

La revolución CRISPR también en la granja

LLUÍS MONTOLIÚ

Centro Nacional de Biotecnología, Madrid.
Investigador científico del CSIC y del CIBERER-ISCIII.

¿Quién nos iba a decir que las mismas armas que las bacterias usan para defenderse de los virus servirían también para editar nuestros genomas? La revolución causada por las herramientas CRISPR no tiene apenas precedentes, por su magnitud, por su impacto y relevancia y por la rapidez con la que se ha extendido por todos los laboratorios del mundo. La aplicación de estrategias basadas en CRISPR para la edición de genomas de cualquier especie animal, también en la granja, es ya una realidad. En este artículo revisaré por qué las CRISPR son una revolución en biología y desarrollaré que impacto han tenido también en el mundo veterinario, en la granja.

LOS ORÍGENES BACTERIANOS DE LAS HERRAMIENTAS CRISPR

Efectivamente, los microbiólogos saben desde hace casi 30 años de la existencia de unas secuencias repetitivas de ADN existentes en el genoma de bacterias (Ishino y col. 1987). En España, dichas repeticiones también fueron descubiertas en las arqueas que habitan las salinas de Alicante. Con esos microorganismos fue con quienes Francisco J. M. Mojica (profesor de la Univer-



sidad de Alicante) realizó su tesis doctoral a principios de los años 90. Sin embargo, a diferencia de las publicaciones iniciales, que se limitaron a describir la existencia de curiosas repeticiones de secuencias de ADN en bacterias, que por su diversidad servían para distinguir cepas bacterianas, Mojica decidió seguir investigándolas. A él le debemos los primeros análisis funcionales de estas secuencias (Mojica y col., 1993), los primeros catálogos de las mismas y los primeros intentos de analizar su estructura y tratar de comprender para qué podían servirles a las bacterias (Mojica y col., 2000). Tras analizar la estructura de muchas de estas repeticiones, separadas por otras secuencias de similar tamaño, pero únicas, lla-

madas espaciadores, se dio cuenta de la regularidad y características comunes a todas ellas y propuso un nombre para describirlas. Y así fue como a finales de 2001 Mojica propuso denominarlas como CRISPR (del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, que podríamos traducir al español como "repeticiones cortas y palindrómicas agrupadas y espaciadas regularmente"). El acrónimo CRISPR se usó por vez primera en una publicación en 2002 (Jansen y col., 2002) y rápidamente fue adoptado universalmente, siendo uno de los términos actualmente más usados en biología.

En la primera década del siglo actual fue cuando las secuencias CRISPR fueron analizadas en deta-

lle, y cuando se descubrió la existencia de proteínas asociadas Cas (del inglés *CRISPR associated proteins*) y de pequeñas moléculas de ARN que parecían derivar de las agrupaciones CRISPR. Aunque su función seguía siendo un misterio. De nuevo fue Mojica quien primero se percató, tras revisar miles de estas secuencias, que los elementos espaciadores, en algunos casos, eran homólogos a secuencias derivadas del ADN de bacteriófagos, los virus que infectan a las bacterias. Mojica realizó una observación esencial que a la postre daría la pista final para entender el mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas. Se dio cuenta que aquellas bacterias que portaban en su genoma secuencias espaciadoras similares al genoma de determinados virus no resultaban infectadas por estos mismos virus. Esto le llevó a proponer que las secuencias CRISPR podrían formar parte de algún sistema inmune presente en las bacterias (Mojica y col., 2005). Dos años más tarde otros investigadores verificaron experimentalmente su propuesta y quedó establecido que el sistema CRISPR-Cas representa una de las estrategias de defensa que usan las bacterias para zafarse de virus, plásmidos y otros elementos genéticos externos que regularmente les visitan.

Sin embargo no fue hasta la década actual de este siglo cuando las CRISPR dieron un salto cualitativo, pasando de ser objeto de estudio de microbiólogos a recibir la atención actual de investigadores de todos los campos de ciencias de la vida y de la salud. Fueron dos investigadoras, Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier, quienes primero percibieron que el mecanismo mediante el cual los sistemas de defen-

sa CRISPR-Cas luchaban contra los virus en bacterias podía adaptarse y convertirse en un eficaz sistema de edición de genomas de cualquier organismo (Jinek y col., 2012).

