



Universidad
Católica de
Valencia
San Vicente Mártir

TFG

TRABAJO FIN DE GRADO

**GRADO EN
VETERINARIA**

Edición genética veterinaria: principios y aplicaciones del CRISPR en animales.

María del Mar Higuera Almazán
Carlos Mínguez Balaguer
2021-2022



Facultad de Veterinaria
y Ciencias Experimentales
Universidad Católica de Valencia
San Vicente Mártir

Gracias a mi familia, papá, mamá y Vivi, por apoyarme en todas las decisiones que he tomado, no dudar de mi en ningún momento y darme los mejores consejos que me han llevado a estar donde estoy. Gracias también a mi tío Antonio que, desde mis 13 años, ha encauzado toda mi carrera estudiantil: “¡Gracias Champion!”.

Gracias a mis amigas... Malena, Rocío, Lorena, Eva, Carol, Lucía y Cami por quererme con todas mis rarezas. Muchas gracias a mi tutor de TFG Carlos Mínguez por su apoyo, dedicación y maestría en el manejo de R.

Por último, gracias al que ya es parte de mí, mejor me entiende con solo mirarme y hace que todo sea un poco más fácil. Esta carrera también debería ser tuya.

¡¡Muchas gracias titi!!

ÍNDICE DE LA MEMORIA

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. Introducción	5
1.1 Edición genética	5
1.2 Desarrollo histórico	7
1.3 Descripción del sistema CRISPR-Cas.....	9
1.3.1 Componentes genómicos.....	9
1.3.2 Clasificación de los sistemas CRISPR-Cas	11
1.3.3 Funcionamiento del sistema CRISPR-Cas9 como sistema inmune.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1. Metodología	15
3.1.1 Criterios de inclusión.....	15
3.1.2 Criterios de exclusión	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
4.1 Resultados del análisis bibliométrico	17
4.2 Discusión del contenido de los documentos seleccionados	18
4.2.1 Técnicas de generación de animales modificados genéticamente.....	18
4.2.1.1 Problemas asociados a la técnica.....	21
4.2.2 Aplicación del CRISPR en animales.....	23
4.2.2.1 Generación de modelos animales mediante edición genética para estudio de enfermedades humanas.....	24
4.2.2.2 Aplicación del CRISPR en animales de ganadería.....	26
4.2.2.3 Aplicación del CRISPR en animales domésticos: perro, gato y caballo	32
4.2.2.4 Xenotrasplantes y nuevas técnicas para creación de órganos.....	33
4.2.2.5 Edición genética parasitaria y reacción en cadena mutagénica.	34

4.2.2.6 Desextinción de especies.....	36
4.2.3 Implicaciones éticas	37
5. CONCLUSIONES	39
6. BIBLIOGRAFÍA.....	41
7. ANEXOS	I
Anexo 1.- Tabla comparativa entre los principales modelos de edición genética.....	I
Anexo 2.- Clasificación en base a rasgos principales de los dos tipos globales de sistemas CRISPR-Cas.....	II
Anexo 3.- Principales genes modificados por el sistema CRISPR-Cas en el genoma porcino con fines de xenotrasplante.....	III

