno de los problemas principales con los cuales los investigadores se han tenido que enfrentar a lo largo de los años concierne a la “precisión” al realizar una

mutación, por la posibilidad de que los vectores se integren en porciones aleatorias del genoma, generando toxicidad (Klug, 2010).

A lo largo de los años 90 comenzó la introducción de una particular tipología de enzimas de restricción artificiales obtenidas de la fusión entre la nucleasa *FokI* y proteínas con dedos de zinc capaces de reconocer secuencias específicas en el ADN. Esto dio lugar a las, *zinc finger nucleases* (ZFNs) o nucleasas con dedo de zinc.

Las nucleasas con dedo de zinc son un sistema que, une la capacidad de cortar el ADN de la enzima nucleasa de una bacteria y la habilidad de los dedos de zinc de ligarse a la doble hélice (Kim et al., 1996).

Las nucleasas unidas a dedos de zinc reconocen tripletes específicos según los residuos de la α hélice que se hayan elegido. La arquitectura de ZFNs consiste en un dominio de unión de ADN con las proteínas de dedo de zinc (ZFP) junto a una endonucleasa de restricción *FokI* (**Figura 3**) Los dedos de zinc que permite el reconocimiento específico de ADN, dirigiendo la nucleasa *FokI* a secuencias específicas en las que producirá una rotura de doble hebra. El descubrimiento de esta técnica fue muy importante pues permitió que se pudieran manipular secuencias en cualquier especie (Urnov et al., 2010).

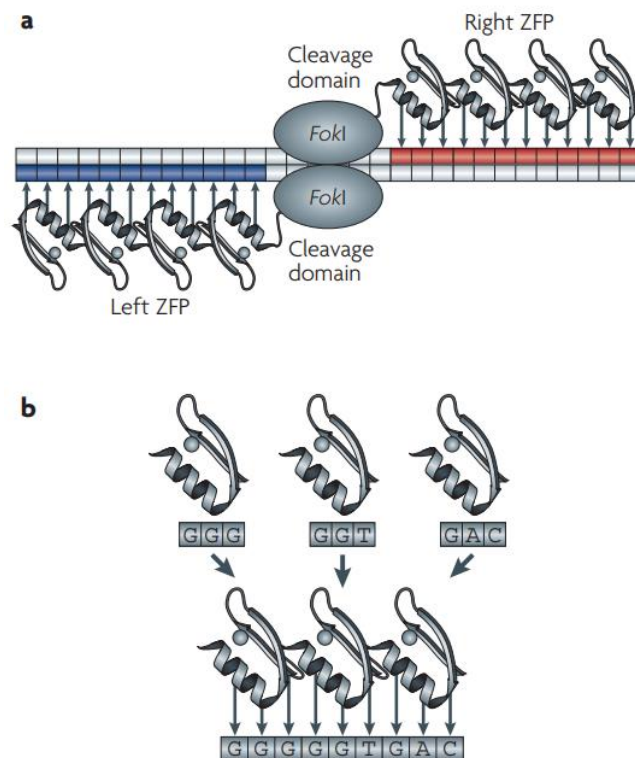


Figura 3. Estructura y diseño de las nucleasas de dedos de zinc. a. Dímero de ZFNs unido al ADN produciendo su rotura (Miller et al., 2007). b. Generación de las proteínas de dedos de zinc (ZFP) (Greisman & Pabo, 1997)

Hoy en día se pueden diseñar los dominios de dedos de zinc para dirigirlos a ciertas secuencias del ADN a voluntad, con lo cual las nucleasas de dedos de zinc buscarán secuencias únicas dentro de genomas complejos (Ramalingam *et al.*, 2011), por lo que para conseguir la manipulación genética necesitamos además de la rotura de la doble hebra por parte de las nucleasas de dedos de zinc, la introducción de una mutación y su posterior reparación mediante recombinación homóloga en presencia de un ADN exógeno o mediante recombinación no homóloga (NHEJ) (**Figura 4**) (King, 2016).

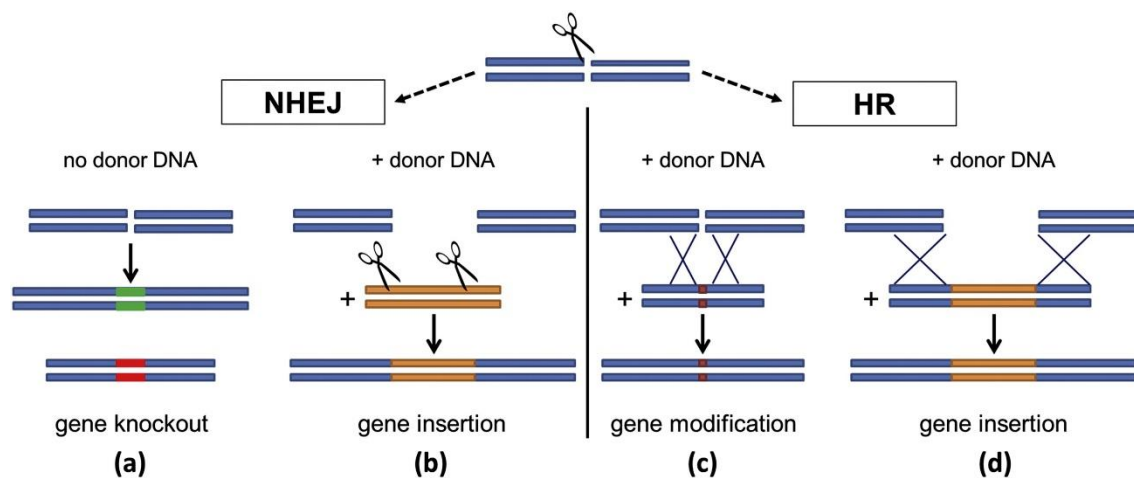


Figura 4. Edición genómica mediante nucleasas y reparación por recombinación homóloga y no homóloga (Bortesi & Fisher, 2015).

4.1.3 Nucleasas Efectoras Activadoras de la Transcripción, TALEN

Las Nucleasas Efectoras Activadoras de la Transcripción (TALEN) también se basan en el dominio catalítico de la endonucleasa *FokI* unido a un dominio específico de unión al ADN (**Figura 5**). El reconocimiento de la secuencia diana se basa en una sencilla relación existente entre los aminoácidos presentes en una región concreta (RVD del inglés, *repeat variable diresidue*) y la secuencia de ADN reconocida (Cermak *et al.*, 2011). El dominio nucleasa, derivado de *FokI*, funciona como un dímero, al igual que en las ZFNs, y son por tanto necesarios dos TALENs (que se sitúan sobre la diana en orientación inversa) para que se produzca el corte de doble cadena (DSB). Este diseño ha permitido generar multitud de TALENs que cortan en sitios específicos con una alta eficiencia y especificidad (Li *et al.*, 2015).

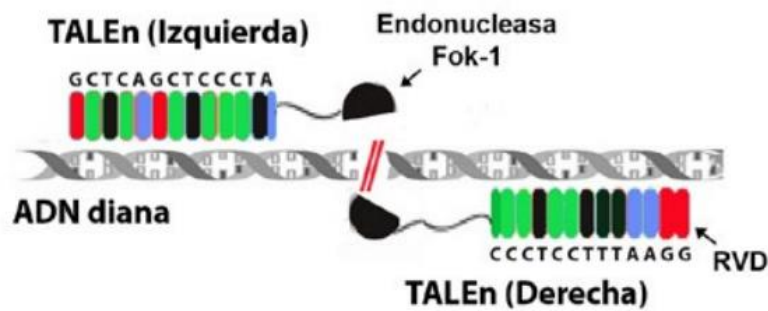


Figura 5. Sistema TALEN (Sociedad Andaluza de Enfermedades Autoinmunes, 2015)

La tecnología de nucleasas tipo activadores de transcripción son una poderosa herramienta para la ingeniería del genoma que puede usarse para escindir secuencias genómicas únicas de células vivas y organismos (Cota-Coronado *et al.*, 2020).

4.2 Origen del sistema CRISPR-Cas

4.2.1 Descubrimiento

Durante la década de los 80, un grupo de investigadores japoneses, fue primero en ver, lo que luego se conocería como CRISPR. Durante sus investigaciones sobre el gen que codificaba la isoenzima de la fosfatasa alcalina en *E. coli*, observaron en el extremo 3' de la hebra de ADN 5 secuencias de 29 nucleótidos muy parecidas entre sí, separadas por 32 nucleótidos (**Figura 6**) (Ishino *et al.*, 1987).

Gracias a los estudios de (Stern *et al.*, 1984) en *E. coli* y *Salmonella typhimurium* sobre las denominadas *REP sequences* (Secuencias palindrómicas extragénicas) los investigadores japoneses sospecharon que estas secuencias podrían tener una función muy importante en organismos procariotas.

```

TGA AAATGGGAGGGAGTCTACCGCAGAGCGGGGAACTCCAAGTGATATCCATCATCGCATCCAGTGCGCC (1,451)
(1,452) CGGTTTATCCCCGCTGATGCGGGGAACACCAGCGTCAGGCGTGAAATCTCACCCTCGTTGC (1,512)
(1,513) CGGTTTATCCCTGCTGGCGCGGGGAACTCTCGGTTCAAGCGTTGCAAACCTGGCTACCGGG (1,573)
(1,574) CGGTTTATCCCCGCTAACGCGGGGAACTCGTAGTCCATCATTCACCTATGTCTGAACTCC (1,634)
(1,635) CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACTCG (1,664)

consensus: CGGTTTATCCCCGCTGGAACGCGGGGAACTC

```

Figura 6. Secuencia repetitiva de nucleótidos en la región del gen de la isoenzima de la fosfatasa alcalina (Ishino *et al.*, 1987).