¿CÓMO FUNCIONA EL SISTEMA CRISPR-CAS PARA EDITAR SECUENCIAS GENÉTICAS?

El sistema CRISPR-Cas está compuesto esencialmente de dos elementos: una proteína Cas (habitualmente Cas9, obtenida de la bacteria patógena *Streptococcus pyogenes*) y una pequeña molécula de ARN, que contiene un fragmento complementario a la secuencia diana que se desea modificar y otro fragmento que interacciona con la proteína Cas9. La molécula de ARN se llama sgRNA (del inglés *synthetic guide RNA*) y por eso se la conoce generalmente como "guía", dado que sirve para dirigir a la proteína Cas9, una endonucleasa que corta las dos cadenas del ADN, a una localización determinada del genoma. Una vez Cas9 ha cortado el genoma en una ubicación específica se ponen en marcha los sistemas endógenos de reparación para restaurar la continuidad física del cromosoma. En primer lugar se intentan eliminar y añadir nucleótidos alrededor de la zona del corte, buscando alguna homología que permita unir las cadenas cortadas y sellar la cicatriz causada en el genoma por Cas9. Este proceso de re-

paración (denominado NHEJ, del inglés *non-homologous end-joining*) comete habitualmente errores y, por ello, el resultado final suele ser la rotura de la pauta de información genética codificada, es decir, la inactivación del gen en cuestión. Simplemente dirigiendo un corte en el ADN de forma muy específica conseguimos que el gen diana deje de funcionar. Nunca antes había sido tan fácil eliminar un gen.

Por otro lado, si proporcionamos al sistema un tercer elemento, un ADN molde externo con secuencias homólogas a las regiones colindantes al corte, y que puede contener nueva información, podemos lograr que la reparación del corte progrese a través de otro mecanismo, HDR (del inglés *homology-directed repair*) mediante el cual, debido a la homología de secuencias, se use el ADN molde para reparar la cicatriz y se consiga introducir nueva información genética en el genoma. Este poderoso sistema de edición genómica permite corregir mutaciones existentes, introducir mutaciones precisas en genes o substituir unas secuencias por otras y es probablemente la utilización más demandada de los sistemas CRISPR-Cas, debido a sus implicaciones en la generación de modelos animales y en estrategias de terapia génica. La utilización de las herramientas bacterianas CRISPR-Cas para modificar genomas de organismos ha sido, desde



La facilidad en la obtención de los reactivos necesarios para aplicar las técnicas CRISPR-Cas y su evidente simplicidad han sido fundamentales para la rapidísima universalización de estos métodos.



