



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

CRISPR-Cas9: Gene Drives

Autor: Ana Cristina García Esteban

Fecha: Julio 2020

Tutor: Elvira Román González

ÍNDICE

1	RESUMEN/ <i>ABSTRACT</i>	3
2	INTRODUCCIÓN	4
2.1	Breve historia del CRISPR-Cas.....	4
2.2	Fundamento biológico CRISPR-Cas9: componentes y mecanismo básico.....	4
2.3	Aplicaciones biotecnológicas de CRISPR-Cas9.....	6
2.4	Edición genómica.....	7
3	OBJETIVOS	8
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
5.1	Mecanismo de los <i>Gene Drives</i>	8
5.1.1	Requisitos	10
5.1.2	Estrategias de control.....	11
5.2	Aplicaciones	13
5.2.1	Erradicación de enfermedades transmitidas por vectores	13
5.2.1.1	<i>Homing</i> para la inactivación de genes (<i>knock-out</i>)	14
5.2.1.2	<i>Homing</i> para la introducción de genes (<i>knock-in</i>).....	15
5.2.1.3	<i>Gene drives</i> de cromosomas Y.....	16
5.2.1.4	Otros	17
5.2.2	Inactivación de genes responsables de la resistencia a antibióticos.....	17
5.3	Consideraciones éticas y regulatorias de los <i>Gene Drives</i>	18
6	CONCLUSIONES	19
7	BIBLIOGRAFÍA	19

1 RESUMEN/ABSTRACT

Los motores o impulsores génicos, conocidos como *gene drives*, surgieron a partir de la idea de modificar el genoma de un organismo de manera permanente con el fin de alterar especies enteras.

Mediante el uso de CRISPR-Cas9, se han podido obtener en el laboratorio *gene drives* capaces de mantener los cambios heredables de forma no mendeliana que evaden la presión de la selección natural aun suponiendo un coste al *fitness* o adecuación biológica. Los *gene drives* basados en la tecnología CRISPR-Cas9 están constituidos principalmente por la enzima Cas9 y un gRNA, localizados en un alelo determinado y dirigidos justo a ese mismo lugar en el alelo silvestre. En ausencia de molde reparador, la reparación se dará usando como molde el alelo donde está localizado el *drive*. Este hecho favorece la propagación del *gene drive*, ya que lo mantiene de generación en generación, y de las secuencias cargo unidas a él, cuando están presentes en la construcción. Para poder llevar a cabo esta técnica, se han de considerar los posibles inconvenientes a nivel molecular que puedan surgir, además de establecer medidas de control a nivel biológico y físico, que garanticen la estabilidad y seguridad de los *gene drives* diseñados. Entre las aplicaciones podemos encontrar la disminución o erradicación de enfermedades transmitidas por vectores como la malaria por mosquitos *Anopheles* o lucha contra la resistencia a antibióticos. Existen diversas estrategias para el diseño de *gene drives* con estos fines, no obstante la ciencia sigue avanzando para conseguir construcciones más estables y seguras.

Esta técnica no está exenta de limitaciones o preocupaciones. Por ello es necesario hacer balance de los riesgos/beneficios potenciales derivados de su empleo, teniendo en cuenta las implicaciones tanto éticas como ambientales que conlleva. Además es indispensable una regulación legal que garantice el correcto empleo de la técnica.

Palabras clave: “CRISPR”, “Cas9”, “*gene drive*”, “malaria”, “*homing*”

Gene drives arose from the idea of permanently modifying an organism's genome in order to alter entire species.

By using CRISPR-Cas9, it has been possible to obtain in the laboratory gene drives capable of maintaining non-Mendelian inheritable changes that evade the pressure of natural selection even if it imposes a fitness cost. CRISPR-Cas9-based gene drives mainly consist of Cas9 enzyme and a gRNA, located on a given allele and directed to the same spot on the wild allele. In default of repair sequence, the repair will be done by using the allele where the drive is located as a template. This fact favors the propagation of the gene drive, as it maintains it from generation to generation, and the cargo sequences linked to it, when they are present on the construction. In order to carry out this technique, it is necessary to consider the possible challenges at molecular level that may arise, so as to establishing control measures at the biological and physical level, which guarantee the stability and safety of the designed gene drives. Among the applications we can find the reduction or eradication of vector-borne diseases such as malaria by *Anopheles* mosquitoes or the fight against antibiotic resistance. There are various strategies for the design of gene drives for these purposes, however science continues to progress towards more stable and safe constructions.

This technique is not without limitations or concerns. Therefore, it is necessary to develop a risk/benefit assessment derived from the implementation of this technique, taking into account the ethical and environmental implications that this entails. In addition, legal regulation is essential to guarantee the correct use of the technique.

Key words: “CRISPR”, “Cas9”, “*gene drive*”, “malaria”, “*homing*”

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Breve historia del CRISPR-Cas

Las secuencias CRISPR fueron descubiertas por primera vez en el genoma de la bacteria *Echerichia coli* (*E.coli*) en 1987 por un grupo de investigadores japoneses [1]. En 1993, el microbiólogo español Francis J. Mojica junto a sus colaboradores, determinaron unas secuencias diferentes a las identificadas hasta el momento que presentaban un carácter repetitivo y parcialmente palindrómico, en el material genético de *Haloferax mediterranei*, microorganismo perteneciente al grupo de las arqueas. A pesar de desconocerse su función, el interés por estas secuencias fue aumentando en los próximos años. FJ. Mojica propuso el término SRSR (*Short Regularly Spaced Repeats*) [2] que posteriormente, en 2002, derivaría en CRISPR, del inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (Repeticiones Cortas Palindrómicas Regularmente Interespaciadas y Agrupadas) [3]. Estas secuencias fueron detectadas posteriormente en numerosas bacterias y arqueas. Sin embargo, no fue hasta 2007 que se descubrió su utilidad frente a bacteriófagos [3,4] gracias a los primeros experimentos que demostraron la relación entre CRISPR y la inmunidad adaptativa. Este descubrimiento hizo que los científicos se plantearan por primera vez la aplicación biotecnológica del sistema CRISPR para conseguir la inmunidad frente a fagos a partir del uso de cultivos de bacterias utilizadas en la industria. En 2012, Emmanuelle Charpentier y Jennifer A. Doudna junto con sus respectivos grupos de investigación, dilucidaron los mecanismos y elementos necesarios mediante los cuales se podía cortar el DNA basándose en las secuencias CRISPR. Este hecho implica un gran avance en la ingeniería genética gracias al empleo de la tecnología CRISPR-Cas. Por primera vez disponemos de una técnica biotecnológica que permite realizar cambios de manera dirigida empleando un RNA guía diseñado *ad hoc* y una proteína con capacidad de corte de material genético. Hoy en día, estamos sufriendo una revolución en la biología gracias al descubrimiento de esta tecnología basada en los principios de apareamientos de bases de Watson y Crick, principalmente mediante el empleo de una endonucleasa programable y guiada por un RNA, conocida como Cas9 [1]. A partir de este hecho, la ciencia ha seguido avanzando y actualmente, disponemos de enzimas derivadas de sistemas CRISPR que permiten emplear la técnica a diferentes niveles, como por ejemplo el empleo de CRISPR-Cas12a en la edición y regulación genética [5] o, desde 2018, la edición de RNA por parte de CRISPR-Cas13b [5,6], entre otros. Destaca el diseño, en los últimos meses, de métodos para la detección del material genético RNA del SARS-Cov-2 mediante Cas12 con el sistema de diagnóstico DETECTR [7] o el posible tratamiento en estudio frente a virus RNA como este, empleando Cas13d [8].

2.2 Fundamento biológico CRISPR-Cas9: componentes y mecanismo básico

Dentro del genoma de los procariotas, tanto de bacterias como de la mayoría de las arqueas, podemos diferenciar el *locus* CRISPR (Figura 1), que comprende de manera general el CRISPR-*array* (repeticiones y espaciadores) y la región adyacente denominada Cas (*CRISPR associated genes*). Gracias a los genes implicados en estas secuencias palindrómicas, los procariotas han conseguido desarrollar un sofisticado sistema guiado por un RNA complementario a una región específica del DNA invasor, que les proporciona inmunidad adquirida contra infecciones de plásmidos y bacteriófagos. El sistema CRISPR-Cas está presente en numerosos microorganismos, siendo Cas9 de *Streptococcus pyogenes* la endonucleasa más estudiada y usada en ingeniería genética hasta el momento [3].

Para que se dé el proceso de inmunización (Figura 1), en primer lugar ha de haber una introducción del material genético invasor, ya sea de origen plasmídico o de un bacteriófago. Luego pequeños fragmentos de dicho DNA exógeno serán integrados en la región CRISPR en el cromosoma hospedador, como nuevos espaciadores. En este proceso actúan las enzimas Cas1 y Cas2 [3,9]. Las zonas que darán lugar a un espaciador se conocen como protoespaciadores y son adyacentes a la secuencia PAM (*Protospacer Adjacent Motif* [4] o Motivos Adyacentes al Protoespaciador) del DNA invasor. El tamaño y características del motivo PAM varían según el invasor. De esta manera se consigue un almacén de información genética que proporciona memoria, la cual podrá ser utilizada para prevenir infecciones futuras por el mismo invasor [3,9].