Otra gran pista vino de otros investigadores (Mojica *et al.*, 1993), que vieron estas secuencias repetidas en bacterias halófilas cuando estaban estudiando sus mecanismos para adaptarse a ambientes con un alto contenido en cloruro sódico. Posteriores estudios revelaron que eran repeticiones cortas, que estaban generalmente en grupos, los cuales están regulados por un espaciador único de que suele ser de longitud constante. A estas secuencias le dieron el nombre de SRSRs (repeticiones cortas regularmente espaciadas). Mediante análisis de secuencias en bases de datos consiguieron encontrar SRSRs en diferentes genomas microbianos. Por lo general vieron que estas secuencias se conservaban en los mismos grupos filogenéticos, en los que había un alto porcentaje de similitud entre los mismos dominios (**Figura 7**). Las SRSRs se encontraban entre espacios agrupados cuya longitud era siempre entre 20 y 58 pb (Mojica *et al.*, 2000).

Unos años más tarde, en 2002, se denominó a estas secuencias repetidas CRISPR, acrónimo de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* o como se traduciría en castellano en Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente interespaciadas (Jansen *et al.*, 2002).



Figura 7. Alineamiento de las SRSRs en diferentes especies. (Mojica *et al.*, 2000)

4.2.2 Identificación de los genes asociados a CRISPR, Cas.

En este mismo año, los mismos científicos que acuñaron el término CRISPR, vieron que había una cierta homología en los genes próximos al loci de CRISPR. A estos genes se les dio el nombre de *CRISPR-associated genes* o *Cas*. Estos genes, se han clasificado en cuatro tipos, *cas1* a *cas4*, y llevaban asociada una proteína Cas (*Cas1*, *Cas2*, *Cas3* y *Cas4*). Esta característica es exclusiva de procariotas, no habiéndose encontrado nada parecido en eucariotas (Jansen *et al.*, 2002).

La clasificación anterior de los genes Cas se ha ido complicando con el tiempo y con el estudio de distintas especies. En la **Tabla 1** se resumen la gran cantidad de tipos y subtipos de genes asociados a CRISPR identificados hasta la fecha (Haft *et al.*, 2005).

Category	Gene	Example Locus	Specific HMM	COG	Putative Function/Family	Notes
Core proteins	<i>cas1</i>	AF1878	TIGR00287	COG1518	Putative novel nuclease ^a	—
	<i>cas2</i>	AF1876	TIGR01573	COG1343, COG3512	—	—
		CT1918	TIGR01873	COG1343	—	Ecoli subtype-specific
	<i>cas3</i>	AF1874	TIGR01587	COG1203	Helicase (PF00271)	Core domain
		AF1875	TIGR01596	COG2254	Nuclease (PF01966)	HD domain
		YPO2467	TIGR02562	COG1203	Helicase (PF00271)	Ypest subtype-specific
	<i>cas4</i>	AF1877	TIGR00372	COG1468	RecB-family exonuclease ^{a,b}	—
	<i>cas5</i>	AF1872	TIGR02593	—	—	N-terminal domain
	<i>cas6</i>	AF1859	TIGR01877	COG1583	Possible RAMP ^a	When present, usually first
Ecoli subtype	<i>cse1</i>	CT1972	TIGR02547	—	—	—
	<i>cse2</i>	CT1973	TIGR02548	—	—	—
	<i>cse3</i>	CT1974	TIGR01907	—	—	—
	<i>cse4</i>	CT1975	TIGR01869	—	—	—
	<i>cas5e</i>	CT1976	TIGR01868	—	Cas5 N-terminal domain	—
Ypest subtype	<i>csy1</i>	YPO2465	TIGR02564	—	—	—
	<i>csy2</i>	YPO2464	TIGR02565	—	—	—
	<i>csy3</i>	YPO2463	TIGR02566	—	—	—
	<i>csy4</i>	YPO2462	TIGR02563	—	—	—
Nmeni subtype	<i>csn1</i>	SPs1176	TIGR01865	COG3513	HNH endonuclease?	—
	<i>csn2</i>	SPs1173	TIGR01866	—	—	Not always present
Dvulg subtype	<i>csd1</i>	CT1133	TIGR01863	—	—	—
	<i>csd2</i>	CT1132	TIGR02589	COG3649	—	—
	<i>cas5d</i>	CT1134	TIGR01876	—	Cas5 N-terminal domain	—
Tneap subtype	<i>cst1</i>	GTN1972	TIGR01908	—	Contains CXXC-CXXC motif	Occasionally absent
	<i>cst2</i>	GTN1971	TIGR02585	COG1857	Regulator (TIGR01875)	Related to Csa2
	<i>cas5t</i>	GTN1970	TIGR01895	COG1688	Cas5 N-terminal domain	—
Hmari subtype	<i>csb1</i>	TM1802	TIGR02591	—	Often contains CXXC-CXXC motif	—
	<i>csb2</i>	TM1801	TIGR02590	COG3649	Regulator (TIGR01875)	Related to Csd2
	<i>cas5h</i>	TM1800	TIGR02592	COG1688	Cas5 N-terminal domain	—
Apern subtype	<i>csa1</i>	AF1879	TIGR01896	COG4343	—	Usually proximal to repeat
	<i>csa2</i>	AF1871	TIGR02583	COG1857	Regulator (TIGR01875)	—
	<i>csa3</i>	AF1869	TIGR01884	COG0640	Helix-turn-helix, transcriptional regulator	Distantly related to PF01022
	<i>csa4</i>	MJ0385	TIGR01914	—	—	Occasionally absent
	<i>csa5</i>	AF1870	TIGR01878	—	—	Occasionally absent
	<i>cas5a</i>	AF1872	TIGR01874	COG1688	Cas5 N-terminal domain	—
Mtube subtype	<i>csm1</i>	TM1811	TIGR02578	COG1353	Putative novel polymerase ^a	Related to Cmr2
	<i>csm2</i>	TM1810	TIGR01870	COG1421	—	—
	<i>csm3</i>	TM1809	TIGR02582	COG1337	RAMP (PF03787)	Related to Cmr4
	<i>csm4</i>	TM1808	TIGR01903	COG1567	RAMP (PF03787)	—
	<i>csm5</i>	TM1807	TIGR01899	COG1332	RAMP (PF03787)	—
RAMP module	<i>cmr1</i>	TM1795	TIGR01894	COG1367	RAMP (PF03787)	—
	<i>cmr2</i>	TM1794	TIGR02577	COG1353	Putative novel polymerase ^a	Related to Csm1
	<i>cmr3</i>	TM1793	TIGR01888	COG1769	RAMP ^a	—
	<i>cmr4</i>	TM1792	TIGR02580	COG1336	RAMP (PF03787)	Related to Csm3
	<i>cmr5</i>	TM1791.1	TIGR01881	COG3337	—	—
	<i>cmr6</i>	TM1791	TIGR01898	COG1604	RAMP (PF03787)	—

Tabla 1. Descripción de los tipos y subtipos de Cas (Haft *et al.*, 2005).

4.2.3 Función Biológica

Llegados a este punto la cuestión es clara, ¿Cuál es el significado biológico de todo esto?, ¿Cuál el significado de la proximidad entre CRISPR y cas?

Tras secuenciar una gran cantidad de proteínas cas y ver su estructura, en 2006 se llegó a la hipótesis de que el sistema CRISPR-Cas es un mecanismo de defensa ante la invasión de fagos y plásmidos en bacterias. Un mecanismo similar al sistema de ARN de interferencia (ARNi), con funciones análogas como son la de helicasa-nucleasa de la doble hebra de ARN específica, endonucleasa del ARN mensajero y polimerasa de ARN dependiente de ARN (Makarova *et al.*, 2006). Esto fue confirmado un año más tarde realizando experimentos con fagos en los que se vio que el sistema CRISPR/Cas proporcionaba inmunidad frente a ellos (R. Barrangou *et al.*, 2007).

5. SISTEMA CRISPR-CAS

5.1 Estructura

Se compone de dos elementos: un ARN proveniente de la secuencia CRISPR, llamado «ARNcr», y la endonucleasa Cas. La secuencia CRISPR se compone de un líder o promotor y distintas secuencias espaciadoras (de 25 a 50 nucleótidos) flanqueadas por elementos repetidos, usualmente palindrómicos (de aproximadamente 32 nucleótidos) (**Figura 8**). El ARNcr es el encargado de dirigir a Cas hacia su secuencia complementaria, donde Cas realiza el corte de la secuencia patógena.

Por otro lado, tenemos una secuencia conocida como motivo adyacente al protoespaciador (PAM) que incorpora los nucleótidos adyacentes al PAM como elemento espaciador junto al promotor en CRISPR (**Figura 9**) generando así una memoria inmunológica (Jansen *et al.*, 2002).