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Descripción general de los posibles resultados de la edición del genoma utilizando nucleasas específicas del sitio.....	4
Figura 2: Descripción gráfica simplificada de los principales sistemas de edición genética mediada por nucleasas.....	5
Figura 3: Representación de un CRISPR locus.....	7
Figura 4: Complejo efector del sistema CRISPR-Cas9 (sistema prototipo).....	8
Figura 5: Adquisición de secuencias espaciadoras (primera etapa).....	9
Figura 6: Expresión de los genes que conforman el sistema CRISPR-Cas9 (segunda etapa).....	10
Figura 7: Interferencia, formación del complejo efector (tercera etapa).....	10
Figura 8: Porcentaje de artículos seleccionados según la fecha de publicación.....	13
Figura 9: Porcentajes de revistas visitadas según el país de edición.....	13
Figura 10: Clasificación de los artículos seleccionados según cuartil.....	14
Figura 11: Diferentes formas de expresión del sistema CRISPR-Cas.....	16
Figura 12: Representación gráfica de las aplicaciones del CRISPR-Cas en animales.....	19
Figura 13: Comparativa entre secciones musculares idénticas en tamaño pertenecientes a lechones no mutados vs lechones MSTN KO.....	23
Figura 14: Documentación gráfica del experimento llevado a cabo en lechones de raza Holstein Friesian con el objetivo de generar fenotipos sin cuernos.....	27
Figura 15: Representación gráfica del mecanismo de acción de la reacción en cadena mutagénica	31
Figura 16: Herencia mendeliana de un rasgo ligado al cromosoma X vs herencia teórica basada en MCR de un gen mutante ligado al cromosoma X.....	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Enzima Cas9 y ARN guía necesarios según el objetivo de la edición genética. 19

Tabla 2: Principales problemas del sistema CRISPR-Cas. 21

RESUMEN

CRISPR-Cas es una técnica de edición genética. La relevancia de esta técnica frente a anteriores es su fácil uso, el bajo coste económico y la plasticidad. El objetivo de este trabajo ha sido realizar un compendio de los principales usos del sistema CRISPR-Cas en veterinaria; desde la aplicación en animales de laboratorio, animales domésticos o animales de producción. También, se pretende reunir las últimas novedades en el tema de los xenotrasplantes.

Para la realización del presente trabajo se recogieron los últimos artículos publicados en revistas relevantes, así como otros menos actuales, pero de gran importancia por los avances que permitieron.

Entre las conclusiones de la revisión llevada a cabo, cabe destacar, que la técnica CRISPR-Cas presenta muchas ventajas, pero aún tiene que ser perfeccionada para conseguir resultados más aplicables al día a día. Aun así, los experimentos para la mejora de distintas facetas de animales de producción son muy numerosos. También, se ha conseguido generar modelos animales de muchas enfermedades humanas, lo que supone un gran avance en la medicina personalizada. Por último, es remarcable que la investigación de posibles aplicaciones con objetivos terapéuticos en animales es muy reducida. Este hecho junto con la importancia exponencial que están cobrando las mascotas y la experiencia en modificación del genoma animal hace pensar que, en futuro cercano, se trasladarán los conocimientos de la medicina humana a la veterinaria y la investigación animal aumentará.

Palabras clave: CRISPR-Cas, edición genética, animales, aplicaciones, bioética.

ABSTRACT

CRISPR-Cas is a gene editing technique. The relevance of this technique compared to previous ones is its ease of use, low economic cost and plasticity. The objective of this work has been to make a compendium of the main uses of the CRISPR-Cas system in veterinary medicine; from the application in laboratory animals, domestic animals or livestock animals. Also, it is intended to gather the latest news on the subject of xenotransplantation.

To carry out this work, the latest articles published in relevant journals were collected, as well as others that were less current, but of great importance due to the advances they allowed.

Among the conclusions of the review carried out, it should be noted that the CRISPR-Cas technique has many advantages, but it still has to be perfected to achieve more applicable results on a day-to-day basis. Even so, the experiments for the improvement of different facets of livestock animals are very numerous. Also, it has been possible to generate animal models of many human diseases, which represents a great advance in personalized medicine. Finally, it is remarkable that the investigation of possible applications with therapeutic objectives in animals is very limited. This fact, together with the exponential importance that pets are gaining and the experience in modifying the animal genome, suggests that in the near future, knowledge will be transferred from human medicine to veterinary medicine and animal research will increase.

Keywords: CRISPR-Cas, gene editing, animals, applications, bioethics.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Edición genética

La evolución y el desarrollo de los sistemas de secuenciación del genoma ha generado un interés creciente en el conocimiento de la función de los genes.