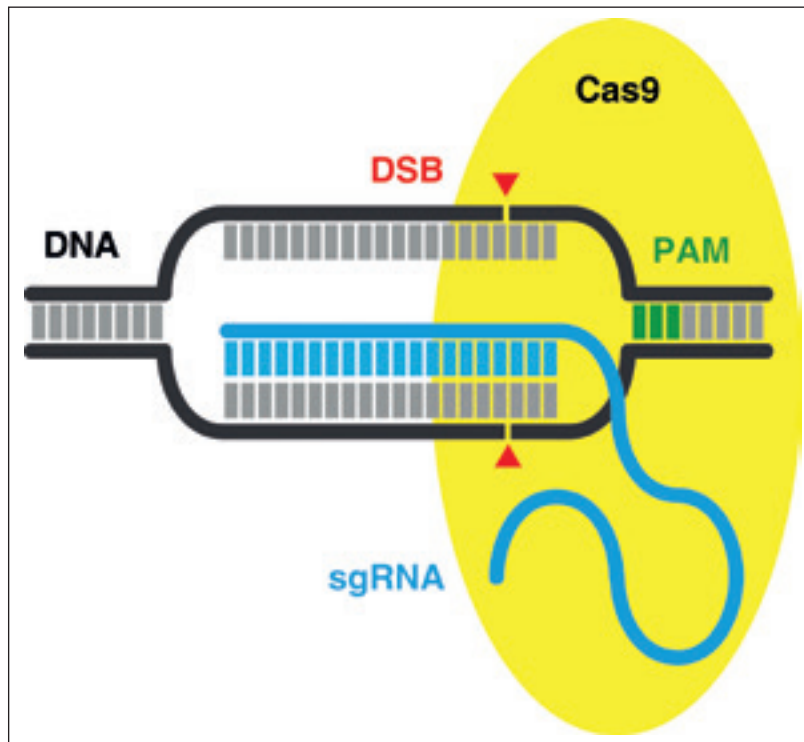


Figura 1. El sistema dual de edición genómica CRISPR-Cas con su ARN guía (sgRNA, en azul) emparejado con la cadena complementaria del ADN, y su endonucleasa (Cas9, en amarillo). Se indican los sitios del corte de ADN en doble cadena (DSB, triángulos rojos) y la secuencia adyacente al proto-espaciador (PAM, en verde).

su inicio, una verdadera revolución tecnológica que no ha hecho más que crecer (Doudna y Charpentier, 2014).

Son ya numerosísimas las aplicaciones derivadas del uso de CRISPR-Cas en la modificación genética dirigida de células y animales, también en agricultura y ganadería, en animales de granja. La facilidad en la obtención de los reactivos necesarios para aplicar las

técnicas CRISPR-Cas y su evidente simplicidad han sido fundamentales para la rapidísima universalización de estos métodos. A diferencia de lo que había venido ocurriendo en décadas anteriores con las técnicas tradicionales de modificación genética, habitualmente solo al alcance de unos pocos equipos muy especializados y expertos en su aplicación, el uso de las herramientas CRISPR-Cas no requiere

tanta especialización ni equipos sofisticados. La preparación de las pequeñas moléculas de ARN, específicas del gen que se desea modificar, y de la proteína Cas9 pueda abordarse a través de protocolos experimentales sencillos o encargarse comercialmente. Por ello, en estos momentos está al alcance de cualquier laboratorio, instituto o empresa el diseñar un experimento con CRISPR-Cas para modificar uno o varios genes en células o en animales. Solamente se requieren los servicios de una unidad de transgénesis, que se encargue de microinyectar los reactivos CRISPR-Cas a los embriones de la especie elegida. La robustez y fiabilidad de la técnica se encargan del resto.

MODIFICACIÓN GENÉTICA DE ANIMALES MEDIANTE CRISPR

A pesar de que el sistema CRISPR-Cas se dio a conocer como una estrategia eficaz para editar genomas de cualquier organismo en el verano de 2012, no fue hasta el mes de mayo de 2013 cuando descubrimos sus posibilidades reales para la modificación genética de animales. El laboratorio de Rudolf Jaenisch demostró, usando ratones de laboratorio, como las herramientas CRISPR-Cas podían usarse para producir ratones con mutaciones específicas en varios genes a la vez, obtenidas simultáneamente (Wang y col., 2013). Esta publicación pionera dio un vuelco a la manera clásica de generar animales modificados genéticamente, con técnicas que en muchos casos llevaban más de 30 años sin sufrir modificaciones importantes. Igualmente, este trabajo ilustró, de una manera clara, la insospechada potencia de estas nuevas técnicas. La

Las estrategias CRISPR-Cas permiten la modificación de los genes directamente en el lugar endógeno que ocupan en el genoma, sin afectar al resto de los genes, de forma muy específica. Esta especificidad es el mayor de los éxitos de las aproximaciones experimentales basadas en CRISPR-Cas para la obtención de nuevos animales con su genoma modificado.

obtención anterior de un modelo animal con cinco mutaciones en otros tantos genes representaba un desafío muy importante que requería varios años de trabajo duro y dedicado, y algo de suerte, antes de poder obtener el animal deseado con múltiples mutaciones. Sin embargo Jaenisch demostró que en apenas un par de meses, los que se necesitan para producir ratones tras la microinyección de embriones, era posible detectar animales portadores de mutaciones en los cinco genes planeados.

Tras la publicación inicial del laboratorio de Jaenisch aparecieron muchas otras, principalmente en ratones, aunque también en pez cebra, en las que se demostraba una y otra vez la diversidad, versatilidad, especificidad y fiabilidad de las aproximaciones para la modificación genética de animales basadas en las herramientas CRISPR-Cas (Seruggia y Montoliu, 2014).