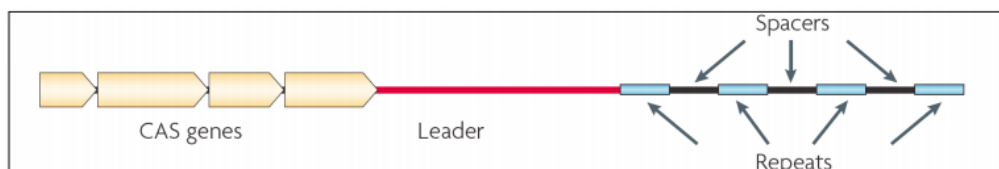


Figura 8. Estructura del Sistema CRISPR-Cas (Rodríguez *et al.*, 2018)

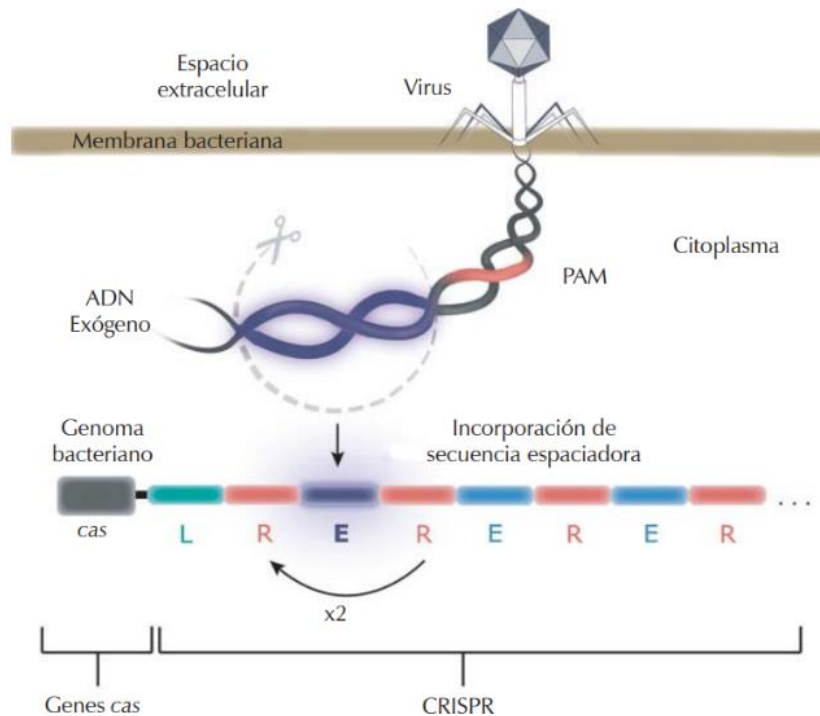


Figura 9. Incorporación de secuencia espaciadora al genoma bacteriano (Lammoglia-Cobo et al., 2016)

5.2 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción por el que el sistema CRISPR/Cas confiere inmunidad adaptativa a los procariotas puede explicarse según tres etapas: adaptación, expresión e interferencia (**Figura 10**).

1. **Adaptación:** Este proceso sucede cuando un virus o un plásmido ataca al procariota por primera vez. La proteína Cas transfiere un fragmento PAM a un extremo de la secuencia CRISPR, generando así un nuevo espaciador (Mojica & Almendros, 2017).
2. **Expresión:** En este proceso se produce la transcripción de la secuencia de CRISPR dando lugar a un ARN precursor (pre-crARN), constituido por la secuencia de un solo espaciador y fragmentos de las repeticiones de CRISPR. Éstos se unen a proteínas Cas para formar los complejos efectores (Oost et al., 2014)
3. **Interferencia:** Se produce tras otra toma de contacto con un virus o plásmido que ya había generado su espaciador. Es por ello que se genera un complejo efector el cual actúa en la secuencia diana frenando la proliferación del virus (Mojica & Almendros, 2017).

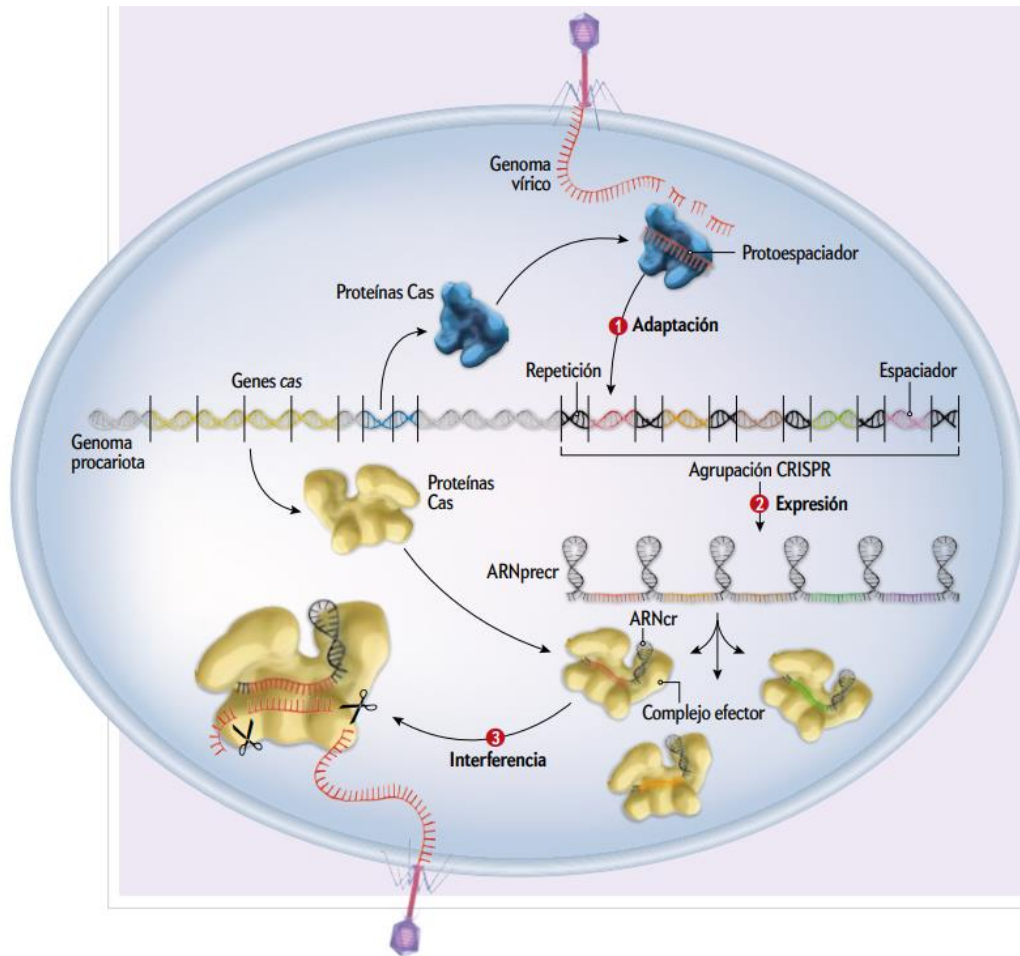


Figura 10. Mecanismo de acción de CRISPR-Cas (Mojica & Almendros, 2017).

5.3 Tipos

Como ya se dijo anteriormente en los antecedentes, nos encontramos una gran cantidad de tipos y subtipos de proteínas Cas. Es por ello que existe una clasificación del sistema CRISPR-Cas bastante compleja, que contiene 2 clases, 6 tipos y hasta 19 subtipos (**Figura 11**). Su distribución es bastante heterogénea en procariontes (**Figura 12**) (Makarova *et al.*, 2018).

La **Clase 1** (Tipos I, III y IV) utiliza un complejo de múltiples proteínas Cas para degradar los ácidos nucleicos extraños. Por otro lado, la **Clase 2** (Tipos II y V) posee una sola proteína Cas de mayor tamaño para desempeñar la misma función que los complejos múltiples de proteínas de la clase 1 (Fagen *et al.*, 2017).

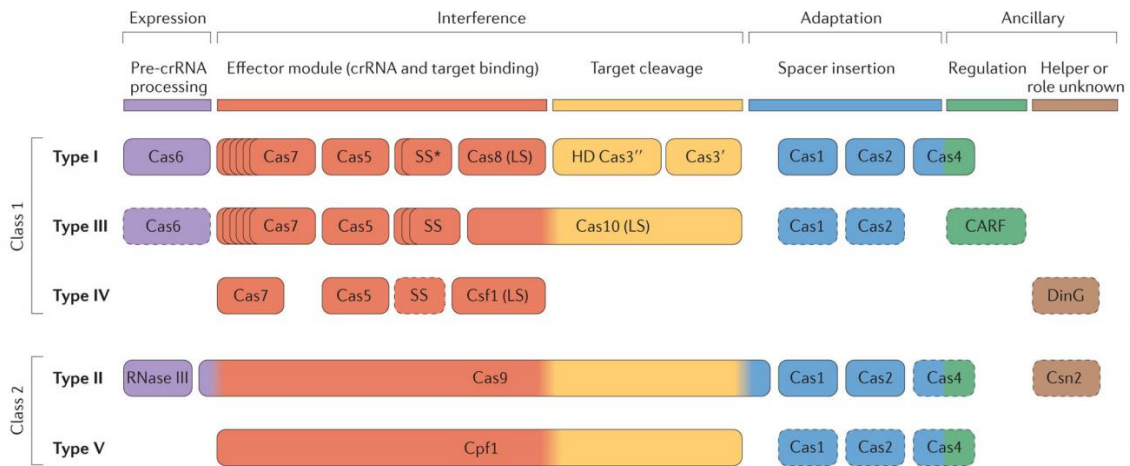


Figura 11. Clasificación funcional de los sistemas CRISPR-Cas (Makarova et al., 2015).