Cuando se produce de nuevo la entrada del DNA exógeno, este será reconocido por una nucleasa Cas y el RNA guía correspondiente. Este RNA será sintetizado por la propia célula, siendo el encargado de dar la especial característica de especificidad a la enzima.

Se conocen seis tipos de sistemas CRISPR (I-VI) según la clasificación CRISPR-cas *loci*, cada uno con sus proteínas Cas correspondientes. En nuestro caso, nos interesa el sistema CRISPR tipo II, ya que emplea una única endonucleasa conocida como Cas9 [9].

Un *locus* CRISPR característico en un sistema tipo II (Figura 1) comprende la región de longitud variable CRISPR *array* y el operón Cas, además de la zona de transcripción del *tracrRNA* (trans-activador-CRISPR-RNA o RNA tipo CRISPR que actúa en trans) [3,9].

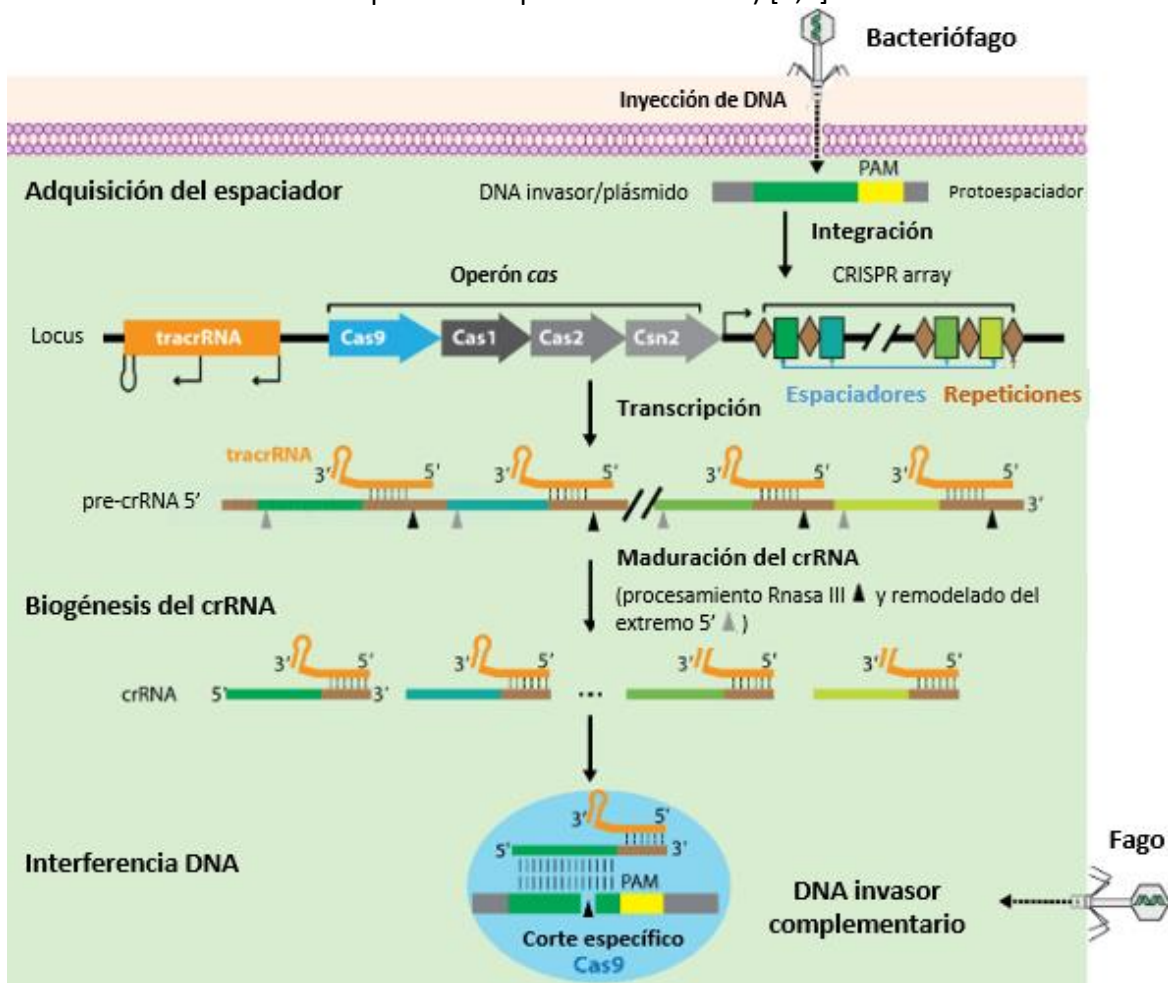


Figura 1: Procesos implicados en la inmunización e inmunidad adaptativa mediada por CRISPR. En la zona superior está representada la infección por un bacteriófago, seguida del locus CRISPR (regiones *tracrRNA*, operón Cas y CRISPR array). En la esquina inferior derecha, se muestra la reinfección por un fago y el proceso responsable de la inmunidad. (Adaptado de Jiang et al. 2017) [9].

Ahora bien, cuando se dé una reinfección por ejemplo, por un fago (Figura 1), se activará toda la maquinaria CRISPR, produciéndose la transcripción de los genes implicados. Habrá una cotranscripción del espaciador que contiene la información genética del fago implicado junto con el resto de espaciadores dando lugar a un precursor largo del CRISPR RNA, denominado pre-crRNA. También, se obtendrá la enzima Cas9 a partir de la información presente en el operon Cas. Por otro lado se dará la transcripción del tracrRNA, a partir de la región adyacente. Este deberá aparearse con el pre-crRNA para que tenga lugar la maduración, gracias al corte realizado por una RNasa III. Posteriormente habrá un remodelado del extremo 5' del crRNA por nucleasas que reducirán la longitud de la secuencia guía hasta 20 nucleótidos. Este proceso tendrá como resultado la estructura formada por crRNA:tracrRNA que, durante la interferencia, se unirá a la endonucleasa Cas9: Cas9:tracrRNA:(repetición+espaciador). Este complejo constituye la unidad funcional, gracias a la cual la enzima podrá ejercer su acción de manera dirigida sobre el DNA exógeno. Se da específicamente en la zona complementaria al crRNA, secuencia de 20 nucleótidos en el DNA invasor, que precede a la región PAM, necesaria para que Cas9 pueda unirse al DNA diana, ya que debe estar localizada inmediatamente después de esta [3,9].

Una vez la endonucleasa Cas9 reconozca el DNA invasor, lo cortará inactivándolo. Esto se debe a que Cas9 es una proteína de gran tamaño multifuncional que posee dos actividades nucleasa (Figura 2) principales: RuvC y HNH. En la región amino terminal se encuentra la actividad RuvC y es la encargada de cortar el DNA no complementario al espaciador. En el otro extremo de la proteína, en la zona carboxi-terminal, encontramos la actividad HNH, cuya función es realizar el corte en la región apareada [3,5].

Para que pueda tener lugar la inmunidad adaptativa, por tanto, han de ocurrir una serie de procesos básicos: la inserción de una secuencia corta del DNA invasor o infección-inmunización; la transcripción de pre-crRNA, que es el precursor del crRNA y su maduración junto con tracrRNA y el corte del DNA invasor por la endonucleasa de manera dirigida o interferencia [1].

2.3 Aplicaciones biotecnológicas de CRISPR-Cas9

La tecnología CRISPR-Cas9 presenta diversas aplicaciones biotecnológicas. Se basan en el empleo de la enzima de manera natural o de variantes obtenidas a partir de mutaciones en alguno de sus dominios con actividad endonucleasa (Figura 2), ya sea RuvC (D10) o HNH (H840), conocidas como nickasas; o de ambos, *dead* Cas9 (dCas9) [1,10,11].

- El uso de la Cas9 original es principalmente en la edición genómica [10].
- Las nickasas son variantes de Cas9 capaces de cortar una sola hebra de DNA. Gracias a esto, se reduce el riesgo de los efectos *off-side target* (modificaciones del DNA fuera de las regiones diana) muy presentes con Cas9, pero se pierde eficiencia en comparación. Para obtener resultados más específicos y eficientes, útiles en la edición genómica, se pueden combinar nickasas con diferentes gRNAs que actúen en cadenas opuestas de DNA [1,4,10].
- Las *dead* Cas9 (dCas9) tienen capacidad de unirse y reconocer secuencias pero sin capacidad de corte. Pueden fusionarse dominios efectores, tanto a la enzima como al sgRNA, para activar o reprimir genes, visualizarlos *in vivo* gracias a proteínas fluorescentes o realizar cambios epigenéticos (modificaciones en la cromatina al modificar la regulación de histonas o de metilaciones del DNA) [3,10].