El término “edición genética” hace referencia a la modificación de genes por reemplazo, inserción o eliminación de secuencias de ADN en el genoma de un organismo mediante enzimas de tipo nucleasas. Las nucleasas o “tijeras moleculares” son enzimas capaces de generar cortes en cadenas de nucleótidos (ARN o ADN) en lugares determinados. Por tanto, la edición genética, se basa en el uso de nucleasas diseñadas y compuestas por dominios de unión a ADN específicos de secuencia fusionados con un módulo de escisión de ADN no específico (Carroll, 2011; Gaj et al., 2013)

La modificación del ADN es el resultado de la reparación que de forma fisiológica se va a iniciar una vez cortada la doble cadena de ADN (Lacadena, 2016).

Una rotura de doble cadena de ADN es incompatible con la vida de la célula, por tanto, los sistemas de reparación de ADN están presente en todos los tipos celulares y organismos (Maestre & Patiño, 2016).

Como muestra la Figura 1, las principales vías de reparación de daños en el ADN son la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la reparación dirigida por homología (HDR) (Wyman & Kanaar, 2006).

- **Reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ):** esta ruta consiste en la inserción y eliminación de nucleótidos de forma aleatoria hasta conseguir de manera azarosa que dos bases sean complementarias y generar una reordenación alrededor de este punto reconstruyendo la cadena de ADN. Este proceso generalmente lleva a la alteración de la pauta de lectura de los genes, resultando en proteínas trucadas o formación de codones de STOP que inactivaran ese gen. Los resultados aberrantes como consecuencia de inserciones y deleciones aleatorias se denominan INDEL (small insertions and deletions)(Lieber, 2010). Se trata de un método rápido y eficiente de reparación de DSBs (double strand break o cortes de doble hebra), representa la ruta predominante de reparación de DSBs en mamíferos, ocurriendo en una relación de 1000:1 frente a la reparación por homología (Fattah et al., 2008).

- **Reparación dirigida por homología (HDR):** a diferencia de NHEJ, la reparación de dobles roturas por esta vía implica el uso de un molde de ADN con homología. La célula es capaz de reconocer un fragmento de ADN que tenga extremos homólogos a las secuencias alrededor del corte e insertarlo para, de esta manera, recuperar la continuidad. Esta ruta es necesaria para que se dé la edición genética. En el fragmento de ADN homólogo se pueden introducir cambios dirigidos; en el proceso de reparación del corte, se incorporará, resultando en una célula con una nueva secuencia elegida en un lugar determinado (Maestre & Patiño, 2016; Wyman & Kanaar, 2006).

La tasa de HDR ocurre con una frecuencia muy baja (Thomas & Capecchi, 1987). Debido a esto, durante los últimos años, una parte importante de la investigación enfocada a mejorar la eficiencia de la terapia génica se centra en la búsqueda de estrategias que aumenten la tasa de HDR (Shao et al., 2017).

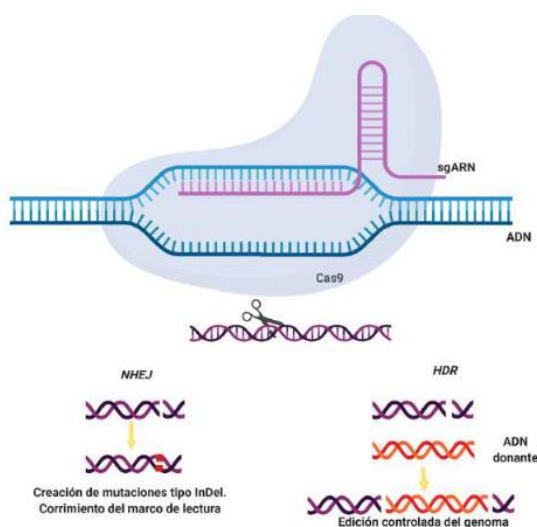


Figura 1: Descripción general de los posibles resultados de la edición del genoma utilizando nucleasas específicas del sitio (Madariaga-Perpiñán et al., 2020).