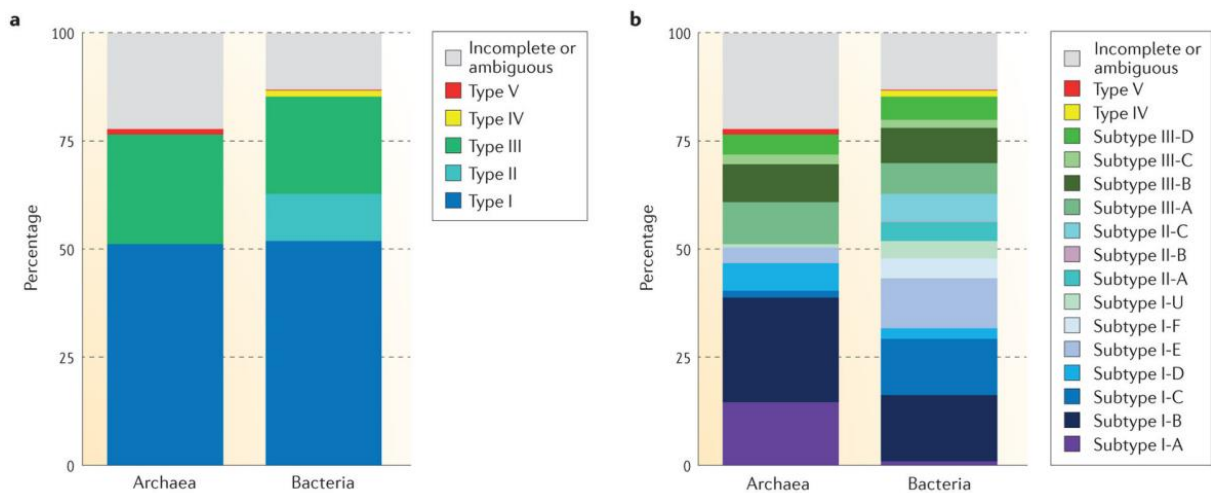


Figura 12. Distribución de los distintos tipos de CRISPR-Cas en los genomas de bacterias y arqueas (Makarova et al., 2015).

Tipo I. La proteína enzimática que se asocia para transferir la secuencia PAM y formar complejos efectores junto al ARN precursor es **Cas3**. Es el tipo más abundante (**Figura 11, a**). La nucleasa Cas3 no solo corta el ADN, sino que además tiene función exonucleasa 3'-5', por lo que tiene la capacidad de destruir grandes segmentos de ADN (Westra et al., 2016).

Tipo II. Este tipo utiliza **Cas9** como proteína efectora del corte del ADN, es el mejor estudiado y el más utilizado en edición genómica (Bikard et al., 2014).

Tipo III. Utiliza **Cas10** como nucleasa. Se asemeja al tipo I cuando se forma el complejo multiproteico. Su peculiaridad radica en que es capaz de actuar también sobre el ARN (Leon et al., 2017).

Tipo IV. Aún no ha sido caracterizado experimentalmente, pero se sabe que utiliza numerosos complejos proteicos para su funcionamiento (Leon *et al.*, 2017).

Tipo V. Utiliza solo la proteína **Cpf1** que rompe la doble hebra de ADN dejando extremos cohesivos, por lo que está adquiriendo una gran importancia en la introducción de segmentos de ADN en eucariotas (Leon *et al.*, 2017).

5.4 CRISPR/Cas9

En este apartado hablaremos concretamente sobre el Sistema CRISPR-Cas9 perteneciente a la clase 2, tipo II, que utiliza como componente principal la proteína **Cas9**. Debido a su fácil accesibilidad, técnica y su bajo coste económico, ha dado lugar a una revolución casi sin precedentes en la edición genómica.

Como se ha explicado anteriormente el mecanismo de acción de CRISPR-Cas en bacterias genera una especie de “catálogo” de ADNs virales tras sus primeros encuentros, generando así unas secuencias almacenadas, denominadas ARN guías, que reconocen al ADN invasor. Es en este punto donde actúa la proteína Cas9, cortándolas y eliminándolas. Se trata pues de un sistema inmune adaptativo (Giono, 2017).

El estudio detallado de este mecanismo permitió plantear la posibilidad de utilizarlo en otros sistemas celulares para guiar a la nucleasa Cas9 en forma específica hacia otras secuencias (Lander, 2016). Dado que la secuencia diana cortada por Cas9 está determinada por la secuencia del ARN guía, basta con sintetizar una nueva molécula de ARN guía para redireccionar a la nucleasa Cas9 hacia cualquier secuencia (**Figura 13**). Esto convierte al sistema CRISPR-Cas9 en una técnica de edición genómica extremadamente simple y accesible para toda la comunidad científica (Doudna & Charpentier, 2014).

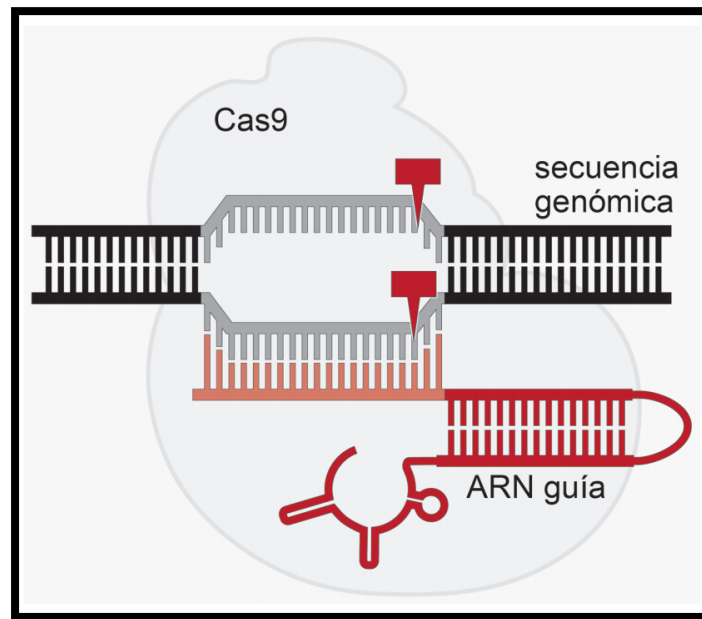


Figura 13. Sistema CRISPR/Cas9 adaptado para su utilización en eucariotas (Giono, 2017).

Además, existen variantes del sistema **CRISPR-Cas9** que permiten regular la expresión de un gen, bien sea inhibiéndola (CRISPRi) o aumentándola (CRISPRa) (**Tabla 2.** Comparación entre técnicas derivadas de CRISPR (Fellmann et al., 2016)). Esta versatilidad hace que haya sido adaptado en una gran cantidad de aplicaciones biotecnológicas, como por ejemplo la generación de fármacos, generación y optimización de factores celulares, identificación de genes esenciales en patógenos, etc (Fellmann et al., 2016).

Característica	CRISPRn	CRISPRi	CRISPRa
Efecto	Knockout	Knockdown	Activación
Mecanismo	Deleción o inserción causante de mutación	Interferencia transcripcional	Activación transcripcional
Diana	Cualquier región del genoma con PAM	Sitios de iniciación de la transcripción con PAM	Sitios de iniciación de la transcripción con PAM

Tabla 2. Comparación entre técnicas derivadas de CRISPR (Fellmann et al., 2016).

6. APLICACIONES

El sistema CRISPR-Cas, por lo simple de su metodología y su reducido coste, atrajo la atención de forma inmediata. A partir del 2011, empezaron a proponerse diferentes soluciones basadas en este sistema, aplicaciones relacionadas principalmente con la manipulación genómica, que posteriormente se ampliaron al diagnóstico y la investigación a medida que se profundiza en el conocimiento de los componentes de este sistema. Se ha utilizado para modificar los genomas de muchas especies de plantas y animales, así como de células humanas *in vitro*. De hecho, el sistema CRISPR-Cas puede ser una alternativa viable para las terapias génicas.

6.1 Terapia génica:

Una de las aplicaciones más importantes del sistema CRISPR-Cas está en el campo de la tecnología terapéutica para tratar trastornos genéticos. Hace unos años en Estados Unidos se aprobó la utilización de CRISPR en humanos que padezcan tipos de cáncer que necesiten linfocitos T (Reardon S. , 2016). Cas9 podría ser utilizado además en células somáticas, para la ingeniería de células terapéuticas. Las células T del receptor de antígeno quimérico (CAR) pueden modificarse *ex vivo* e introducirse en un paciente para dirigirlos específicamente a determinados cánceres (Hsu *et al.*, 2014). En la actualidad ya se ha aplicado como terapia génica en varias enfermedades en modelos animales con resultados prometedores (**Tabla 3**).

Por otro lado, el tratamiento de embriones mediante el sistema CRISPR-Cas proporciona datos prometedores. Un trabajo realizado por un grupo de investigadores especializados en biología reproductiva eligió una mutación en el gen *MYBPC3* que causa una miocardiopatía hipertrófica, una enfermedad hereditaria autosómica recesiva que afecta a 1 de cada 500 personas aproximadamente. Para ello tomaron el espermatozoides de un hombre portador de la mutación (heterocigoto) y los oocitos de una mujer enferma (homocigótica recesiva), lo cual daría una descendencia de un 50% de embriones sanos heterocigóticos y otro 50% de embriones enfermos. La estrategia consistió, en inyectar primero el sistema CRISPR/Cas9 junto con el espermatozoides a los oocitos en metafase II mediante inyección intracitoplasmática y, segundo, en inyectar directamente la molécula ADN guía junto a la proteína Cas9 recombinante para que, de este modo, estuviera actuando durante un tiempo limitado (hasta que se degradase). Los resultados fueron bastante favorables ya que se obtuvieron un 72%

de los embriones correctamente editados y por ende un aumento del 22% de embriones normales. Por otro lado, no se detectó ningún corte inespecífico no deseado por parte de la nucleasa Cas9 (Ma *et al.*, 2017).