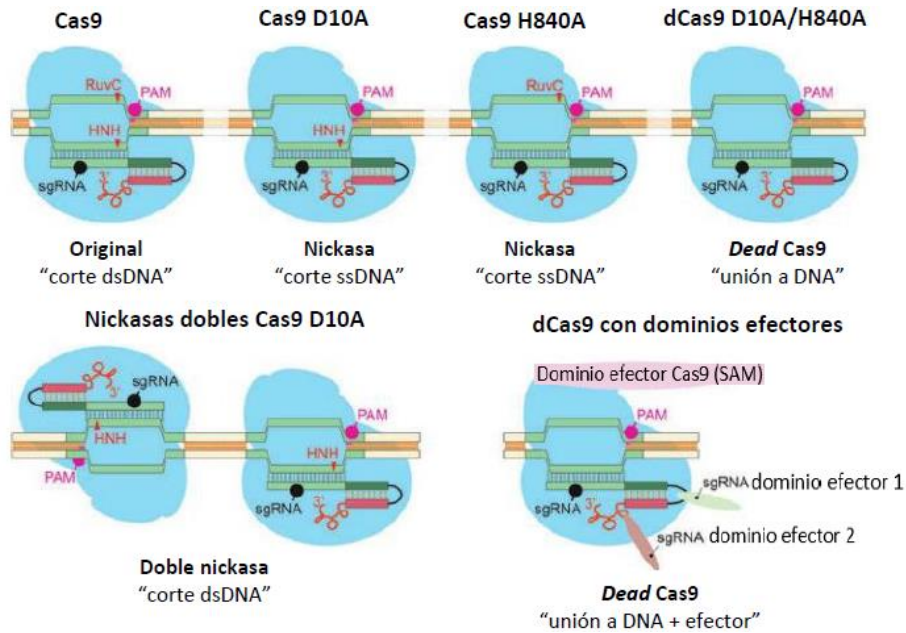


Figura 2: Tipos de enzimas Cas9 disponibles y sus efectos. Variantes de Cas9 según las acciones sobre el DNA, junto a la representación de los dominios y elementos implicados. (Adaptado de Kaulich et al. 2015) [10].

2.4 Edición genómica

La capacidad de modificar el DNA de un organismo es lo que se conoce como edición genómica [3]. Actualmente, existen varios tipos de tecnologías que nos permiten añadir, quitar o alterar regiones con el fin de corregir alteraciones nocivas genéticas de las células, entre las que destaca CRISPR-Cas9. Para poder corregirlas, es necesario poder dirigir la reparación mediante recombinación a la región que nos interesa. Esto es posible gracias a la recombinación genética homóloga que tiene lugar entre la región dañada y la versión correcta presente en un portador del ácido nucleico [3,11].

A partir de los principios de reconocimiento DNA-proteína, se desarrollaron los métodos basados en nucleasas de dedos de zinc (ZFNs) y TALENs (nucleasas efectoras tipo activadoras de la transcripción). Con ellas se puede llegar a generar mutaciones permanentes gracias a cortes en la doble cadena que activan los mecanismos de reparación. Sin embargo, presentan ciertos inconvenientes y limitaciones, como la dificultad de sintetizar y validar proteínas o su elevado coste. Todo esto queda solventado con la tecnología CRISPR-Cas9 [2,11].

Gracias a los descubrimientos de E.Charpentier y JA.Doudna, sabemos cómo poder llevar a cabo la técnica con CRISPR-Cas9, consiguiendo la actividad endonucleasa específica, dirigida y eficiente [1,3,9,11]. Además, el gran atractivo de esta curiosa enzima es que es capaz de dirigirse a diferentes regiones del DNA rediseñando el RNA guía. Gracias a esta unión: proteína-RNA-DNA obtenemos una herramienta versátil, rápida y de gran utilidad [1]. Esto contrasta con otras técnicas de edición genética como ZFNs o TALENs, ya que necesitan una proteína diferente para cada DNA diana. Lo que también hace a CRISPR-Cas9 una herramienta interesante, es la posibilidad de crear librerías de RNAs guía, que facilitarían el trabajo a muchos investigadores [1,11].

Una vez haya tenido lugar el corte de las hebras de DNA, tiene lugar una reparación. Esta puede ser mediante la unión no homóloga de los extremos de manera covalente, lo que suele derivar en mutaciones como inserciones o deleciones. La otra opción se basa en el empleo de la tecnología CRISPR-Cas9, gracias a la cual podemos realizar la adición simultánea de DNA

homólogo y correcto que hará de molde reparador, favoreciendo la recombinación homóloga y corrección del alelo defectuoso [3].

Hemos de tener en cuenta que aún existen ciertas limitaciones con esta técnica y que debemos asegurarnos de que tanto la introducción del sistema como la expresión, eficiencia y localización sean correctas y adecuadas. Este sistema CRISPR-Cas9, basado en la edición dirigida, es cada vez más popular debido a su simplicidad, rapidez, bajo coste, gran precisión y eficiencia, lo que le diferencia del resto de métodos conocidos hasta el momento [3,11].

3 OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo consiste en, a partir de una revisión bibliográfica, proponer el empleo de la tecnología CRISPR-Cas9 para el diseño de *gene drives*, mostrando los posibles inconvenientes que puedan surgir junto a sus soluciones. Así como presentar algunas de las potenciales aplicaciones de estos *gene drives*, que aportan un beneficio en la salud a nivel global. Por último se tratan de manera general los aspectos éticos y regulatorios derivados del uso de esta técnica.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

Se ha llevado a cabo una búsqueda de artículos publicados en revistas como Nature o Science, mediante el empleo de bases de datos científicas como Pubmed (NCBI) o Google Scholar. Las palabras clave para la búsqueda fueron principalmente “CRISPR”, “Cas9”, “*gene drive*”, “malaria” y “*homing*”. Además, se han empleado libros tanto en papel como digitales.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Mecanismo de los Gene Drives

Los *gene drives* (motores o impulsores génicos, *drives*), son sistemas que influyen en la herencia de un elemento genético facilitando que pase a la descendencia [3,12]. Por consiguiente, el resultado se verá reflejado tanto en el genotipo como en el fenotipo de la siguiente generación, y potencialmente en toda la población [12].

En la naturaleza existen genes capaces de favorecer su propia copia y de aumentar sus posibilidades de ser heredados. Unos ejemplos de estos elementos genéticos naturales dirigibles son los transposones capaces de insertarse en cualquier zona del genoma, genes que producen una distorsión en la segregación de los cromosomas sexuales, elementos MEDEA, microorganismos heredables como *Wolbachia* o genes de endonucleasas con capacidad de autocopia, entre otros [13,14]. Estos últimos, llamados *genes drives* naturales de endonucleasas (Figura 3) son capaces de cortar el cromosoma que no dispone de ese gen para que luego, ese corte, sea reparado gracias al empleo como molde de la secuencia del cromosoma homólogo que si presenta el gen de la enzima [13].

Autin Burt propuso por primera vez una descripción de estos *gene drives* de endonucleasas (Figura 3) y su potencial aplicación para modificar poblaciones [12,15]. El problema que surgió al llevarlos al laboratorio, fue la necesidad de una técnica capaz de insertar la secuencia deseada en el *locus* natural del genoma, con alta eficiencia y que el resultado fuera capaz de dispersarse por la población. Primero se usaron técnicas como los dedos de Zinc o TALENs, pero no fueron satisfactorias debido a su dificultad de diseño y gran coste. Con el descubrimiento de la nucleasa Cas9 y su gRNA este problema fue solventado [12,13].

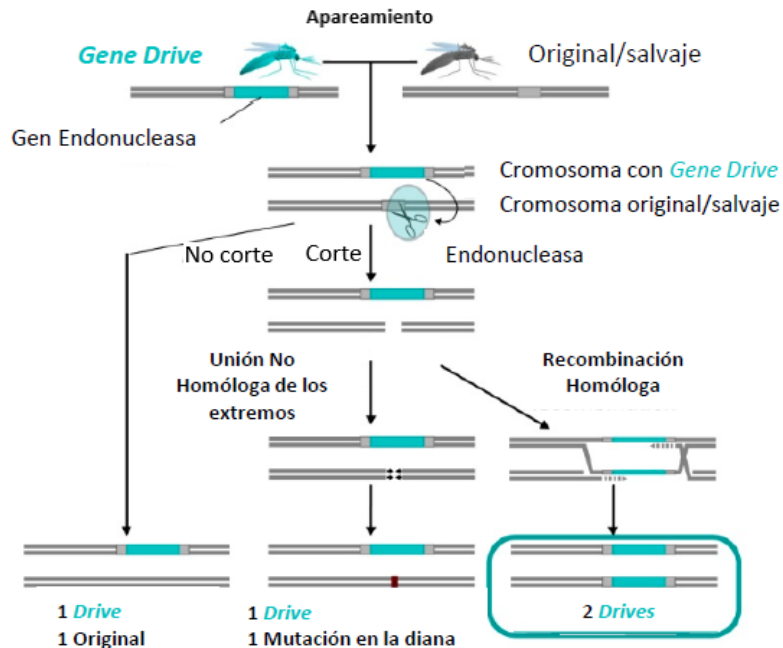


Figura 3: Efecto de los gene drives de endonucleasas. La herencia de estos drives se verá favorecida cuando la endonucleasa corte el cromosoma homólogo original (salvaje o silvestre) y la reparación sea por recombinación homóloga, ya que usará como molde el gene drive. Si la endonucleasa falla o se repara el corte mediante recombinación no homóloga, el drive no se copiará. (Adaptado de Esvelt et al. 2014) [13].