Los principales sistemas de edición genética por orden de descubrimiento son (Figura 2):

- Recombinación homóloga normal.
 - Espontánea: como sistema normal de reparación del ADN ante daños endógenos o exógenos (Brinster et al., 1989; J. Zheng et al., 2018).
 - Inducida por enzimas de restricción (Smithies et al., 1985).
 - Inducida por meganucleasas (Kuijpers et al., 2013; Paques & Duchateau, 2007).
- ZFN (Zinc Finger Nucleases)(Carroll, 2008; Cathomen & Keith Joung, 2008).

- TALEN (Transcription activator like effector nucleases)(Bedell et al., 2012; Wright et al., 2014).
- CRISPR-Cas9 (Jinek et al., 2012)..

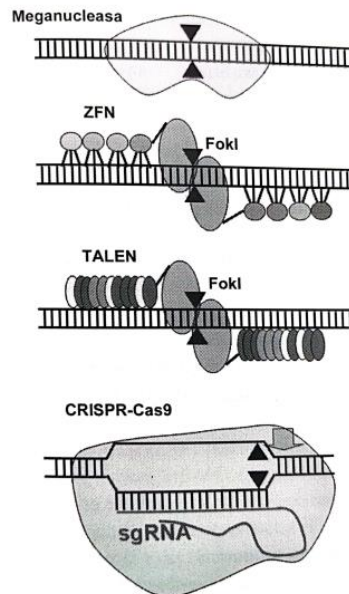


Figura 2: Descripción gráfica simplificada de los principales sistemas de edición genética mediada por nucleasas (Montoliu, L., 2021).

En el apartado de Anexos se realiza una comparativa en formato de tabla (Anexo 1) como aclaración de las diferencias entre las técnicas citadas anteriormente.

El uso de nucleasas de diseño (ZFN, TALEN o Cas9) ha permitido generar recombinación homóloga con fragmentos de ADN adicionados de una manera mucho más eficiente (Johnson & Jasin, 2001). La ventaja que aportan es la inducción de un corte de doble hebra en el ADN haciendo necesaria la reparación (Madariaga-Perpiñán et al., 2020). Hasta el inicio del uso de las nucleasas, las inserciones de fragmentos de ADN aportados solo se darían cuando se fragmentara el ADN de forma natural.

Durante este trabajo, se desarrollará en profundidad la técnica CRISPR-Cas por las ventajas que aporta en comparación con técnicas anteriores al campo de la edición genética.

1.2 Desarrollo histórico

A finales de los años ochenta e inicios de los 90, durante un estudio, se llevó a cabo el genotipado de *Haloferax mediterrani*. En el proceso de secuenciación de fragmentos de ADN se detectó la aparición de secuencias que se repetían a distancias regulares. Estas secuencias se caracterizaban por ser parcialmente palindrómicas, idénticas en tamaño y distancia a la que aparecían. Posteriormente se denominarían CRISPR por las siglas Clustered Regularly

Interspaced Short Palindromic Repeats, o Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas (Mojica et al., 1993).

Después del primer descubrimiento de secuencias CRSIPR en *H. mediterrani*, se publicaron nuevos estudios en los que se describían secuencias parecidas en bacterias como *Mycoplasmas* (Lussow et al., 1991) y *Escherichia coli* (Ishino et al., 1987). El hecho de que hubiesen sido mantenidas por organismos tan dispares hacía intuir la posible importancia de estas secuencias.

Durante esta época, aparte de estudiar las CRISPR, también se comenzó a estudiar las secuencias espaciadoras entre repeticiones. Mediante programas bioinformáticos creados a propósito, se compararon secuencias de más bacterias, virus, etc. El descubrimiento de homologías entre ciertas secuencias espaciadoras y genomas víricos y de plásmidos llevó a plantear la siguiente hipótesis: “la homología en bacterias era un sistema inmune genético, de manera que las bacterias que tuviesen el fragmento del ADN vírico o plásmido integrado serían inmunes a él” (Mojica et al., 2005). En 2007, esta hipótesis fue confirmada (Barrangou et al., 2007).