Disease	Mutation target	Delivery method	Target cells	Correction efficiency	References
β-Thalassaemia	Deletion in <i>HBB</i>	Electroporation	Human iPSCs	17.6%	Xie <i>et al.</i> (2014b)
		Intracytoplasmic injection	Human tripronuclear zygotes	14.3%	Liang <i>et al.</i> (2015)
Cystic fibrosis	Deletion in <i>CFTR</i>	Lipofection	Human intestinal organoids	Unknown-edited cells were selected	Schwank <i>et al.</i> (2013)
Hereditary tyrosinemia	Point mutation in <i>FAH</i>	Hydrodynamic injection	<i>in vivo</i> mice hepatocytes	0.40 ± 0.12%	Yin <i>et al.</i> (2014)
HIV-1	CCR5Δ32	Electroporation	Human iPSCs	100%	Zhu <i>et al.</i> (2015)
	Inactivation of proviral DNA	Nucleofection	JLat10.6 cells	30%	Ye <i>et al.</i> (2014)
Duchenne muscular dystrophy	Exon deletion in dystrophin gene	Electroporation	Human iPSCs	50%	Li <i>et al.</i> (2015)
α1-Antitrypsin deficiency	Point mutation in <i>SERPINA1</i>	Electroporation	Human iPSCs	18.8%	Smith <i>et al.</i> (2014a)
Polycythaemia vera	Point mutation in <i>JAK2</i>	Electroporation	Human iPSCs	9.15%	Smith <i>et al.</i> (2014a)
Cataracts	Deletion in <i>Crygc</i>	Electroporation	Mouse spermatogonial stem cells	29.7%	Wu <i>et al.</i> (2014)
Epstein-Barr virus	Inactivation of viral promoter	Electroporation	Human epithelial cell lines	94.2%	Yuen <i>et al.</i> (2015)
LDL-C	Disruption of <i>Pcsk9</i>	Adenovirus	<i>in vivo</i> mice hepatocytes	50%	Ran <i>et al.</i> (2015)
		Adeno-associated virus		40%	Ding <i>et al.</i> (2014)

Tabla 3. Enfermedades que han podido ser corregidas con CRISPR-Cas9 (Lockyer, 2016).

6.2 SARS-CoV-2

La tecnología CRISPR-Cas forma una parte integral de las aplicaciones en el diagnóstico clínico por medio de la biotecnología. Es por ello que ha contribuido en el diagnóstico de la COVID-19 en enfermos y en portadores asintomáticos. En general todas las variantes de diagnóstico de CRISPR-Cas son métodos rápidos de detección cuyos resultados se revelan en tubos y tiras de papel por medio del uso de fluoróforos que pueden ser observados a simple vista y cuantificados por un fluorímetro (**Figura 14**). Es por ello que tienen una alta sensibilidad ya que detectan los componentes moleculares del SARS-CoV-2 con una baja cantidad de copias amplificadas (Escobar-

Muciño *et al.*, 2020). Estas metodologías de CRISPR han sido comparadas y validadas con los métodos de detección PCR, RT-PCR y RT-Lamp (**Tabla 4**) en pacientes asintomáticos, enfermos y re-infectados por el virus para así ver la utilidad de las pruebas en el diagnóstico de la enfermedad (Long *et al.*, 2020).

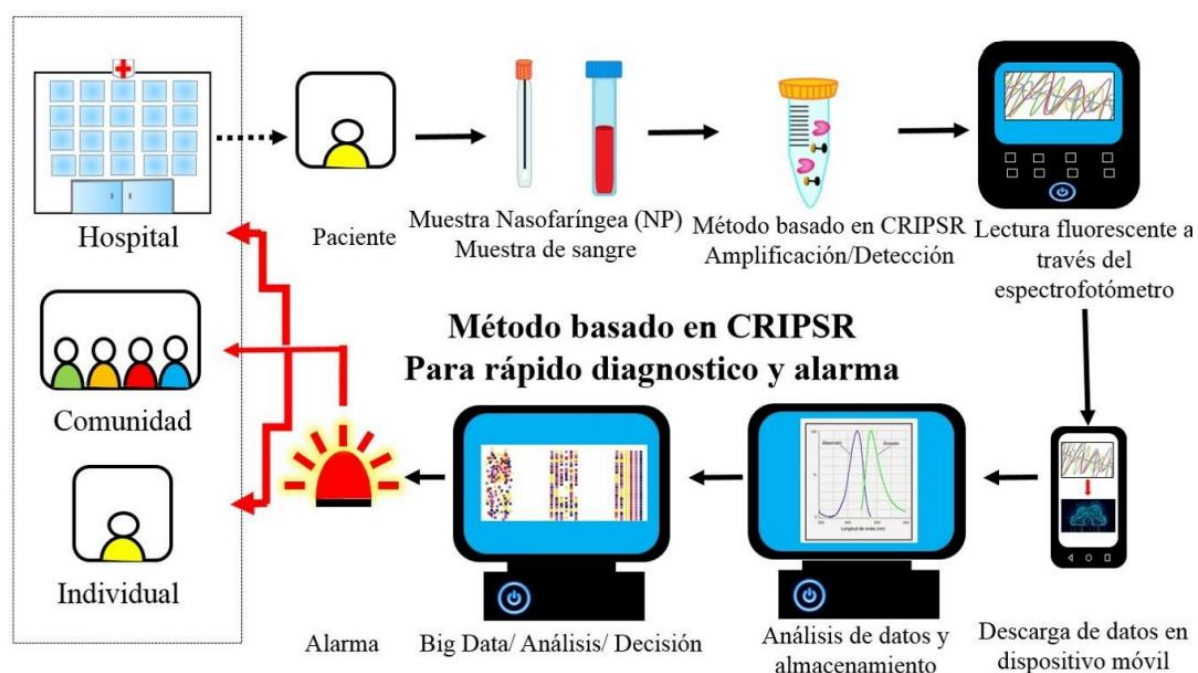


Figura 14. Esquema genérico de diagnóstico y alarma basado en CRISPR-Cas (Choi, 2020)

Método de detección	Función/ Característica del método	Amplificación (sí/no)	Método de detección o (fluorescencia/color etc.)	Rango de pacientes en los que se ha evaluado la metodología	Número de copias obtenidas	Costoso	Portable
PCR/RT-qPCR	Reconocimiento de fragmento de secuencia específica de los cebadores para N, E y RdRP	Si	Gel-UV/ELISA/Tiempo Real [86-89]	55326507	10^2 - 10^5	Si	No [94, 95]
RT-LAMP	Múltiples cebadores (4 o 6) que reconocen 6 regiones del ADN blanco	Si	Gel/Turbidímetro/Tiempo Real/ Colorimétrica [90, 91]	955	10^9 - 10^{10}	No	Si [91, 96]
Cas3	Reconocimiento del PAM como 5'-AAG	Si	Colorimétrica/Fluorescencia/Tiras reactivas [69, 92]	31	10^2	No	No hay datos mostrados [69, 92]
Cas9	Reconocimiento del PAM 5'NGG, y 5'TGGTG ó 5'NAG	Si	Colorimétrica/Fluorescencia [46-48]	No hay datos mostrados	No hay datos mostrados	No	No hay datos mostrados [46-48]
Cas12	Reconocimiento del PAM corto dependiente de T, como: 5'-YTN-3', 5'-TTN-3' o 5'-TTTN-3	Si	Gel-UV/Fluorescencia [30, 93]	73	500- 15000/uL	No	No hay datos mostrados [77, 93]
AIOD-CRISPR*	Utiliza 2 rARN, una sola temperatura y no se transfiere a tubo	Si	LED/ UV [78]	8	No hay datos mostrados	No	SI [78, 102]
Cas13	Corte lateral no específico	Si	RT-qPCR/Fluorescencia [30, 82]	581	10^6	No	No hay datos mostrados [82, 97, 98]
Cas14	Solo se une a ssADN	Si	Fluorescencia/colorimétrica [62, 63]	No hay datos mostrados	No hay datos mostrados	No	Si [30, 62, 63]

Tabla 4. Principales métodos de detección del SARS-CoV-2 (Escobar-Muciño *et al.*, 2020)

El problema principal del empleo de la RT-qPCR en tiempo real para el diagnóstico es que se requiere un equipamiento específico para realizarla y personal cualificado para su ejecución, por lo que es necesario que la muestra sea transportada a laboratorios acreditados con estas capacidades para realizar el diagnóstico. Esto puede suponer un retraso de 1-2 días en la emisión del informe con los resultados al hospital donde se encuentra el paciente afectado (Montoliu *et al.*, 2020). La diferencia esencial del diagnóstico mediante CRISPR-Cas con la RT-qPCR es que toda la reacción ocurre en un mismo tubo, y la respuesta se obtiene a los 40 minutos (si la lectura es por fluorescencia) o en unos 70 minutos (si la lectura es a través de una tira reactiva) (**Tabla 5**). La sensibilidad es de aproximadamente hasta 10 copias del genoma del coronavirus por microlitro de muestra de saliva o nasofaríngea (Joung *et al.*, 2020).

Es por ello que los métodos de detección “clásicos” del SARS-CoV-2 (por RT-qPCR o RT-LAMP) frente a CRISPR-Cas han demostrado ser más lentos y costosos. CRISPR-Cas puede suponer para el diagnóstico de la COVID-19 un punto de inflexión para controlar la epidemia, ya que es vital para contribuir a disminuir el tiempo de estancia en hospitales (**Figura 15**) (Escobar-Muciño *et al.*, 2020).