El mecanismo básico de los *gene drives* basados en la tecnología CRISPR-Cas9 se fundamenta en los mismos principios que los *gene drives* naturales de endonucleasas (Figura 3), ya mencionados [13]. Consiste en introducir Cas9 y sus RNAs asociados en un determinado *locus* génico. La guía de RNA está diseñada para reconocer la secuencia de ese mismo locus original, que está solo presente en el cromosoma homólogo. Cas9 reconocerá esa zona y la cortará. Luego el corte será reparado usando como molde la copia existente en el cromosoma que contiene el *gene drive*, lo que conlleva la duplicación de la región donde se introdujo este [3]. Futuras duplicaciones, tanto por meiosis como por mitosis, implican el mantenimiento de esta construcción en las células hijas siempre que se repare mediante recombinación homóloga. Gracias a esto, es posible propagar genes (cargos) al asociarlos a la construcción de Cas9 [3].

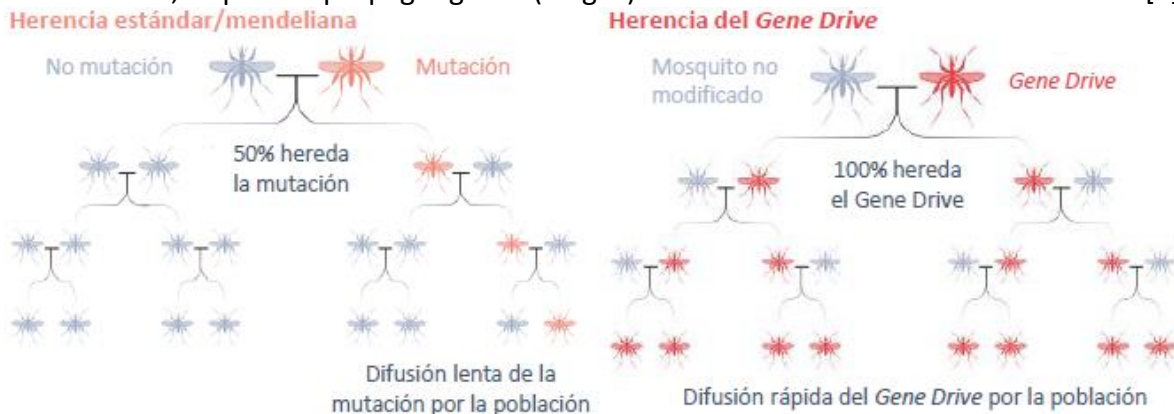


Figura 4: Comparación entre la herencia estándar o mendeliana y la herencia de los gene drives.

Cuando una mutación se hereda de manera estándar o mendeliana (izquierda), la descendencia tendrá un 50% de probabilidad de heredarla. El resultado, con el paso del tiempo, será una difusión lenta por la población. Si el cambio se produce mediante un gene drive (derecha), la descendencia heredará en aproximadamente el 100%. El resultado será una dispersión rápida de ese gen por toda la población. (Adaptado de Scudellari. 2019) [16].

La herencia de los *gene drives* (Figura 4) es una excepción a las Leyes de Mendel ya que se favorece que, aproximadamente, el 100% de la descendencia herede ese gen además de favorecerse el genotipo homocigoto [12,16]. Todo este proceso que consiste en alojar o dirigir la información contenida en genes a un sitio concreto del genoma, es lo que se conoce como *homing* [13,17].

Además, la técnica que emplea la tecnología CRISPR-Cas9 presenta la peculiar capacidad de poder llegar a secuencias diana diferentes a las ya conocidas. Esto permite diseñar nuevos *gene drives* dirigidos. Al mismo tiempo, se solucionan problemas de estabilidad y permite crear construcciones más seguras y funcionales. Por todo ello, con Cas9 es posible realizar los cambios deseados en diferentes especies de forma rápida y simple [3,13].

5.1.1 Requisitos

Para que el proceso de *homing* del *gene drive* guiado por RNA pueda darse en una población, hay que considerar los posibles inconvenientes que puedan surgir a nivel molecular. A continuación vemos cómo pueden influir el corte, la especificidad, la copia y la estabilidad evolutiva en dicho proceso [13].

- **Corte:** el corte realizado por la endonucleasa ha de ser completo. Para asegurarnos de ello, la solución más rentable es usar múltiples secuencias adyacentes como objetivo. Este proceso es muy simple con Cas9 ya que bastaría con la expresión de gRNAs adicionales. Además, las secuencias pueden diseñarse para evitar repeticiones inestables en el *drive* [13].

- **Especificidad:** se debe evitar cortes *off-target*, es decir, en zonas no deseadas del genoma. A pesar de que con Cas9 el reconocimiento suele ser altamente específico, se ha visto que puede producir cortes en zonas similares a las diana. Esto es un problema, sobre todo en especies con grandes genomas, donde es más probable encontrar secuencias repetidas o similares. En tal caso, habría que hacer un estudio minucioso de las secuencias para seleccionarlas más específicamente [13]. Existen también estrategias como el empleo de nickasas dobles en vez de la nucleasa para conseguir una mayor precisión en el reconocimiento y corte [9,13].

- **Copia:** debe ser mediante recombinación homóloga. Hay que evitar la recombinación no homóloga, ya que no favorecería la propagación del *gene drive*. Este paso es muy complicado e importante, ya que si no se da de manera correcta, todo el proceso se vería comprometido. Existen diferencias entre especies en cuanto al grado de recombinación homóloga posible. Influyen los tipos de células implicados, los estadios de desarrollo, las fases del ciclo celular y el tipo de enzima empleada [13]. El objetivo siempre será un alto grado de recombinación homóloga [3,13].

Para aumentar la probabilidad de recombinación homóloga existen una serie de estrategias: emplear nickasas Cas9 en vez de nucleasas Cas9 [13]; no es el mismo corte el de Cas9 como endonucleasa, se obtienen extremos romos, que los cortes de las nickasas, en este caso el resultado serán extremos cohesivos (pegajosos, *sticky*) en 5' y 3'. Además, se pueden reprimir genes involucrados en la recombinación no homóloga. Para ello, se emplea la enzima *dCas9* con capacidad de unión específica a una secuencia del gen de recombinación no homóloga, pero sin capacidad de corte. Por otro lado, existe también la posibilidad de activar los genes de recombinación homóloga. Para que estas medidas sean efectivas tendrán que darse suficientemente rápido para que puedan influir en la copia del *drive* [9,13].

- **Estabilidad evolutiva:** durante los procesos de corte-copia, pueden producirse alelos resistentes a los *gene drives*. Esto puede deberse principalmente a dos procesos. El primero es la reparación del corte por recombinación no homóloga. Si esto se diera, el resultado sería un alelo resistente al *drive* por inserciones o deleciones viéndose afectado el corte por la endonucleasa [13]. Se perdería la zona de reconocimiento del gRNA y por tanto se impediría la conversión del alelo original por el *drive* [18]. Como consecuencia el *gene drive* se perdería por la propia selección natural, sobre todo cuando suponga un coste al *fitness* o adecuación celular [13,18]. Para que los *gene drives* diseñados sean efectivos, necesitamos reducir la formación de alelos resistentes. Una estrategia es crear *drives* que contengan gRNAs con múltiples dianas. Deberían acumularse mutaciones suficientes en todas las secuencias diana para que se impidiera la función del *drive* [13,18]. Otra solución sería crear *drives* que solo funcionen a nivel de línea germinal masculina, lo que reduciría significativamente la formación de resistencias en el embrión debido a que la transferencia de Cas9 sería en menor cantidad que si se diera a partir de los óvulos [18]. Por último, si las secuencias diana forman parte de un gen esencial es menos probable que se generen resistencias, ya que si se dieran mutaciones en esas secuencias, el resultado sería un alelo deletéreo o letal en vez de uno resistente [13,18]. El otro proceso por el que se pueden generar alelos resistentes consiste en la evolución del organismo receptor hasta conseguir desarrollar un método que inhabilite el *gene drive*. En eucariotas es difícil que existan inhibidores de Cas9 debido a que es una enzima de origen procariota. Sin embargo, estas resistencias pueden aparecer con el tiempo después de haber estado en contacto con la enzima. Normalmente se darían adaptaciones que inhibirían a una Cas9 en particular o a un gRNA determinado, lo que se podría evitar mediante el diseño de *drives* con variantes de Cas9 que además usen diferentes gRNAs. Otro mecanismo que generaría resistencias sería el aumento de la actividad RNasa por parte del organismo lo que causaría la degradación de todos los gRNAs, aunque es menos probable porque tendría efectos perjudiciales de manera generalizada en el organismo [13].