Muy pronto estas técnicas suscitaban el interés de otros investigadores que usan animales de mayor tamaño que los roedores en sus proyectos, como son los animales domésticos de granja. Y así empezaron a aparecer estudios en los que se documentaba el éxito de la aplicación de las herramientas CRISPR-Cas en la modificación del genoma de cerdos, ovejas, vacas, primates no humanos, perros y otras especies animales.

En el primer trimestre de 2014 nacieron los primeros cerdos con genes inactivados mediante una estrategia basada en CRISPR-Cas (Hai y col., 2014). En los meses siguientes diversos equipos demostraron la efectividad de esta nueva aproximación tecnológica para la modificación genómica en el cerdo con experimentos exitosos en

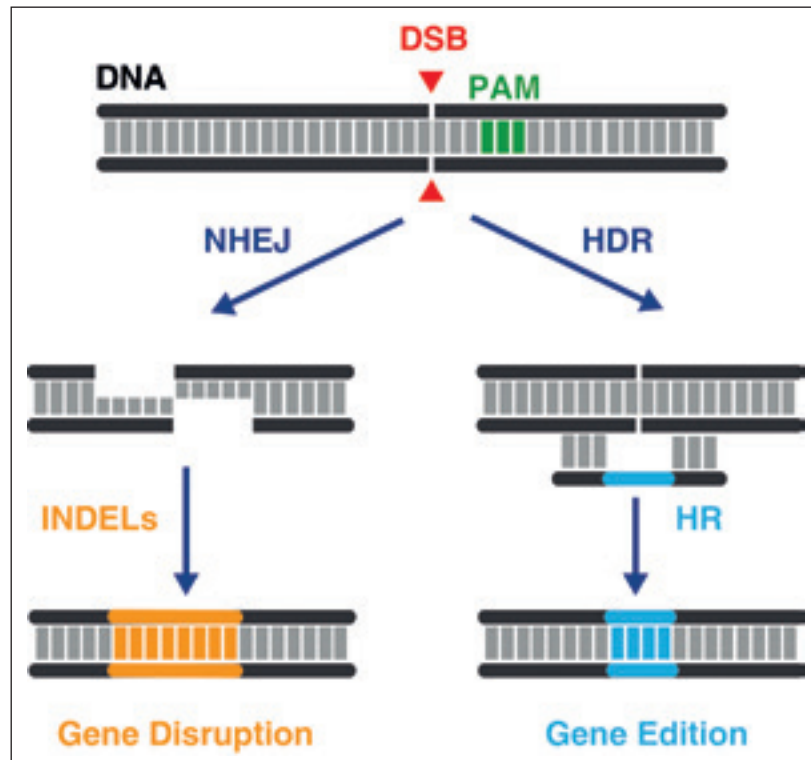


Figura 2. Mecanismos de reparación del corte de ADN de doble cadena (DSB). Izquierda: la vía preferida es la NHEJ (non-homologous end-joining) que mediante inserciones-delecciones (INDELS) acaba reparando el corte y produciendo disrupción génica. Derecha: en presencia de ADN molde con regiones de homología adyacentes al DSB se promueve la sustitución de secuencias por otras externas, mediante HDR (homology-directed repair), lo cual conduce a la edición génica.

los que, por ejemplo, se describía la sustitución de secuencias genéticas con objetivos biomédicos, esto es, la obtención de albúmina humana a partir del gen de la albúmina porcina (Peng y col., 2015); o el desarrollo de un nuevo modelo animal de la enfermedad de Parkinson mediante la inactivación simultánea de tres genes (PARKIN, DJ-1 y PINK1) cuyas mutaciones se han asociado a esta patología neurodegenerativa en humanos (Wang y col., 2016).

A continuación destacaré dos ejemplos que creo son representativos, en cerdos y en ovejas, de los avances que se han producido y seguro se producirán tras la adopción de las técnicas CRISPR-Cas por parte de la comunidad investigadora, veterinaria y ganadera con interés en grandes animales de granja.