En un principio, esta hipótesis no pudo ser contrastada experimentalmente ya que no se cumplía que todas las bacterias que integraban ADN de fagos fueran inmunes a ese fago. Años después se descubrió que esto pasaba porque el sistema CRISPR de defensa estaba silenciado (Pougach et al., 2010; Pul et al., 2010).

En 2012, se explicó de manera detallada el funcionamiento del sistema. También se consiguió describir todos los elementos necesarios CRISPR para cortar secuencias de ADN en sitios determinados: nucleasa Cas, crARN y trancrRNA (desarrollado en el apartado siguiente). Además, varios autores previeron por primera vez que el sistema CRISPR asociado a la enzima Cas (en adelante CRISPR-Cas) podría ser usado como herramienta de edición genética (Jinek et al., 2012; Gasiunas et al., 2012). Previo a esto, ya se había comprobado la posibilidad de que un organismo integrase sistema CRSIPR- Cas de otro (Sapranaukas et al., 2011).

En 2013, por primera vez, se consiguió editar células de mamíferos cultivadas *in vitro* mediante el sistema CRISPR-Cas (Cong et al., 2013a). En este año, también se llevó a cabo por primera vez la edición del genoma humano por Cas9 (enzima Cas específica de la bacteria *Streptococcus pyogenes*) (Mali et al., 2013).

La aplicación de estas técnicas *in vitro* llegó a su punto álgido con la creación de los primeros ratones editados mediante el sistema CRISPR-Cas (H. Wang et al., 2013).

En conclusión, el conjunto de eventos que ha llevado al conocimiento y entendimiento del sistema CRISPR-Cas ha sido un proceso dinámico, con muchos investigadores interesados en el estudio de la técnica debido a su gran potencial. Hoy en día, el sistema CRISPR está muy desarrollado; aun así, siguen descubriéndose nuevas formas de mejorar su eficacia y limitar sus errores. El dinamismo y la facilidad de manejo de la técnica hace que sus aplicaciones sean prácticamente ilimitadas; es por ello que constantemente aparecen artículos que refieren usos novedosos.

1.3 Descripción del sistema CRISPR-Cas

1.3.1 Componentes genómicos

El sistema CRISPR-Cas es un sistema inmunitario transmisible de generación en generación que proporciona resistencia contra elementos genéticos extraños en procariontes (Barrangou et al., 2007). Las construcciones genómicas CRISPR-Cas se localizan en lugares determinados del genoma denominados “locus CRISPR-Cas” (Figura 3).

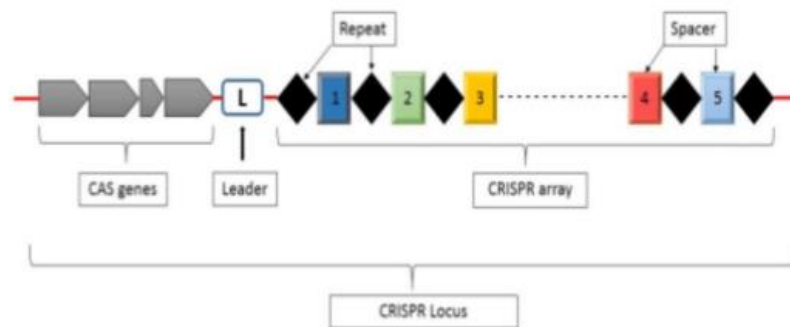


Figura 3: Representación de un CRISPR locus (Gupta et al., 2019).

En estas construcciones se albergan los genes que codifican para las moléculas efectoras de las funciones de inmunidad. Dichos genes son los siguientes (sobre el sistema CRISPR clase II¹):

- Secuencias CRISPR que separan los espaciadores.
- Secuencias espaciadoras entre repeticiones CRISPR. Los espaciadores son segmentos obtenidos zonas concretas del ADN de un fago. La cantidad de secuencias espaciadoras varía según el tipo de procarionte, además pueden ir añadiéndose durante la vida del organismo después de sufrir infecciones (Yosef et al., 2012). La transcripción de estos fragmentos, después de un proceso de maduración, dará lugar a crRNA o ARN guía con secuencias homologas al ADN viral.