5.1.2 Estrategias de control

Al tener el potencial de alterar especies enteras y, por tanto, ecosistemas, es necesario desarrollar estrategias para el control de los *gene drives*. A parte de tener como objetivos añadir y/o alterar genes existentes, los *gene drives* basados en gRNAs también son capaces de sustituir secuencias existentes por secuencias alteradas que han sido recodificadas para evitar que un *gene drive* pueda reconocer su diana. Es decir, que con un nuevo *gene drive* se pueden controlar los efectos de otros *gene drives* anteriores [13].

Se pueden revertir los efectos producidos en el genoma por un *gene drive* que ya se haya difundido por la población. Además, se puede prevenir y controlar la difusión de los efectos del *gene drive* que queremos revertir para que en un futuro no genere complicaciones indeseadas [13]. Entre las estrategias propuestas encontramos:

- *Genedrives diseñados para revertir cambios preexistentes en el genoma:* estos cambios pueden deberse a un *gene drive* anterior que diera lugar a efectos adversos indeseados, o a la propia evolución. Para ello, se ha de diseñar una secuencia similar a la original pero que no pueda ser cortada por el *drive* que queremos sustituir. Además debe llevar la información que contrarreste los efectos ocasionados por este primer *drive* [19,20].

Para asegurarnos de que se ha producido de manera correcta este proceso, se puede añadir un tercer *drive* (*gene drive* de precisión), que reestablezca la información exacta

presente en los organismos originales no modificados y que deje solo el gRNA y el gen que codifica Cas9 [13,19].

- *Gene drives para la inmunización*: otra estrategia es diseñar *gene drives* para que bloqueen la difusión de otros *gene drives*. Mediante la inmunización, se puede conseguir la protección y evitar que en un futuro afecten a una población específica pero también se puede conseguir una protección frente a futuros virus que presenten DNA como material genético. Este tipo de *drives* se puede combinar con los diseñados para revertir el efecto. De esta manera, se difundirá por ambos tipos de individuos, los que presentan el *gene drive* diana y los que tienen la información original. Así se conseguirá que toda la población sea inmune a los efectos del primer *gene drive*. La combinación de ambas estrategias hace que sea un método más rápido a la hora de producir cambios en los ecosistemas [13,20].

- *Gene drives de precisión*: pueden desarrollarse *gene drives* para que afecten de manera precisa y específica a una población o incluso subpoblación, mediante un único gen o secuencia. Estos *drives* solo serán capaces de cortar una secuencia única lo que evitará la difusión fuera de la población deseada. Se estima que la secuencia PAM o por lo menos cinco pares de bases del espaciador, han de diferir en cada diana para prevenir que el gRNA pueda evolucionar y reconocer secuencias equivalentes fuera de la diana [13].

En poblaciones que solo experimenten intercambios intermitentes de genes, como puede ser el caso de especies presentes en islas, tienen una mayor probabilidad de presentar secuencias únicas que puedan servir para dirigir estos *drives*. Se pueden generar *drives* que tengan como secuencia diana esa secuencia única que posee esa población. Luego una vez que se ha implantado el *gene drive*, podemos usarlo como diana para un segundo *drive*. De esta manera conseguimos una mayor precisión a la hora de difundir la información ya que solo se difundirá cuando el primer *gene drive* haya actuado. Siempre y cuando el primer *drive* no se difunda por la población continental, el segundo *drive* estará presente solo en la población de la isla [13,20].

Otras estrategias (Figura 5) para el control y contención de los *gene drives*, consisten en barreras ecológicas como por ejemplo la realización de experimentos en zonas donde no haya posibilidad de apareamiento de los organismos portadores del *gene drive* con poblaciones autóctonas, debido a la ausencia de estas, o estrategias como la realización de los estudios con organismos de laboratorio que no puedan reproducirse con los originales o silvestres [21]. También son importantes las barreras físicas en las instalaciones de los laboratorios, como cortinas de aire en las puertas o cabinas de bioseguridad [20].



Figura 5: Estrategias de control para prevenir escapes indeseados de *gene drives* en laboratorios. (Adaptado de Min J et al. 2019) [20].

5.2 Aplicaciones

La capacidad de modificar o alterar poblaciones enteras tiene numerosas aplicaciones potenciales en el campo de la ingeniería genética de las que pueden verse beneficiados los seres humanos. Entre las principales aplicaciones encontramos la modificación de vectores de transmisión de enfermedades, control de plagas en la agricultura y de especies invasoras que supongan un riesgo para los ecosistemas [13], además de otras aplicaciones innovadoras como la inactivación de genes responsables de la resistencia a antibióticos [22].

5.2.1 Erradicación de enfermedades transmitidas por vectores

Las enfermedades humanas transmitidas por vectores suponen más de 700 000 muertes al año, y constituyen el 17% de las enfermedades infecciosas. Pueden ser producidas por parásitos, virus o bacterias. Entre ellas encontramos enfermedades como la malaria, el virus del Zika, el dengue o la fiebre amarilla [23]. El 80% de la población mundial está en riesgo de sufrir una o más enfermedades transmitidas por vectores [24], por ello debemos encontrar nuevas medidas que puedan disminuir la incidencia o incluso erradicarlas.

La malaria es una enfermedad producida por un parásito (*Plasmodium* sp) y su vector es la hembra infectada del mosquito *Anopheles*. Causa más de 400 000 muertes cada año, siendo la mayoría de estas muertes, de niños menores de 5 años y en territorios africanos.

Existen más de 400 especies diferentes del mosquito *Anopheles*, de las cuales los vectores más importantes de malaria son aproximadamente 30. En África los más comunes son *Anopheles gambiae* y *Anopheles funestus* [25,26].

Las medidas tomadas hoy en día para prevenir contagios se basan principalmente en dos formas de control de vectores empleando insecticidas [26]:

- Mosquiteras tratadas con insecticidas para reducir el contacto entre los mosquitos y los humanos, al proporcionar una barrera tanto física como química [26].
- Fumigación de interiores con efecto residual [26].

También hay medidas para tratar la enfermedad basadas en el uso de fármacos. Sin embargo, están apareciendo resistencias frente a estos insecticidas, por parte de los mosquitos, y a fármacos, por parte del parásito. Es por ello que, a pesar de la reducción del número de contagios y de las vidas salvadas gracias a la implantación de las medidas anteriores, existe la urgente necesidad del desarrollo de nuevas técnicas para hacer frente al vector de la malaria y por tanto, frente a la enfermedad [24].

Entre las nuevas estrategias ideadas, encontramos propuestas como [26]:

- Reducir el número de mosquitos al interferir en su supervivencia o reproducción [26].
- Favorecer la población masculina frente a la femenina [26].
- Cambiar las preferencias del mosquito, para que se alimente a partir de especies diferentes a la humana [26].
- Favorecer la muerte de los mosquitos hembra cuando estén infectadas [26].
- Modificar a las hembras del mosquito para que no puedan ser trasmisoras del parásito mediante la inactivación (*knocking-out*) de los genes implicados para ello; o por la introducción (*knocking-in*) de genes que puedan interferir con el desarrollo del parásito [26,27].

Para poder llevar a cabo las propuestas anteriores, se tiene que modificar la genética del mosquito [26]. Todas tienen como objetivo reducir la capacidad del mosquito como vector o

disminuir la población hasta llegar a niveles en los que no se pueda llevar a cabo la transmisión de parásito [26,27]. Se basan principalmente en la modificación de parámetros como la alteración del número de mosquitos, la supervivencia del mosquito, la tasa de picaduras a humanos o la de infección por picadura; pero para que puedan ser efectivas, tienen que poder transmitirse de generación en generación. Para poder conseguir cambios heredables del genoma de un organismo, se propone el uso de *gene drives* [26].

Mediante el uso de *gene drives*, se solucionaría el problema de la propagación de genes que tendríamos con la selección natural. Gracias a ellos, los genes que queremos que se hereden y que puedan suponer una desventaja para la supervivencia del organismo, en este caso de los mosquitos y por tanto del parásito, podrán difundirse de manera efectiva por toda la población implicada [13,26]. Además, para conseguir una nueva generación de mosquitos, se necesita de media un mes, lo que implicaría una rápida propagación de los *gene drives*. Gracias a esto, podrán emplearse para actuar de manera rápida y solucionar problemas relacionados con la salud. Existen varios diseños de *gene drives* para el control de vectores. Las siguientes estrategias han demostrado ser prometedoras en el laboratorio [26]:

5.2.1.1 *Homing* para la inactivación de genes (*knock-out*)

El mecanismo de estos *gene drives* se basa en el proceso, ya explicado, de *homing* llevado a cabo por una endonucleasa (Figura 6) [26]. En animales, la primera vez que se demostró este proceso fue en *Drosophila melanogaster* [28,29] y en *A.gambiae* [30], usando la endonucleasa de una levadura [26]. Con el desarrollo de la tecnología CRISPR-Cas9 se hicieron estudios con tres genes relacionados con la fertilidad de las hembras de *A.gambiae* en 2016 [27].