CERDOS MÁS SEGUROS PARA XENOTRANSPLANTACIÓN OBTENIDOS CON CRISPR-CAS

Hace ya bastantes años se propuso la idea de utilizar órganos porcinos para suplir la falta de órganos humanos que necesitan todos los pacientes a la espera de ser transplantados. Los órganos provenientes de donaciones post-mortem y, en algunos casos, procedentes de donantes vivos no son suficientes para cubrir la demanda actual. Por ello varios grupos investigadores pensaron en el cerdo, un animal que por tamaño, metabolismo y fisiología podía proveer de órganos de forma transitoria a los pacientes más graves, a la espera de que obtuvieran su trasplante de órgano humano definitivo. Al proceso de usar órganos de otra especie en humanos se le denominó



Figura 3. Equipo investigador en Uruguay responsable de la mutación del gen de la miostatina en ovejas. El tercero de pie por la izquierda es Alejo Menchaca. La tercera de pie por la derecha es Martina Crispo.

xenotransplatación. Sin embargo, el sistema inmunitario humano rechazaría de inmediato el órgano porcino al considerarlo extraño, no propio, y por ello se iniciaron una serie de modificaciones genéticas en los genes del cerdo encaminadas a camuflar las células porcinas, para intentar que no se suscitara la respuesta inmune humana.

Sin embargo, hace algunos años, el progreso en xenotransplatación quedó en suspenso al descubrirse que el genoma del cerdo contenía retrovirus (PERV, del inglés *porcine endogenous retroviruses*), que no causaban problema en el cerdo pero que podían reactivarse y causar problemas en situaciones de estrés, como por ejemplo cuando las células o los órganos porcinos se pusieran en contacto con la circulación sanguínea humana. El año pasado el laboratorio de George Church aportó una solución a este grave problema, utilizando una estrategia de CRISPR-Cas. Utilizando estas nuevas herramientas consiguieron inactivar todas y cada una de las 62 copias de PERV existentes en el genoma del cerdo, en un modelo celular porcino (Yang y col., 2015). Este sorprendente éxito

demostraba no solo las enormes posibilidades de las herramientas CRISPR-Cas sino que también establecía un nuevo record en el campo de inactivación simultánea de secuencias genéticas.

La obtención de células porcinas carentes de PERV es un avance muy significativo, teniendo en cuenta que la mayoría de los cerdos modificados genéticamente que se obtienen hoy en día derivan de transferencia nuclear a partir de células somáticas, a través del protocolo denominado SCNT (del inglés *somatic cell nuclear transfer*). De hecho, la combinación de estrategias SCNT y CRISPR-Cas se espera que produzca pronto sus frutos, con nuevos cerdos con múltiples alteraciones genéticas precisas, más adecuados para la xenotransplatación y, sobre todo, más seguros para su futuro uso en pacientes humanos (Niemann y Petersen, 2016).

OVEJAS CON MAYOR MASA MUSCULAR OBTENIDAS MEDIANTE CRISPR-CAS

Es bien conocido que el gen de la miostatina codifica para una proteína que limita el crecimiento

del tejido muscular. La miostatina es pues un regulador negativo de la cantidad de fibras musculares. La presencia de miostatina determina una contención en el desarrollo de los músculos de un animal, mientras que su ausencia, bien sea por una mutación natural, espontánea, o dirigida, determina un aumento significativo de la masa muscular, al desaparecer el factor que se encarga de regularla. En ganado bovino se conoce las razas *Belgian Blue* y *Piamontesa*, muy musculosas y de gran tamaño, cuyo aspecto es debido a mutaciones en el gen de la miostatina que causan la notoria hiperplasia muscular, y el acúmulo de músculo magro, con menor contenido de grasa y, por ello, con un evidente potencial gastronómico, aunque estos animales requieran mayores cuidados específicos (p.e. partos por cesárea, mayor tiempo de engorde hasta sacrificio en matadero).

En ovejas se conoce la raza *Texel*, de origen británico, que igualmente presenta mutaciones en el gen de la miostatina, produciendo animales más musculosos y con mayor cantidad de masa muscular. Esta alta calidad de la carne no está asociada a la calidad de la lana que podría obtenerse de estas ovejas, que es de muy baja calidad y es por lo tanto desechada. Por el contrario, las diversas variantes de la raza ovina *Merino*, de origen australiano, presentan una altísima calidad en la lana, pero sin embargo no producen animales de tamaño importante y su carne no tiene el mismo valor. Así pues, tras nueve mil años de mejora genética tradicional y domesticación ovina los ganaderos han conseguido ovejas que o bien son útiles por su carne (pero su lana no tiene valor), o lo

son por su lana (pero entonces su carne carece de valor).