	RT-qPCR	CRISPR
Sensibilidad	1 copia/ μ l	10 copias/ μ l
Método cuantitativo	Sí	No
Fiabilidad	Gold standard (OMS)	validación con pocos pacientes
Tiempo de la técnica	4 h	< 1h
Tiempo de diagnóstico*	1-2 días	potencialmente 1h
Laboratorios especializados	Sí	No
Personal cualificación especial	Sí	No
Autorización FDA/EMA**	Sí	Sí (SHERLOCK)
Coste por reacción	10-15 euros [21-22]	<2 euros (DETECTR) [18]
Alternativas in-house	Sí	Sí

Tabla 5. Ventajas que supone CRIPR-Cas frente al método RT-qPCR (Montoliu *et al.*, 2020)

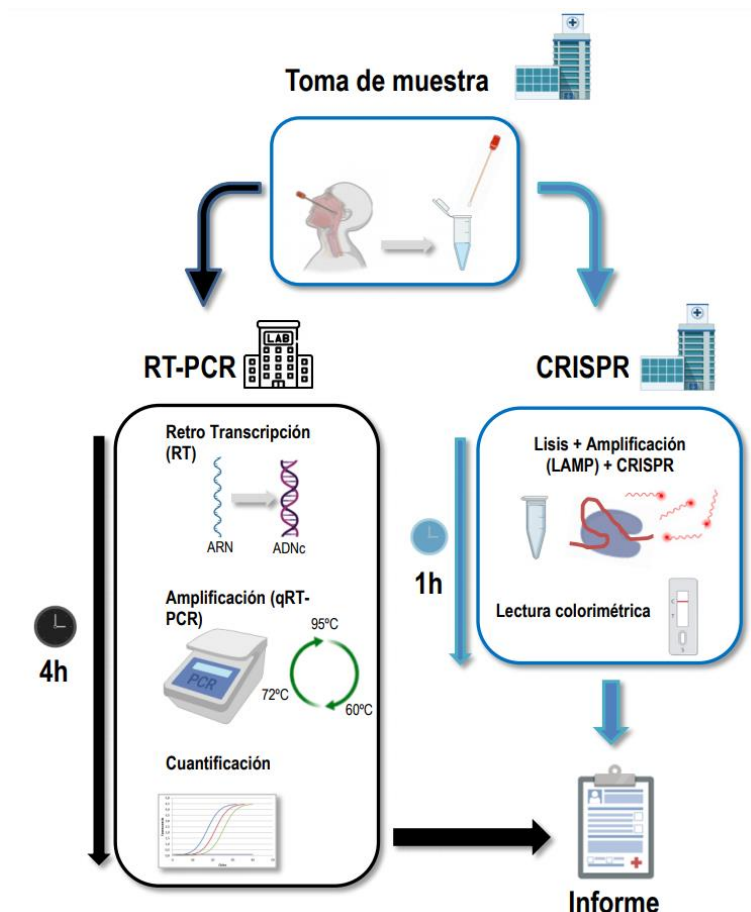


Figura 15. Tiempo de diagnóstico de muestra nasofaríngea o salival de RT-qPCR frente a CRISPR (Montoliu et al., 2020)

6.3 CRISPR como solución a las resistencias antibióticas.

En los últimos años, la resistencia a antibióticos está uno de los mayores problemas en salud pública. Sólo en España, el número de muertes que causan cada año las denominadas bacterias multirresistentes asciende aproximadamente a 35.000 personas. Por otro lado, en España la inversión de fondos para la investigación de este problema es prácticamente nula (Vilaseró, 2018). Es por eso que CRISPR puede jugar un papel clave en la solución del problema debido a su fácil uso y su bajo costo.

Diversos estudios han desarrollado bacteriófagos modificados por CRISPR cuya misión es eliminar bacterias resistentes o revertir el proceso de resistencia. Teniendo esto en cuenta, existen dos métodos posibles para solucionar el problema (Figura 16).

- **Método 1:** Elaboración de un bacteriófago específico para la bacteria patógena en cuestión introduciendo los componentes del sistema CRISPR en su

genoma. Cuando el fago infecta a la bacteria diana CRISPR-Cas reconoce el ADN diana “programado” perteneciente al cromosoma de la bacteria patógena, atacándola y produciendo con ello su muerte. La digestión del ADN de la bacteria por la endonucleasa Cas normalmente no puede ser reparada y resulta letal, lo cual posibilita el uso de CRISPR como agente **antibacteriano programable** gracias a la modificación del ARN guía (Selle *et al.*, 2015).

- **Método 2:** Creación de un vector (fagémido) específico para la bacteria en cuestión. En este caso el ADN diana será el gen de resistencia al antibiótico codificado en un plásmido. Este plásmido será atacado y destruido, provocando la “re-sensibilización” al antibiótico. Para este método se utiliza lo que se conoce como un **fagémido** que se define como un tipo de plásmido con algunos elementos genéticos del fago (origen de replicación), pero cuyo material genético no codifica ningún componente adicional del fago. Han tenido mucho éxito para lograr la “re-sensibilización” de bacterias patógenas como *Escherichia coli* y *Staphylococcus* (Gearing, 2017).

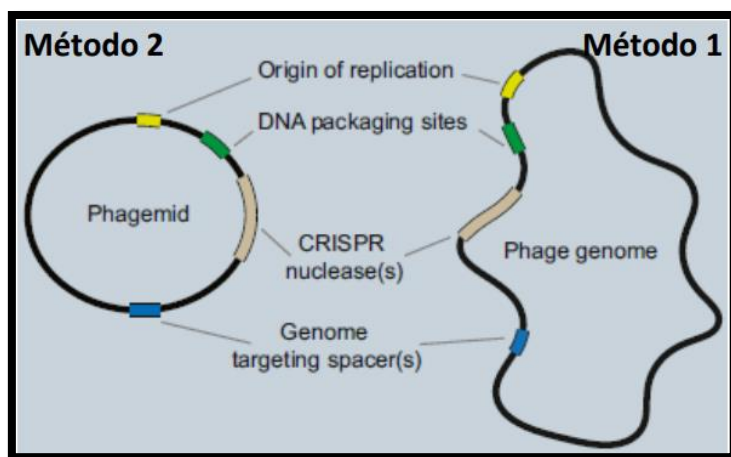


Figura 16. Representación de CRISPR en el genoma del fago (Método 1) y en el fagémido (Método 2) (Fagen *et al.*, 2017).

6.4 Biotecnología vegetal

La pared celular de las células vegetales, constituye una de las grandes diferencias entre éstas y las células animales. Es por ello que supone un obstáculo físico entre la secuencia diana y los componentes del sistema CRISPR, la proteína Cas y el ARN guía. Aun así, la manipulación genómica se ha logrado en diferentes

especies de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Esto ha logrado ventajas fundamentales como es la incorporación de un número bajo de copias del gen de interés a bajo costo. Por otro lado, existen también otros métodos en el caso de no ser posible el uso de *A. tumefaciens* como es el empleo de la microinyección, el bombardeo de partículas y la transformación de protoplastos mediante polietilenglicol (PEG) (Hernández, 2018).

Una de las aplicaciones más llamativas en este sentido es la mejora frente al estrés biótico y abiótico, es por ello que el número de plantas resistentes obtenidas con la tecnología CRISPR/Cas aumenta cada año (**Tabla 6**). Por ejemplo, utilizaron el ARN guía del gen *OsERF922* que es un regulador negativo de *Oryza sativa* frente al hongo *Magnaporthe oryzae* para obtener mutantes con cambios en el marco de lectura de este gen, lo cual supuso un aumento notorio de la resistencia a *M. oryzae* (Wang et al., 2016).

Cultivo/ Microorganismo	Gen modificado/ Tipo de modificación	Versión de Cas9	Promotores Cas9/ sgARN	Método de entrega/ frecuencia de mutación	Referencias
<i>Oryza sativa</i> / <i>Xanthomonas oryzae</i>	<i>OsSWEET11</i> <i>OsSWEET14</i> / I, D	SpCas9 y SpCas9 con CO para arroz	CaMV35S/ AtU6	Transf. de protoplastos con PEG/ ND	Jiang et al., 2013
<i>Oryza sativa</i> / <i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>OsERF922</i> / I,D	SpCas9 CO para plantas	Ubiquitina 1 de maíz/ U6 de arroz	Transf. de callos embriog. con <i>At</i> /42.0%	Wang et al., 2016
<i>Nicotiana benthamiana</i> / BeYDV	<i>BeYDV</i> /I,D	SpCas9 CO para plantas	35SPPDK/ AtU6	Coinfiltación de hojas con <i>At</i> /0.03-70.01%	Baltes et al., 2015
<i>Nicotiana benthamiana</i> / TYLCV, BCTV	<i>TYLCV-IR</i> regiones intergénicas, regiones RCA/ I, D	SpCas9 CO para plantas	CaMV35S/ promotor del PEBV	Transfección con virus de sgRNA en plantas que sobrexpresan Cas9/42%	Ali et al., 2015
<i>Cucumis sativus</i> L./ CVYV, ZYMV, PRSV	<i>elF4E</i> / D en Exon1	SpCas9 CO para plantas	CaMV35S/ AtU6	Transf. de cotiledones sin embrión con <i>At</i> / ND	Chandrasekaran et al., 2016
<i>Triticum aestivum</i> / <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	<i>TaMLO-A1</i> <i>TaMLO-B1</i> <i>TaMLO-D1</i> / D en Exon2	Cas9 CO para arroz	Ubiquitina 1 de maíz/ promotor U6 de trigo	Bombardeo de partículas/ 5.6%	Wang et al., 2014
<i>Citrus sinensis</i> / <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	<i>CsLOB1</i> / D, S	Cas9 CO para plantas	35SPPDK/ AtU6-1	Transf. de epicotilos con <i>At</i> / 11.5%– 64.7%	Peng et al., 2017
<i>Solanum lycopersicum</i> / <i>Oidium neolyopersici</i>	<i>SIMlo1</i> /D en ORF	Cas9 CO para humanos	CaMV35S/ AtU6	Transf. de segmentos cotiledonares con <i>At</i> / ND	Nekrasov et al., 2017
<i>S. lycopersicum</i> / <i>Xanthomonas gardneri</i> Xg153, <i>X. perforans</i> Xp4b, <i>Pseudomonas syringae</i> DC3000, <i>Phytophthora capsici</i> LT1534	<i>SIDMR6</i> / D	ND	2 x CaMV35S/ AtU6-26	Transf. de segmentos cotiledonares con <i>At</i> / ND	de Toledo et al., 2016

Tabla 6. Cultivos mejorados mediante CRISPR/Cas para resistencia a microorganismos patógenos (Hernández, 2018).