Debemos tener en cuenta que de manera general, si el proceso de *homing* del *gene drive* guiado por RNA ocurre en el óvulo fecundado o cigoto, o en etapas tempranas del desarrollo embrionario, cuando tenga lugar el desarrollo completo del individuo el resultado será un organismo homocigoto para el *gene drive* en todos los tejidos. Por otro lado, si ocurre solo en las etapas finales del desarrollo de células que darán lugar a los óvulos o espermatozoides, la descendencia será heterocigota en la mayoría de los tejidos y homocigota en los óvulos y espermatozoides [13,26].

Con este tipo de *gene drives* podemos conseguir diversos efectos en la población de mosquitos y en la transmisión de la malaria, según los genes diana y cuándo tenga lugar el proceso de *homing*. Si el objetivo es reducir la población de mosquitos, se pueden usar como genes diana aquellos implicados en la supervivencia o reproducción (Figura 6). Los modelos empleados en los estudios indican que, si el fenotipo resultante del *knock-out* es recesivo, es decir que para poder afectar a la supervivencia o reproducción los dos alelos implicados deben ser las copias modificadas, y que además se diera el proceso de *homing* en las células germinales, entonces, el resultado potencial sería la supresión de la población [26,27]. Esto se daría gracias a que la endonucleasa que causaría la letalidad o esterilidad se transmitiría con una mayor frecuencia en la población ya que ambos alelos serían los que llevan la información deseada y además se transmitirían a la descendencia por encontrarse en las células germinales [26].

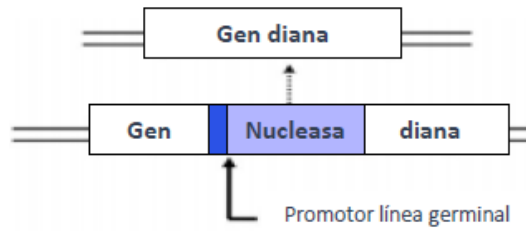


Figura 6: Construcción básica de un gene drive para Knock-outs. Un gen que contiene la nucleasa, reconocerá la secuencia diana y la cortará. Luego se insertará produciendo la inactivación del gen diana. La nucleasa ha de expresarse en la línea germinal para ser heredada. (Adaptado de Burt et al. 2018) [26].

Otra posibilidad es comprometer la trasmisión de la malaria al usar como diana uno o más genes implicados en la entrada, desarrollo y salida del parásito *Plasmodium* en el vector [26,27]. También es posible modificar otros genes como por ejemplo los implicados en el sentido del olfato del mosquito para que cambie sus preferencias de hospedador [26].

5.2.1.2 Homing para la introducción de genes (knock-in)

Estos *gene drives* también se basan en el proceso de *homing*, sin embargo ahora, la técnica consiste en diseñar un *gene drive* que lleve información adicional (carga, efector) y que sea capaz de dispersarse por la población (Figura 7) [26,27]. Para que las secuencias cargo se puedan propagar por la población, lo más sencillo es incluirlas como parte de la construcción del *gene drive* que llevará a cabo el proceso de *homing* [26]. La trasmisión y estabilidad de las secuencias cargo, por tanto, solo se verá favorecida si contribuyen de manera directa a la función del *drive* [13].

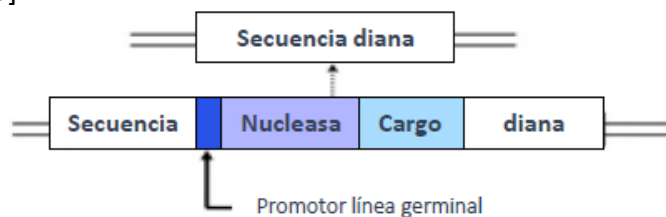


Figura 7: Construcción básica de un gene drive para Knock-ins. Además de la nucleasa, este tipo de *gene drives* lleva una secuencia efectora (carga) que ha de expresarse en los tejidos adecuados para ejercer su acción. (Adaptado de Burt et al. 2018) [26].

Las secuencias cargo (Figura 7) llevarán la información necesaria para que la trasmisión del parásito a través del vector se vea comprometida (efectores). Esta información puede incluir péptidos antimicrobianos, anticuerpos de una sola cadena, activadores del sistema inmune o péptidos que se unan a proteínas (receptores) del mosquito en las glándulas salivales o intestino medio para evitar la unión y reconocimiento del parásito. Además, será necesario que haya secuencias con la información para la expresión controlada de los cargos en los tejidos apropiados [26,31].

Con este proceso, surgen una serie de problemas [26]. El primero, común para el proceso de *homing* para *knock-outs*, es que se podrían dar mutaciones en las secuencias de la nucleasa (Figura 8e). Sin embargo si la enzima mutara, el proceso de *homing* se vería comprometido y por tanto no se propagaría ese error. El otro problema es que se produzcan mutaciones en las secuencias cargo (Figura 8n). Si esto se diera, el proceso de *homing* no se vería afectado, es decir, la endonucleasa no estaría mutada y sí que podría ejercer su función, favoreciendo que se pueda transmitir el error a la población. Por ello es importante elegir efectores cuyo resultado no suponga un gran coste al *fitness*. Por otro lado, se puede reducir la tasa de aparición de mutaciones que supongan la pérdida de función en los efectores, mediante la

meticulosa selección de las construcciones, de la localización en el genoma y del promotor [26,31]. Además, otro posible inconveniente es la posibilidad de resistencias frente a la información del cargo al igual que ocurre con la resistencia a fármacos [26].

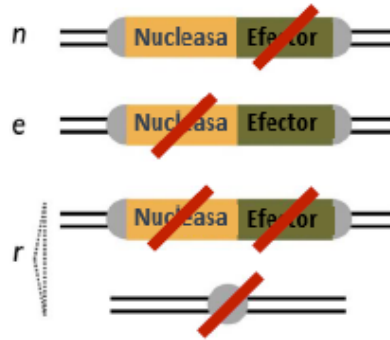


Figura 8: Posibles mutaciones en los gene drives y cargos (efectores). *n*, mutación en el efector, sí que puede heredarse y propagarse la resistencia; *e*, mutación en la nucleasa, no se hereda ya que no puede hacer su función de corte; *r*, mutación en ambos dominios dando lugar a una pérdida total de la función del drive. (Adaptado de Beaghton et al. 2017) [31].

5.2.1.3 Gene drives de cromosomas Y

Otra posibilidad es el desarrollo de *gene drives* para que se favorezca la herencia del cromosoma Y en vez del cromosoma X (Figura 9) [26,32].

Debido a que la malaria se transmite a través de la hembra del mosquito, favorecer un aumento de los mosquitos macho frente a las hembras provocará un impacto directo en la transmisión de la enfermedad, reduciéndola. Además, al reducir el número de hembras, la siguiente generación de mosquitos también se verá afectada. Esto se debe a que el número de mosquitos de una generación es función del número y productividad de hembras de la generación anterior [26]. Si hay pocas hembras, habrá poca descendencia y por consiguiente se reducirá la transmisión incluso pudiendo llegar a la extinción de la población [13,26].

En el caso de los mosquitos *Anopheles*, los machos poseen un cromosoma X y otro Y, mientras que las hembras poseen dos cromosomas X [33]. Normalmente, los cromosomas X e Y se transmiten en una proporción 50:50 a la siguiente generación, pero si hay un gen que hace que se favorezca la transmisión del cromosoma Y, entonces la descendencia será predominantemente masculina. Si el gen en cuestión se encuentra localizado en el cromosoma Y, también se transmitirá con él. Al final, se propagaría por la población y se reemplazaría el cromosoma Y normal por el modificado con el *gene drive*, sería un *gene drive* del cromosoma Y (Figura 9) [26]. Este modelo consiste en el diseño de una nucleasa que reconozca y corte específicamente una secuencia solo presente en el cromosoma X durante la meiosis para evitar que pueda ser heredado [13,26].

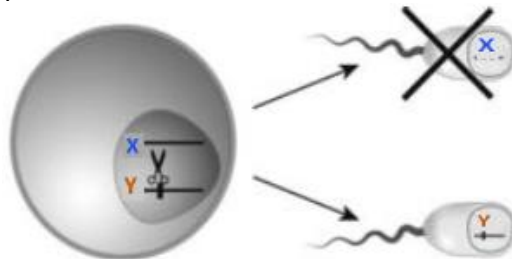


Figura 9: Representación del efecto de un gene drive del cromosoma Y. Se producirá una inactivación por corte del cromosoma X para favorecer la herencia del cromosoma Y. (Adaptado de Burt et al. 2018) [26].