¿Sería posible obtener una nueva raza de ovejas en la que coincidieran ambos caracteres, alta calidad de carne y de lana? Esta fue la premisa de partida de un equipo de investigadores en Uruguay, liderados por Alejo Menchaca (del Instituto de Reproducción Animal de Uruguay) y Martina Crispo (del Instituto Pasteur de Montevideo). Estos investigadores usaron embriones de ovejas de la raza *Merino Superfino* (derivadas de la *Merino* australiana), la que mayor calidad de lana produce del mundo, la más fina y de más alto valor. Utilizando herramientas CRISPR-Cas dirigidas contra el gen de la miostatina lograron inactivarlo en estas ovejas y obtuvieron animales más musculados, de mayor tamaño, con mayor masa muscular, demostrando que es posible combinar en un solo experimento, y con éxito, dos características de interés ganadero que durante miles de años no habían podido ser combinadas por los métodos tradicionales (Crispo y col., 2015). Igualmente reseñable fue la eficiencia del proceso. De 53 embriones de oveja microinyectados y transferidos para su gestación lograron obtener 22 corderos, de los cuales 10 de ellos presentaban mutaciones en el gen de la miostatina. En ocho de los diez corderos localizaron mutaciones bialélicas y, en cinco de ellos, encontraron que las mutaciones aparecían en homocigosis, con inserciones y deleciones (INDELs) que conducían a codones de fin de traducción y a la obtención de proteínas truncadas, de menor tamaño, no funcionales (Crispo y col., 2015).



Figura 4. Dos corderos de la raza *Superfino Merino*. El de arriba es un cordero silvestre, no modificado. El cordero de abajo su genoma ha sido editado mediante herramientas CRISPR-Cas y se ha inactivado el gen de la miostatina, lo cual provoca un incremento de la masa muscular (se aprecia mejor en los cuartos traseros). Estos corderos se describen en el artículo Crispo y col. (2015).

PERSPECTIVAS: LOS ANIMALES DEL FUTURO

Las herramientas CRISPR-Cas, derivadas de bacterias, han revolucionado la manera con la que generamos actualmente los animales modificados genéticamente. Se han convertido en una estrategia versátil, eficaz y robusta para la obtención de animales mutantes, de interés en biomedicina o en salud animal, o para la edición de cualquier genoma animal a voluntad del investigador. Esta rebelión (como la descrita por George Orwell en 1945 en forma de fábula mordaz sobre los tiranos en política) también ha llegado a la granja. Las estrategias basadas en CRISPR-Cas permiten trasladar nuevas características genéticas a un animal, interactuando directamente sobre el gen que se pretende modificar, dejando intacto el resto del genoma. Esta gran especificidad y la fabulosa rapidez con la que se obtienen las alteracio-

nes genómicas deseadas, diferencia a las aproximaciones CRISPR-Cas de los métodos tradicionales hasta ahora utilizados.

Las herramientas CRISPR-Cas representan la tercera generación de métodos innovadores desarrollados en los últimos años que utilizan mecanismos muy similares, globalmente conocidos como “nucleasas de edición genómica”. La primera generación, que apareció en 2009, utilizaba nucleasas unidas a dedos de zinc (ZFN, del inglés *zinc-finger nuclease*). La segunda generación, aparecida en 2011, estaba basada en las proteínas TALEN (del inglés *transcription activator-like effector nuclease*). En ambos casos, ZFN y TALEN, la estrategia era similar a las CRISPR-Cas, esto es: dirigir una endonucleasa a una secuencia específica del genoma para que realice un corte de doble cadena cuya reparación por los sistemas propios celulares conduzca a la aparición de una mutación o a la sustitución de