6.5 Inconvenientes del sistema CRISPR-Cas9: efectos inespecíficos (“Off target”)

Si bien es cierto que CRISPR-Cas9 es una herramienta increíble para la edición de genomas debido a su fácil manejo y bajo coste, esta técnica también plantea inconvenientes. El problema que más preocupa es lo que se conoce la generación de modificaciones “off target” u obtención de modificaciones en sitios inespecíficos que no formaban parte del locus diana. Los efectos inespecíficos se producen debido a que en el organismo de origen del sistema (bacterias) y por su función de defensa contra elementos nucleotídicos externos, puede ser útil el reconocimiento y destrucción de ADN viral o plasmídico hipervariable. Y, aunque esta relativa flexibilidad en el reconocimiento de secuencias variables pueda ser útil para el organismo, cuando se saca de su contexto original y se dedica a la modificación genómica, genera mutaciones indeseadas más allá de la región diana, lo cual se traduce en efectos colaterales indeseados (Ma et al., 2014).

Los efectos “off target” varían mucho dependiendo de dónde se encuentre el error en el apareamiento y el número de ellos. Múltiples estudios apuntan a que, si el fallo está fuera del extremo 5' de la diana o se encuentran en una cantidad de hasta cinco nucleótidos, se pueden dar eventos de mutaciones “off target”, que pueden llegar a tasas iguales a las de modificaciones en la diana correcta (Fu et al., 2013). Por otro lado, también hay que tener en cuenta el tipo celular al que pertenezcan ya que se ha demostrado que dependen de la estructura de cromatina y de la epigenómica que posean (Ma et al., 2014).

El problema de los efectos *off-target* se ha abordado a través de múltiples estrategias con una finalidad común: incidir en el diseño del ARN guía para evitar que éste pudiera coincidir con más de una secuencia, ya sea codificante o no codificante.

7. IMPLICACIONES ÉTICAS

La adaptación del sistema CRISPR como herramienta de edición genómica supuso una gran revolución en muchos campos de aplicación. Es por ello que algunas de estas aplicaciones como ensayos clínicos, terapia génica de la línea germinal en embriones o de la línea somática en humanos, suscitan cuestiones éticas que deben ser abordadas de manera objetiva (Gómez-Tatay & Aznar, 2019).

La edición genética de la línea germinal es una de las aplicaciones clínicas con mayor controversia, ya que la modificación del genoma de gametos y embriones

suponen un riesgo impredecible ya que pueden generar cambios transmitibles de generación en generación. CRISPR también permite mejorar nuestras capacidades como ser humano (a esto se le llama transhumanismo o posthumanismo). Por otro lado, también es posible gracias a CRISPR la edición de rasgos del futuro bebé (niños de diseño). Es por ello que, la comunidad científica desde un primer momento estuvo totalmente de acuerdo con la prohibición de la modificación genética de la línea germinal con fines reproductivos (Baltimore *et al.*, 2015).

Diversos informes recientes, como el que expuso la Sociedad Americana de Genética Humana (ASHG) reflejan una clara tendencia de los científicos a rechazar este tipo de experimentos ya que a día de hoy las cuestiones éticas, científicas y políticas no resueltas hacen inapropiada la edición genética en embriones para su posterior implantación, dejando solo abierta la posibilidad de la investigación de embriones y gametos para su posible uso futuro de la terapia génica germinal, pero no la realización de cualquier aplicación reproductiva (Ormond *et al.*, 2017). Esta tendencia se observa también en Europa donde representantes de más de 20 países europeos reflexionaron sobre el uso responsable de CRISPR-Cas, tal y como exponen la Sociedad Europea de Genética Humana (ESHG). En definitiva, aunque hay cierto acuerdo de postulados en la comunidad científica existe una gran cantidad problemas bioéticos asociados que impiden que el uso de esta técnica a día de hoy ya que suponen un riesgo impredecible (Chneiweiss *et al.*, 2017)

En cuanto a la edición de la línea somática, CRISPR ha sido utilizado en numerosos modelos animales con mucho éxito, tal y como se puede observar en la **Tabla 3**. En humanos se ha utilizado por primera vez en China en el año 2016. Tras extraer células cancerosas de riñón pulmón, hígado o garganta de 86 pacientes de varios ensayos (Cyranoski, 2016) y analizar la sangre de 34 de esos voluntarios se comprobó que casi todos presentaban una adaptación inmunitaria contra la proteína Cas, por lo que suponía que el tratamiento no estaba siendo para nada efectivo y podría ser perjudicial en los tejidos afectados ya que las células T dirigidas a Cas tenían una probabilidad de desencadenar un ataque generalizado en los propios tejidos del cuerpo (Ledford, 2018). Por otro lado, se ha descubierto que CRISPR produce grandes deleciones y reordenamientos genéticos que se desconocían hasta la fecha.

Es preocupante la rapidez con la que se están desarrollando ensayos clínicos con CRISPR en China y por ello deberían establecerse unas pautas mucho más

estrictas para su uso, analizando con mucha más cautela el balance riesgo-beneficio para los pacientes. Es por ello que EEUU suspendió en el 2016, un ensayo en humanos con CRISPR, debido a sus grandes problemas de seguridad (Reardon, 2016).

Teniendo en cuenta la información disponible, se pueden extraer las siguientes conclusiones sobre las implicaciones éticas:

- CRISPR/Cas es una herramienta muy poderosa en la ingeniería genética de fácil uso y gran potencial, pero a su vez es una herramienta aún muy desconocida.
- El uso de CRISPR/Cas en terapia génica en humanos sigue siendo hoy día un reto casi imposible debido a las consecuencias desconocidas que puede desencadenar.
- La investigación debe ir siempre de la mano de la ética. El control de las investigaciones científicas debe ser muy exhaustivo y requiere de una gran cautela. El debate ético entre toda la comunidad científica es totalmente necesario y deber ser constante.
- Antes de llevar a cabo cualquier investigación se deben analizar todos los factores a tener en cuenta con el fin de reducir la peligrosidad.
- La población debe conocer cuáles son los retos a los que nos estamos enfrentando, para así poder participar en la toma de decisiones.

8. DISCUSIÓN

CRISPR ha conseguido en su gran mayoría, arrebatarse el puesto a otros métodos, tales como las nucleasas de dedos de zinc (ZFN) o las enzimas nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción (TALEN). Con CRISPR/Cas9 en concreto, el empleo de un ARN guía para especificar la secuencia diana, basta para realizar el corte específico, mientras que el empleo de ZFN y TALEN requieren un diseño mucho más tedioso y caro para realizar la misma función.

Los beneficios que obtenemos gracias a la tecnología CRISPR/Cas en aplicaciones como el sector sanitario y agrícola entre otros es claramente un éxito (Hernández, 2018). Sin embargo, aunque esta tecnología ha conseguido grandes avances, quedan aún muchos problemas por resolver, como el problema que plantea el efecto *off target* de Cas9. Es por ello que, una de las principales vías de

investigación de CRISPR/Cas se basan en disminuir los efectos inespecíficos (Ma *et al.*, 2014).

9. CONCLUSIONES

Han pasado 40 años desde que un equipo japonés durante sus estudios del funcionamiento de un enzima los llevara por casualidad al descubrimiento de lo que hoy conocemos como CRISPR-Cas. Esta técnica se ha convertido a día de hoy en una poderosísima herramienta que ha revolucionado el mundo de la genética.

Tal y como hemos visto en esta revisión bibliográfica, pese a sus inconvenientes tanto funcionales como éticos, esta técnica posee cada día más aplicaciones, tanto en mejora genética aplicada a la producción animal y vegetal, como en terapia génica entre muchas otras. Por otro lado, cabe destacar la posibilidad de su fácil aplicación para resolver otros problemas, como ha ocurrido en su empleo para el diagnóstico de la COVID-19.

Por último, hay que hacer un notable hincapié en el papel de la investigación. CRISPR-Cas se ha convertido en la mejor herramienta para la edición dirigida del genoma y todo esto ha sido gracias a la gran labor de los investigadores. Su trabajo constante nos ha permitido llegar a lo que sabemos hoy. Es por ello que debemos seguir trabajando para conseguir los objetivos que se propongan.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Adli, M. (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature communications*, 1-13.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Biology of the Cell* (4th ed.). New York: Garland Science.
- Baltimore, D., Berg, P., Botchan, M., Carroll, D., Charo, R. A., Church, G., . . . Martin, G. S. (2015). A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Nature Biotechnology*, 36-38.
- Bikard, D., Euler, C., Jiang, W., Nussenzweig, P., Goldberg, G., Duportet, X., . . . Marraffini, L. (2014). Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat Biotechnol.*, 1146-5039.
- Bortesi, L., & Fisher, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 41-52.