5.2.1.4 Otros

La ciencia sigue avanzando para desarrollar *gene drives* que puedan solventar las limitaciones que puedan surgir según la función o aplicación deseada [17]. Una estrategia reciente consiste en el llamado *CleaveR drive* (*Cleave and Rescue drive, ClvR*), diseñado para reducir las resistencias asociadas a la recombinación no homóloga. Lo consigue gracias a eliminar la necesidad de ser copiado por recombinación homóloga. Si se diera la recombinación no homóloga el resultado sería letal en vez de la generación de resistencias, ya que no se obtendría una copia funcional del gen esencial. Consiste en un diseño basado en CRISPR-Cas9, compuesto por dos componentes: Cas9 y gRNA, que cortan y alteran el gen diana; y la versión del gen esencial resistente al corte [34]. Aprovecha el corte del gen esencial objetivo (toxina) localizado en el otro cromosoma, al tiempo que proporciona una copia resistente al corte del gen esencial (antídoto) que protege y evita la muerte de la descendencia que lo herede [17,34]. Otro ejemplo son los *Daisy drives*, que consisten en separar los componentes: endonucleasa y gRNA. Gracias a esto, se consigue una alternativa más segura ya que para que puedan ejercer su función necesitan que se produzca el cruce genético de las líneas [17,35].

5.2.2 Inactivación de genes responsables de la resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos es hoy en día una de las mayores amenazas sanitarias a las que nos enfrentamos. A pesar del desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades de origen bacteriano, estos microorganismos están consiguiendo adaptarse de manera rápida y efectiva frente a la mayoría de ellos, lo que supone un incremento considerable del coste médico, prolonga las estancias hospitalarias y aumenta la mortalidad. Es necesario y urgente el desarrollo de nuevas técnicas para enfrentarse a estas resistencias para lo cual se requieren esfuerzos por parte de todas las naciones [36].

Unos investigadores de California han desarrollado un sistema análogo a los *gene drives* basados en la tecnología CRISPR-Cas9, para la bacteria *Escherichia coli* (*E.coli*). El sistema es capaz de llegar a objetivos como plásmidos que contienen genes asociados a la resistencia a antibióticos o factores de virulencia. Esta información es importante para la patogénesis de muchas infecciones humanas producida por bacterias, por lo que la inactivación o sustitución de estos elementos puede tener un gran impacto en el éxito de un tratamiento [22].

Se basa en la modificación del sistema CRISPR de la bacterias mediante el mecanismo de autocopia que tiene como resultado anular la resistencia antibiótica de procariontes; lo han llamado "*pro-active*" *genetic system* o sistema "*pro-activo*" genético (Pro-AG). Este sistema de *gene drives* Pro-AG puede copiar de manera eficiente un gRNA funcional junto a la secuencia homóloga a la zona de corte de Cas9. Además es capaz de inactivar genes de resistencia a antibióticos presentes en plásmidos con un gran número de copias, con una alta eficiencia. Esto significa que la dosis de gRNA se verá aumentada, es decir, hay una amplificación en la retroalimentación positiva o *feedback* positivo. Gracias a este tratamiento antimicrobiano, se consigue eliminar de manera específica el o los genes que codifican la resistencia de forma específica, sin afectar a otras poblaciones microbianas [22].

Además, a parte de plásmidos, también es posible que se puedan editar en genes presentes en los cromosomas bacterianos o adaptarlos para introducir cargos funcionales en la secuencia de gRNA. Debido a todo ello, este sistema podrá ser utilizado como herramienta en la ingeniería y manipulación de bacterias en un futuro, tanto en biotecnología como en biomedicina [22].

5.3 Consideraciones éticas y regulatorias de los Gene Drives

El rápido desarrollo de la tecnología CRISPR-Cas9 en los últimos años ha dado lugar a aplicaciones de edición genética hasta entonces impensables. Muchas de ellas suscitan urgentemente cuestiones éticas objetivas para proporcionar y garantizar la seguridad de su empleo. En nuestro caso, la regulación de la aplicación que nos incumbe es principalmente la de los *gene drives* y los organismos modificados por ellos [37].

A parte de las estrategias ideadas para garantizar la seguridad de los *gene drives*, debemos tener en cuenta las implicaciones bioéticas que pueden surgir a la hora de alterar poblaciones, ya que esto podría producir cambios drásticos en los ecosistemas que podrían significar, por ejemplo, la aparición de nuevas plagas y enfermedades. Además, esta tecnología puede ser utilizada con fines de beneficio cuestionable, lo que añade una mayor necesidad de establecer medidas estrictas que garanticen la seguridad y regulación de los experimentos y de las aplicaciones de la técnica [37].

Para que en la realización de los ensayos pertinentes se respeten las normas éticas, una propuesta es realizar solicitudes para que toda comunidad que sea susceptible a los cambios producidos por ese *gene drive* de su consentimiento siempre que sea posible y el ensayo lo requiera. Para que esto se pueda hacer, hay que considerar y revisar las guías de ética en investigación para la correcta elaboración de un consentimiento informado y que traten aquellos aspectos relacionados con la ética de los estudios para modificar poblaciones [38]. La Organización Mundial de la Salud (OMS, WHO) publicó una Guía para la investigación con mosquitos modificados genéticamente. En ella habla de tres niveles posibles para el proceso de autorización de consentimiento para ensayos con mosquitos modificados: el consentimiento a nivel personal, la autorización a nivel de comunidad y el permiso y regulación por parte del gobierno [38,39]. Otra propuesta es conseguir los objetivos gracias al compromiso y la responsabilidad social de todas las partes implicadas, lo que será clave para generar confianza y facilitar la realización de dicha investigación. Además, mediante el compromiso se consigue satisfacer cuatro de los objetivos de la ética: mejorar la protección, mejorar los beneficios, crear legitimidad y compartir responsabilidad. Se conseguirá por tanto, una mayor fidelidad, credibilidad y vinculación de todo aquel implicado. Es preferible que se disponga de un grupo asesor compuesto por expertos externos al proyecto para aumentar el nivel de compromiso y confianza [38].

Todas las investigaciones han de realizarse con total transparencia y han de incluir informes con los posibles impactos que puedan derivar del empleo de lo estudiado [13]. Es esencial que las comunidades entiendan los aspectos políticos, sociales y económicos [38]. La decisión de si emplearlo o no, ha de basarse siempre en los posibles riesgos/beneficios de un *gene drive* en concreto. Es decir, cada *gene drive* se tiene que tratar por separado, viendo sus características y su capacidad para poder conseguir los resultados deseados, además de los impactos que pueda tener en otras especies, en los ecosistemas y en la vida de los seres humanos. Será trabajo de los propios investigadores realizar modelos de predicción que puedan estar al alcance de todos y en un formato claro y fácil de entender [13,39].

También debe tenerse en cuenta que los *gene drives*, al ser sistemas diseñados para poder difundirse por las poblaciones, no entienden de límites ni fronteras. Es por ello que se necesitan regulaciones multilaterales que incluyan acuerdos internacionales, protocolos, tratados, pactos y aceptación por parte de los países próximos [39].

6 CONCLUSIONES

El rápido desarrollo de la tecnología CRISPR-Cas9 ha dado lugar a numerosas aplicaciones en el campo de la ciencia que pueden tener como resultado un beneficio en la salud mundial. Gracias a este descubrimiento, los investigadores han podido llevar a cabo procesos en el laboratorio de manera rápida y efectiva que anteriormente requerían muchos recursos y tiempo. Este sistema ha desbancado a técnicas como los dedos de Zinc o TALENs en muchas situaciones.

El empleo de la tecnología CRISPR-Cas9 para la elaboración y diseño de *gene drives* supone un avance revolucionario en la genética. Este sistema es capaz de alterar poblaciones enteras gracias a que su herencia se ve favorecida en aproximadamente el 100% de los casos, lo que hace que sea ideal para abordar temas como las enfermedades transmitidas por vectores, por ejemplo, la malaria o la resistencia a antibióticos. Se han desarrollado estrategias de diseño basadas en el proceso de *homing* para la inactivación de genes (*knock-out*) o para la introducción de genes (*knock-in*) o la posibilidad de crear construcciones incluidas en los cromosomas Y. Estos tipos de *gene drives* han resultado ser satisfactorios en el laboratorio, sin embargo, para que puedan ser liberados, deben cumplir una serie de requisitos que garanticen su seguridad. Además, es por ello que, los laboratorios han de cumplir una serie de medidas de control y contención mediante el empleo de diferentes barreras, tanto biológicas como físicas, para poder llevar a cabo los experimentos. Los investigadores siguen desarrollando nuevas construcciones para poder solventar todos esos problemas, como es el caso de los *Daisy drives*, unos *gene drives* más seguros y prometedores.