¹ Sistema CRISPR-Cas más sencillo. Explicado de forma más detallada en el siguiente apartado.

1. INTRODUCCIÓN

Los fragmentos que se incluyan en el genoma bacteriano deben estar en el genoma vírico, cerca de secuencias PAM (protospacer adjacent motif, traducido al español como motivo adyacente del protoespaciador). El hecho de que solo se adquieran secuencias cercanas a PAM constituye un mecanismo de seguridad que evita que se generen cortes en el propio ADN. Es decir, el sistema CRISPR-Cas solo generará cortes cuando detecte secuencias PAM posteriores a la secuencia homóloga del ARN guía (Deveau et al., 2008). Por ejemplo, la secuencia PAM que debe detectar la enzima Cas9 (muy usada) es un triplete de nucleótidos NGG (de la Fuente-Núñez & Lu, 2017)

- Cas o genes contiguos a los CRISPR: los genes que codifican para las proteínas Cas, encargadas de generar el corte al ADN extraño para invalidarlo entre otras funciones (Wiedenheft et al., 2012).

La nucleasa Cas9 está conformada por 3 dominios (Jinek et al., 2012):

- El dominio de interacción con PAM (PI).
 - El dominio de la nucleasa HNH (histidina-asparagina-histidina): permite cortar la cadena complementaria al crARN.
 - El dominio RuvC que corta la hebra opuesta a la anterior del ADN extraño.
- Secuencias codificantes del tracrRNA: el tracrARN es una molécula de ARN transcrito a partir de una región repetida. Es el encargado de promover la maduración del primer transcrito de las secuencias espaciadoras (pre-crRNA) para dar lugar al crRNA (P. Gao et al., 2016). Además, se une tanto al crRNA como a la nucleasa Cas9 actuando como anclaje entre ambas.

Como muestra la Figura 4, las moléculas efectoras resultantes de la decodificación de los genes anteriormente propuestos serían las siguientes: nucleasa Cas, el crRNA y el tracrRNA. Las moléculas de tracrARN, crARN pueden fusionarse en una guía única de ARN (single guide ARN= sgRNA), lo cual simplifica en gran medida el uso de este sistema (Doudna & Charpentier, 2014).

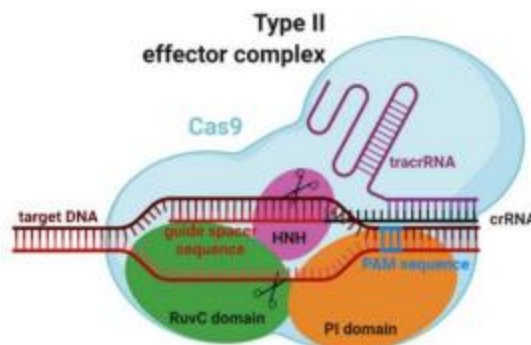


Figura 4: Complejo efector del sistema CRISPR-Cas9 (sistema prototipo) (Nidhi et al., 2021).

1.3.2 Clasificación de los sistemas CRISPR-Cas

La clasificación se basa en las diferencias de composición de la proteína Cas y divergencia de secuencia entre los complejos efectores.

Según la última clasificación en 2020 (Makarova et al., 2020), los sistemas CRISPR-Cas se pueden clasificar en dos clases (clase I, clase II), que se subdividen en seis tipos (tipo I–VI) y 33 subtipos. A la clase I pertenecen los tipos I, III y IV; mientras que, a la clase II pertenecen los tipos II, V y VI. A nivel general, las principales diferencias vienen plasmadas en forma de tabla en el apartado Anexos 2.

Ambas clases de sistemas CRISPR-Cas tienen un potencial significativo para la edición del genoma; sin embargo, los complejos efectores de los sistemas de clase II son preferibles en ingeniería genética (Deltcheva et al., 2011).