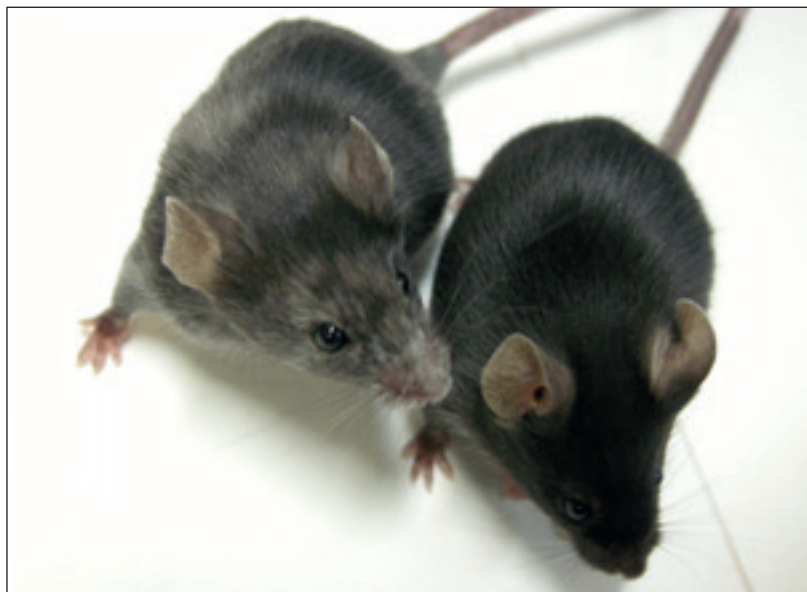


Figura 5. Ratones con el genoma editado mediante CRISPR utilizados en investigación de enfermedades raras en el laboratorio del Dr. Lluís Montoliu como modelo animal de albinismo”, y citar nuestra publicación: Seruggia et al. 2015).

la secuencia original por una externa, si ésta se ofrece al sistema como molde. Las ZFN son un sistema cerrado, propietario de una empresa, que debe encargarse de seleccionar las mejores para poder utilizarlas con éxito. Las TALEN, a pesar de ser un sistema abierto y más versátil, requieren de múltiples validaciones hasta encontrar una pareja que dirija el corte a la secuencia genómica planeada. En cambio, las CRISPR-Cas representan la aproximación experimental más sencilla, versátil, robusta, rápida y eficaz y por ello han triunfado y acabado desplazando las dos versiones de nucleasas de edición anteriores (Seruggia y Montoliu, 2014).

Sin embargo, también en el mundo veterinario, es necesario re-aseñar algunos de los éxitos del uso de TALEN y ZFN en la introgresión de alelos con características especiales en animales de granja. Por ejemplo, en bovino, una estrategia experimental basada en TALEN consiguió introducir en células las mutaciones asociadas al alelo *Polled*

(derivado de razas sin cuernos) en el alelo *HORNED* (característico de las razas con cuernos). La obtención posterior de vacas con el alelo *Polled*, mediante SCNT de las células con el genoma editado, evitaría la necesidad de descornar a las reses para su estabulación y manipulación con mayor seguridad, con el consiguiente beneficio también en bienestar animal (Tan y col. 2013).

En el sector porcino, una de las enfermedades infecciosas más temidas es la causada por el virus de la Peste Porcina Africana (PPA), de la que en nuestro país no se conocen brotes desde 1995, pero ante la cual las explotaciones ganaderas de cerdo doméstico (*Sus scrofa*) siguen estando expuestas. En cambio, el facocero o jabalí africano (*Phacochoerus africanus*) es resistente a la PPA. Unos investigadores británicos, dirigidos por Bruce Whitelaw (Instituto Roslin, Edimburgo) descubrieron que determinadas mutaciones en el gen *RelA* parecían ser las responsables de la resistencia del jabalí africano a la PPA, y me-

dante ZFN, dirigieron la edición genómica del mismo gen *RelA* del cerdo doméstico para incorporar las variantes genéticas del facocero. Los cerdos editados genómicamente mediante ZFN se espera que sean resistentes a PPA, algo que mediante mejora genética tradicional o transgénesis habría sido mucho más difícil o imposible.


Clásicamente, la tarea de un mejorador animal era la selección de individuos con características singulares para ser utilizados como reproductores para la siguiente generación, en la cual se esperaba encontrar dichos caracteres genéticamente transmitidos. Mediante sucesivas rondas de cruzamiento, que podían requerir muchos años, se lograba transferir el carácter de interés desde una variedad animal a otra. Evidentemente este es un proceso muy lento y para nada específico, pues junto al carácter de interés se transferían muchos otros caracteres entre los genomas de las variedades o razas que podían resultar contraproducentes y debían posteriormente ser eliminados, siguiendo nuevamente procedimientos de mejora genética animal.