Los aspectos bioéticos derivados han de ser tratados también con cautela y teniendo en cuenta todos los efectos que pueda tener un determinado *gene drive* sobre los ecosistemas. Siempre se ha de usar esta técnica para proporcionar un beneficio a la población. Es imprescindible que los investigadores lleven a cabo sus experimentos con total transparencia y que se realicen protocolos y pactos por parte de los organismos superiores que garanticen la seguridad y regulación de la técnica.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014 [Consultado feb 2020] ; 346 (6213): 1258096.
2. Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* [Internet]. 2000 [Consultado feb 2020]; 36(1): 244-246. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10760181>
3. Román González E, Prieto Prieto D, Pla Alonso J. El sistema CRISPR como herramienta en biotecnología. En: Martín Brieva H. *Fundamentos de biotecnología farmacéutica*. España: Dextra; 2018. p. 129-142.
4. McDade J. What is CRISPR?. En: Addgene. *CRISPR 101: A Desktop Resource*. 2016. p. 11-29.
5. Tang Y, Fu Y. Class 2 CRISPR/Cas: an expanding biotechnology toolbox for and beyond genome editing. *Cell Biosci* [Internet]. 2018 [Consultado feb 2020]; 8:59. Disponible en: <https://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13578-018-0255-x>
6. Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Franklin B, Kellner MJ *et al*. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science* [Internet]. 2017 [Consultado feb 2020]; 358(6366):1019-1027. Disponible en: <https://science.sciencemag.org/content/358/6366/1019>
7. Broughton JP, Deng X, Yu G *et al*. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2020 [Consultado may 2020]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41587-020-0513-4>

8. Nguyen TM, Zhang Y, Pandolfi PP. Virus against virus: a potential treatment for 2019-nCov (SARS-CoV-2) and other RNA viruses. *Cell Res* [Internet]. 2020 [Consultado may 2020]; 30 (3): 189-190. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7054296/>
9. Jiang F, Doudna. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys* [Internet]. 2017 [Consultado mar 2020]; 46:505529. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
10. Kaulich M, Dowdy SF. Combining CRISPR/Cas9 and rAAV Templates for Efficient Gene Editing. *Res Gate* [Internet]. 2015 [Consultado mar 2020]. Disponible en: file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/Kaulich-2015-CombiningCRISPR_Cas.pdf
11. Reis *et al.* CRISPR/Cas9 & Targeted Genome Editing: New Era in Molecular Biology. *NEB* [Internet]. 2014 [Consultado mar 2020]. Disponible en: <https://international.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/crispr-cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology>
12. Committee on Gene Drive Research in Non-Human Organisms: Recommendations for Responsible Conduct; Board on Life Sciences; Division on Earth and Life Studies; National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. *Gene Drives on the Horizon: Advancing Science, Navigating Uncertainty, and Aligning Research with Public Values.* [Internet] Washington (DC): National Academies Press (US); 2016 [Consultado mar 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK379282/>
13. Esvelt KM, Smidler AL, Catteruccia F, Church GM. Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. *Elife* [Internet]. 2014 [Consultado mar 2020]; 3:e03401. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4117217/>
14. Noguez-Moreno R, Fernández-Salas I, Cime-Castillo J, Merino-Pérez E, Conde R *et al.* Nuevas estrategias de control vectorial: mosquitos transgénicos. *F Entom Mex* [Internet]. 2017 [Consultado mar 2020]; 3(3): 114-138. Disponible en: http://www.folia.socmexent.org/revista/Num%202017_3/FEM_ns_114-138.pdf
15. Burt A. Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations. *Proc R Soc Lond B* [Internet]. 2003 [Consultado mar 2020]; 270:921-928. Disponible en: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2002.2319>
16. Scudellari M. Hijacking evolution. *Sp. Nat. Lim.* [Internet]. 2019 [Consultado mar 2020]; 571:160-162. Disponible en: <https://media.nature.com/original/magazine-assets/d41586-019-02087-5/d41586-019-02087-5.pdf>
17. Raban RR, Marshall JM, Akbari OS. Progress towards engineering gene drives for population control. *Journal Exper Bio* [Internet]. 2020 [Consultado mar 2020]; 223. Disponible en: https://jeb.biologists.org/content/jexbio/223/Suppl_1/jeb208181.full.pdf
18. Champer J, Liu J, Oh SY *et al.* Reducing resistance allele formation in CRISPR gene drive. *Pro Natl Acad Sci USA* [Internet]. 2018 [Consultado mar 2020]; 115(21): 5522-5527. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6003519/>
19. Hayirli TC, Martelli PF. Gene drives as a response to infection and resistance. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2019 [Consultado mar 2020]; 12: 229-234. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6336018/>
20. Min J, Smidler AL, Najjar D, Esvelt KM. Harnessing gene drive. *Journal Respon Innov* [Internet]. 2019 [Consultado mar 2020]; 5(1): 40-65. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23299460.2017.1415586>
21. Hayes KR, Hosack GR, Dana GV, Foster SD, Ford JH, Thresher R *et al.* Identifying and detecting potentially adverse ecological outcomes associated with the release of gene-drive modified organisms. *Journal Respon Innov* [Internet]. 2018 [Consultado abr 2020]; 5(1): 139-158. Disponible en: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23299460.2017.1415585?utm_source=TrendMD&utm_medium=cpc&utm_campaign=Journal_of_Responsible_Innovation_TrendMD_0
22. Valderrama JA, Kulkarni SS, Nizet V *et al.* A bacterial gene-drive system efficiently edits and inactivates a high copy number antibiotic resistance locus. *Nat Commun* [Internet]. 2019 [Consultado abr 2020]; 10:5726. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-13649-6>

23. WHO: World Health Organization [Internet]. Vector-borne diseases. 2020 [Consultado abr 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
24. WHO: World Health Organization [Internet]. Vector control. 2020 [Consultado abr 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/vector-control/en/>
25. WHO: World Health Organization [Internet]. Malaria. 2020 [Consultado abr 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
26. Burt A, Coulibaly M, Crisanti A, Diabate A, Kayondo JK. Gene drive to reduce malaria transmission in sub-Saharan Africa. *Journal Respons Innov* [Internet]. 2018[Consultado abr 2020]; 5(1): 66-80. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23299460.2017.1419410?scroll=top&needAccess=true>
27. Hammond A, Galizi R, Kyrou K, Simoni A, Siniscalchi C, Katsanos D *et al.* A CRISPR-Cas9 Gene Drive System Targeting Female Reproduction in the Malaria Mosquito Vector *Anopheles gambiae*. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2016 [Consultado abr 2020]; 34(1): 78–83. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nbt.3439.pdf>
28. Chan YS, Naujoks DA, Huen DS, Russell S. Insect Population Control by Homing Endonuclease-based Gene Drive: An Evaluation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* [Internet]. 2011 [Consultado abr 2020]; 188 (1):33–44. Disponible en: <https://www.genetics.org/content/188/1/33>
29. Chan YS, Huen DS, Glauert R, Whiteway E, Russell S. Optimising Homing Endonuclease Gene Drive Performance in a Semi-refractory Species: The *Drosophila melanogaster* Experience. *Plos One* [Internet]. 2013 [Consultado abr 2020];8(1). Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0054130>
30. Windbichler N, Menichelli M, Papathanos PA, Thyme SB, Li H, Ulge UY *et al.* A Synthetic Homing Endonuclease-based Gene Drive System in the Human Malaria Mosquito. *Nature* [Internet]. 2011 [Consultado abr 2020]; 473: 212–215. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nature09937>.
31. Beaghton A, Hammond A, Nolan T, Crisanti A, Godfray HCJ, Burt A. Requirements for Driving Antipathogen Effector Genes into Populations of Disease Vectors by Homing. *Genetics* [Internet]. 2017[Consultado abr 2020];205(4):1587–1596. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5378115/>
32. Galizi R, Hammond A, Kyrou K *et al.* A CRISPR-Cas9 sex-ratio distortion system for genetic control. *Sci Rep* [Internet]. 2016 [Consultado abr 2020]; 6: 31139. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/srep31139>
33. Bernardini F *et al.* Site-specific genetic engineering of the *Anopheles gambiae* Y chromosome. *PNAS* [Internet]. 2014 [Consultado abr 2020]; 111(21): 7600-7605. Disponible en: <https://www.pnas.org/content/pnas/111/21/7600.full.pdf>
34. Oberhofer G, Ivy T, Hay BA. Cleave and Rescue, a novel selfish genetic element and general strategy for gene drives. *PNAS* [Internet]. 2019 [Consultado abr 2020]; 116(13): 6250-6259. Disponible en: <https://www.pnas.org/content/116/13/6250>
35. Noble C, Min J, Olejarz J, Buchthal J, Chavez A, Smidler AL *et al.* Daisy-chain gene drives for the alteration of local populations. *PNAS* [Internet]. 2019 [Consultado abr 2020]; 116(17): 8275-8282. Disponible en: <https://www.pnas.org/content/116/17/8275>
36. WHO: World Health Organization [Internet]. Resistencia a los antibióticos. 2018. [Consultado abr 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
37. Gómez-Tatay L, Aznar J. CRISPR-Cas9. El mayor avance en técnicas de edición genética requiere una reflexión ética. *Cuadernos de Bioética* [Internet]. 2019 [Consultado abr 2020]; 30 (99):171-185. Disponible en: <http://aebioetica.org/revistas/2019/30/99/171.pdf>
38. Singh JA. Informed consent and community engagement in open field research: lessons for gene drive science. *BMC Med Ethics* [Internet]. 2019 [Consultado abr 2020]; 20:54. Disponible en: <https://bmcomedethics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12910-019-0389-3>
39. WHO/TDR, FNIH. Guidance Framework for testing genetically modified mosquitoes: World Health Organization. [Internet]. 2014. [Consultado abr 2020]. Disponible en: https://www.who.int/tdr/publications/year/2014/Guidance_framework_mosquitoes.pdf