1.3.3 Funcionamiento del sistema CRISPR-Cas9 como sistema inmune

El mecanismo por el cual los organismos procariontes son capaces de protegerse de la acción patógena de fagos mediante el sistema CRISPR puede resumirse en tres etapas (van der Oost et al., 2009):

- **Adaptación:** es el proceso resultante de una primera inyección de ADN viral en una bacteria. Consiste en la incorporación de secuencias de ADN viral asociadas al PAM (protoespaciadores) entre secuencias CRISPR (Gupta et al., 2019; Nidhi et al., 2021; van der Oost et al., 2009). La Figura 5, propuesta a continuación, ofrece una explicación gráfica del proceso.

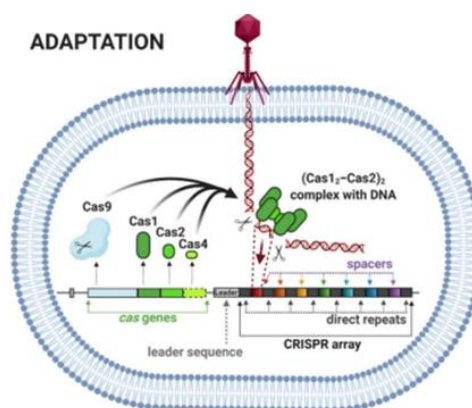


Figura 5: Adquisición de secuencias espaciadoras (primera etapa) (Nidhi et al., 2021).

- **Expresión** (Figura 6): consiste en la generación de crRNA como resultado de la transcripción y la maduración de las secuencias de protoespaciadores insertados en la fase anterior. También se genera el tracrARN que se unirá al crRNA para formar el sgRNA. (Gupta et al., 2019; Nidhi et al., 2021; van der Oost et al., 2009).

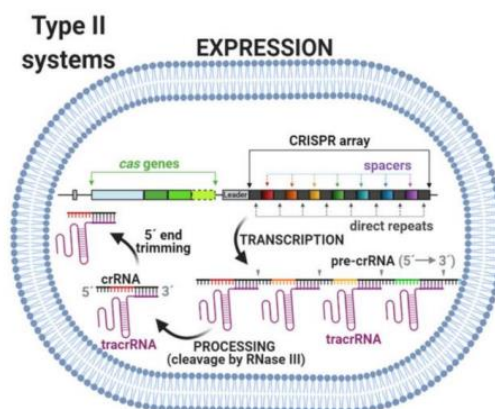


Figura 6: Expresión de los genes que conforman el sistema CRISPR-Cas9 (segunda etapa) (Nidhi et al., 2021).

- **Interferencia** (Figura 7): consiste en la formación del complejo efector; por tanto, en la asociación de la enzima Cas junto con el dímero crARN + tracrRNA. En caso de detectar una segunda infección, el complejo efector es capaz de generar un corte de doble hebra al detectar presencia de ADN viral. La porción de crRNA maduro reconoce y se une al ADN exógeno y la enzima Cas9, gracias a sus dos dominios genera el corte (Gupta et al., 2019; Nidhi et al., 2021; van der Oost et al., 2009).

Las condiciones que han de cumplirse para que el sistema CRISPR-Cas genere un corte en el ADN exógeno son:

- ✓ Complementariedad de bases entre el crRNA y el ADN extraño
- ✓ La secuencia complementaria vírica se localice cerca de un PAM.

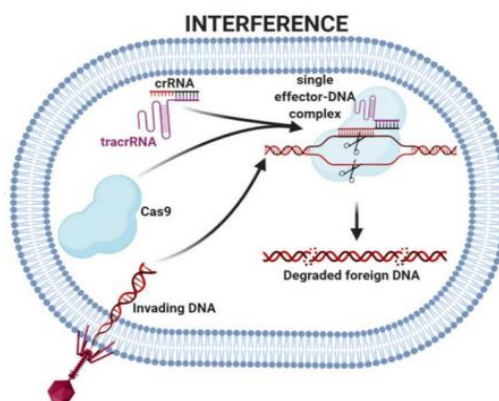


Figura 7: Interferencia, formación del complejo efector (tercera etapa) (Nidhi et al., 2021).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta revisión bibliográfica consistió en conocer las aplicaciones de la edición genética en el área de la veterinaria.