- Capeocchi, M. R. (1989). The new mouse genetics: Altering the genome by gene targeting. *Trends in Genetics*, 5(3), 70-76.
- Capeocchi, M. R. (1994). Sustitución dirigida de Genes. *Investigación y Ciencia*(212), 120-127.
- Cermak, T., Doyle, E. L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., . . . Voytas, D. F. (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research*, 39(12), e82.
- Chneiweiss H, Hirsch F, Montoliu L, Müller AM, Fenet S, Abecassis M, . . . A., S.-R. (2017). Fostering responsible research with genome editing technologies: a European perspective. *Transgenic Res.*, 709-713.
- Choi, J. (2020). Development of Point-of-Care Biosensors for COVID-19. *Frontiers in Chemistry*, 1-10.
- Cota-Coronado, J., Sandoval-Ávila, S., Gaytan-Dávila, Y., Diaz, N., Vega-Ruiz, B., Padilla-Camberos, E., & Díaz-Martínez, N. (2020). Nuevos modelos transgénicos para el estudio de la enfermedad de Parkinson basados en sistemas de edición con nucleasas. *Neurología*, 35(7), 486-499.
- Cyranoski, D. (2016, 11 15). CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature*, 479. doi:10.1038/nature.2016.20988
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1-9.
- Escobar-Muciño, E., Escobar-Muciño, E., & Gamboa-Pérez, A. (2020). Descripción del sistema CRISPR-Cas y su aplicación como metodología de punto de cuidado en la detección del SARS-CoV-2. *Alianzas y tendencias BUAP*, 50-98.
- Fagen, J. R., Collias, D., Singh, A. K., & Beisel, C. L. (2017). Advancing the design and delivery of CRISPR antimicrobials. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 4, 57-64.
- Fagen, J., Collias, D., Singh, A., & Beisel, C. (2017). Advancing the design and delivery of CRISPR antimicrobials. *ELSEVIER*, 57-64.
- Fellmann, C., Gowen, B. G., Lin, P.-C., Doudna, J. A., & Corn, J. E. (2016). Cornerstones of CRISPR–Cas in Drug Discovery and Therapy. *Nat. Rev. Drug Discov*, 16(2), 89-100.
- Gearing, M. (2017). *CRISPR 101: A Desktop Resource* (2nd Edition ed.). addgene.

- Giono, L. E. (2017). CRISPR/CAS9 Y LA TERAPIA GÉNICA. *Medicina (Buenos Aires)*, 405-409.
- Godfray, H., North, A., & Burt, A. (2017). How driving endonuclease genes can be used to combat pest and disease vectors. *BCM Biology*, 81.
- Gómez-Tatay, L., & Aznar, J. (2019). CRISPR-CAS9. El mayor avance en técnicas de edición genética requiere una reflexión ética. *Cuadernos De Bioética*, 171-185.
- Greisman, H. A., & Pabo, C. O. (1997). A general strategy for selecting high-affinity zinc finger proteins for diverse DNA target sites. *Science*, 275(5300), 657-661.
- Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F., & Nelson, K. E. (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLOS Computational Biology*, 1, 0474-0483.
- Harvey, L., Arnold, B., Lawrence, Z. S., Paul, M., David, B., & James, D. (2000). *Molecular Cell Biology*. New York: W.H. Freeman.
- Hernández, M. C. (2018). CRISPR/Cas: aplicaciones y perspectivas para el mejoramiento genético de plantas. *Biotecnología Vegetal*, 18(3), 135-149.
- Hryhorowicz, M., Lipinski, D., Zeyland, J., & Słomski, R. (2017). CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 233-240.
- Hsu, P., Lander, E., & Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429–5433.
- Jansen, R., Embden, J. D., Gastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1565–1575.
- Joung, J., Ladha, A., Saito, M., Segel, M., Bruneau, R., Huang, M. W., . . . Zhang, F. (2020). Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics. *medRxiv*. doi:10.1101/2020.05.04.20091231
- Kim, Y.-G., Cha, J., & domain, S. C. (1996). Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96, 1156-1160.

- King, D. (2016, Mayo 04). The CRISPR/Cas9 System and its Applications. *Cell Culture Dish*.
- Klug, A. (2010). The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Anual Review of Biochemistry*, 79, 213-231.
- Lammoglia-Cobo, M. F., Lozano-Reyes, R., García-Sandoval, C. D., Avilez-Bahena, C. M., Trejo-Reveles, V., Muñoz-Soto, R. B., & López-Camacho, C. (2016). La revolución en ingeniería genética: sistema CRISPR/Cas. *Investigación en Discapacidad*, 5(2), 116-128.
- Lander, E. (2016). The Heroes of CRISPR. *Cell*, 18-28.
- Ledford, H. (2018, 01 08). *Nature*. Retrieved from <https://www.nature.com/articles/d41586-018-00335-8>
- Leon, L., Mendoza, S., & Bondy-Denomy, J. (2017). How bacteria control the CRISPR-Cas arsenal. *ELSEVIER*, 87-95.
- Li, H. L., Fujimoto, N., Sasakawa, N., Shirai, S., Ohkame, T., Sakuma, T., . . . Hotta, A. (2015). Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem cell reports*, 4(1), 143-154.
- Lockyer, E. (2016). The potential of CRISPR-Cas for treating genetic disorders. *BioscienceHorizons*, 9.
- Long, Q.-X., Tang, X.-J., Shi, Q.-L., Li, Q., Deng, H.-J., Yuan, J., . . . Huang, A.-L. (2020). Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nature Medicine*, 1200-1204.
- Ma, H., Marti-Gutierrez, N., SW, P., & al., e. (2017). Correction of pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*, 413-419.
- Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I., & E. V. Koonin. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: Computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*, 1(7), 1-26.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2018). Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here? *The CRISPR Journal*, 1, 325-336.
- Makarova, K., Wolf, Y., Alkhnbashi, O., Costa, F., Shah, S., Saunders, S., . . . Koonin, E. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.*, 722-736.

- Miller, J. C., Holmes, M. C., Wang, J., Guschin, D. Y., Lee, Y.-L., Rupniewski, I., . . . Rebar, E. J. (2007). An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology*, 25, 778-785.
- Mojica, F. J., & Almendros, C. (2017). El descubrimiento del sistema CRISPR-Cas. *Investigación y Ciencia*, 20-30.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., & Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*, 1(36), 244-246.
- Mojica, F., Juez, G., & Rodríguez-Valera, F. (1993). Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular Microbiology*(9), 613-621.
- Montoliu, L., Díez-Fuertes, F., & Castro, I. P. (2020, 07 27). *La tecnología CRISPR en la infección por SARS-CoV-2*. Grupo de Análisis Científico de Coronavirus del ISCIII. Retrieved from <http://hdl.handle.net/20.500.12105/10849>
- Oost, J. v., Westra, E. R., Jackson, R. N., & Wiedenheft, B. (2014). Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.*, 479-492.
- Ormond, K., E., M. D., Scholes, D. T., Brody, L. C., Faucett, W. A., Garrison, N. A., . . . Young, C. E. (2017). Human Germline Genome Editing. *The American Journal Of Human Genetics*, 167-176.
- R. Barrangou et al. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315, 1709-1712.
- Ramalingam, S., Kandavelou, K., Rajenderan, R., & Chandrasegaran, S. (2011). Creating designed zinc-finger nucleases with minimal cytotoxicity. *Molecular Biology*, 405, 630-641.
- Reardon, S. (2016, June 22). *First CRISPR clinical trial gets green light from US panel*. Nature News & Comment. doi:10.1038/nature.2016.20137
- Reardon, S. (2016). First CRISPR clinical trial gets green light from US panel. *Nature*.
- Rodríguez, E. G., Martín, M. S., & Sánchez, F. L. (2018). *Edición Génica Mediante el Sistema CRISPR-Cas*. Salamanca: Universidad de Salamanca.
- Rudin, N., Sugarman, E., & Haber, J. E. (1989). Genetic and Physical Analysis of Double-Strand Break Repair and Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122, 519-534.

- Scherer, S., & Davis, R. W. (1979). Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76(10), 4951–4955 .
- Selle, K., Klaenhammer, T., & Barrangou, R. (2015). CRISPR-based screening of genomic island excision events in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(26), 8076-8081.
- Sociedad Andaluza de Enfermedades Autoinmunes. (2015). Terapia génica mediante nucleasas específicas; hacia la cirugía genética. Lupus Neonatal. *Cuadernos de Autoinmunidad*, 3, 6.
- Stern, M. J., Ames, G. F.-L., Smith, N. H., Robinson, E. C., & Higgins, C. F. (1984). (37), 1015-1026.
- Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S., & Gregory, P. D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 11(9), 636-646.
- Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S., & Gregory, P. D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature reviews genetics*, 11, 636-646.
- Vilaseró, M. (2018, Mayo 17). Las "superbacterias" matan a 35.000 personas al año en España. *El periódico*.
- Westra, E., Dowling, A., Broniewski, J., & Houte, S. v. (2016). Evolution and Ecology of CRISPR. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 307-331.
- Wright, W. D., Shah, S. S., & Heyer, W.-D. (2018). Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *The Journal of biological chemistry*, 293(27), 10524 –10535.
- Xie, K., & Yang, Y. (2013). RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Mol Plant*, 1975-1983.