Un potencial avance tecnológico se consiguió con los métodos de transgénesis animal, en los que era posible, en una sola generación, introducir una construcción genética (transgen) portadora del carácter que se pretendía producir, mejorar o explotar. Naturalmente la transgénesis animal clásica no está exenta de problemas. Por un lado el transgen insertado al azar en el genoma del animal receptor puede interrumpir algún gen importante (mutación por inserción), funcionar peor de lo esperado, o dejar de funcionar tras una o dos generaciones o expresarse siguien-

do el dictado de los elementos reguladores de genes circundantes (efectos de posición cromosomal), lo cual, en definitiva condiciona el éxito de esta aproximación tecnológica y determina la necesidad de evaluar muchos animales transgénicos antes de encontrar uno con las características deseadas. Adicionalmente, como todos sabemos, el uso de animales transgénicos es un tema sensible en nuestra sociedad europea. Mientras que las aplicaciones en biomedicina consiguen habitualmente el apoyo de la po-

blación, otras aplicaciones biotecnológicas, particularmente en animales de granja, encaminadas a aumentar o mejorar la producción, con destino a la alimentación, son frecuentemente rechazadas y no logran la autorización administrativa correspondiente.

Por el contrario, las estrategias CRISPR-Cas permiten la modificación de los genes directamente en el lugar endógeno que ocupan en el genoma, sin afectar al resto de los genes, de forma muy específica. Esta especificidad es el mayor

de los éxitos de las aproximaciones experimentales basadas en CRISPR-Cas para la obtención de nuevos animales con su genoma modificado. Mediante el uso de las herramientas CRISPR-Cas para la modificación de los genomas hemos empezado a generar ya los animales del futuro, los animales que incorporarán aquellas alteraciones genéticas que les harán más útiles, más seguros, más protegidos, más saludables, más productivos y mejor adaptados a las necesidades humanas. 

REFERENCIAS

- Crispo, M., Mulet, A. P., Tesson, L., Barrera, N., Cuadro, F., dos Santos-Neto, P. C., Nguyen, T. H., Crénéguy, A., Brusselle, L., Aneón, I., Menchaca, A. (2015) Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes. *PLoS One*10: e0136690
- Doudna, J.A., Charpentier, E. (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346:1258096.
- Hai, T., Teng, F., Guo, R., Li, W., Zhou, Q. (2014) One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res.* 24: 372-5.
- 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. *J. Bacteriol.* 169: 5429-33.
- Jansen, R., Embden, J.D., Gastra, W., Schouls, L.M. (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 43: 1565-75.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816-21.
- Mojica, F.J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., Soria, E. (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* 60: 174-82.
- 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. *Mol. Microbiol.* 36: 244-6.
- Mojica, F.J., Juez, G., Rodríguez-Valera, F. (1993) Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol. Microbiol.* 9: 613-21.
- Niemann, H., Petersen, B. (2016) The production of multi-transgenic pigs: update and perspectives for xenotransplantation. *Transgenic Res.* Jan 28.
- Peng, J., Wang, Y., Jiang, J., Zhou, X., Song, L., Wang, L., Ding, C., Qin, J., Liu, L., Wang, W., Liu, J., Huang, X., Wei, H., Zhang, P. (2015) Production of Human Albumin in Pigs Through CRISPR/Cas9-Mediated Knockin of Human cDNA into Swine Albumin Locus in the Zygotes. *Sci. Rep.* 5: 16705.
- Seruggia, D., Montoliu, L. (2014) The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. *Transgenic Res.* 23: 707-16.
- Tan, W., Carlson, D.F., Lancto, C.A., Garbe, J.R., Webster, D.A., Hackett, P.B., Fahrenkrug, S.C. (2013) Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 110: 16526-31.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F., Jaenisch, R. (2013) One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153: 910-8.
- Wang, X., Cao, C., Huang, J., Yao, J., Hai, T., Zheng, Q., Wang, X., Zhang, H., Qin, G., Cheng, J., Wang, Y., Yuan, Z., Zhou, Q., Wang, H., Zhao, J. (2016) One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* 6: 20620.
- Yang, L., Güell, M., Niu, D., George, H., Lesha, E., Grishin, D., Aach, J., Shrock, E., Xu, W., Poci, J., Cortazio, R., Wilkinson, R.A., Fishman, J.A., Church, G. (2015) Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science* 350: 1101-4.