Como objetivos secundarios:

- Explicación de los mecanismos básicos de funcionamiento de la herramienta CRISPR-Cas, así como sus limitaciones.
- Estudiar como los modelos animales desarrollados para medicina humana pueden ser transferidos a la clínica veterinaria.
- Visión ética y filosófica asociada a las técnicas de edición genética.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Metodología

El primer filtro que se ha utilizado para la obtención de artículos es que estuvieran en revistas editadas en lengua inglesa. Se determinó, que la inmensa mayoría de revistas científicas de alto impacto están editadas en esa lengua.

El periodo de tiempo que se ha acotado para la búsqueda de artículos va desde el año 2015 hasta el año 2022, aunque algunos artículos de años anteriores han sido seleccionados dado sus numerosas citas en otros artículos científicos de relevancia.

Los artículos se han obtenido desde bases de datos online como PubMed, Bookshelf y Google Scholar.

Durante la búsqueda de los artículos, en las bases de datos mencionadas anteriormente, se han empleado conceptos clave relacionados con la temática objeto de estudio. Estos conceptos se han introducido para restringir la búsqueda a artículos del ámbito de la genética animal. Algunos de los conceptos clave han sido: *“CRISPR-Cas”, “Gene Editing”, “Animals”, “Applications”, “Bioethics”, “Xenotransplantation”, “Laboratory animals”, “Domestic animals”, “Livestock animals”*.

3.1.1 Criterios de inclusión

Los artículos seleccionados cumplen con las siguientes características:

- Artículos que apliquen la edición genética en el área de la veterinaria
- Artículos que desarrollen el concepto, características y aplicabilidad del CRISPR-Cas.
- Artículos enfocados a la visión bioética en las técnicas de edición genética.
- Artículos científicos publicados en inglés.

3.1.2 Criterios de exclusión

Los artículos de los que se prescinde son los que cumplen las siguientes características:

- Artículos que no procedan de datos de bases y revistas científicas confiables o páginas web oficiales.
- Al igual que hicimos con las revistas, también se desecharon artículos redactados en lenguas diferentes al inglés (salvo relevancia destacable).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados del análisis bibliométrico

Durante la búsqueda de información se seleccionaron un total de 180 artículos, respecto del total de documentos encontrados, en base a los criterios de inclusión y exclusión preestablecidos en el apartado anterior. Además, se elaboraron diferentes figuras para mostrar los resultados de la búsqueda bibliográfica para la discusión

En la Figura número 8, se establecieron diferentes grupos separados por periodos de tiempo, según el año de publicación de los artículos. Se puede apreciar que más de la mitad de los artículos referenciados fueron publicados a partir del 2017. Este resultado es razonable ya que la descripción del uso del CRISPR como herramienta de edición genética se ha desarrollado en los últimos años.

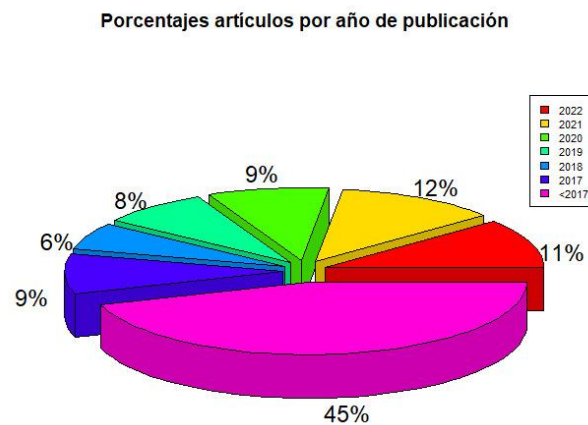


Figura 8: Porcentaje de artículos seleccionados en función de la fecha de publicación
(Fuente: elaboración propia R-project)

En la Figura número 9, se clasificaron las revistas donde se publicaron los artículos citados en función del país de publicación.

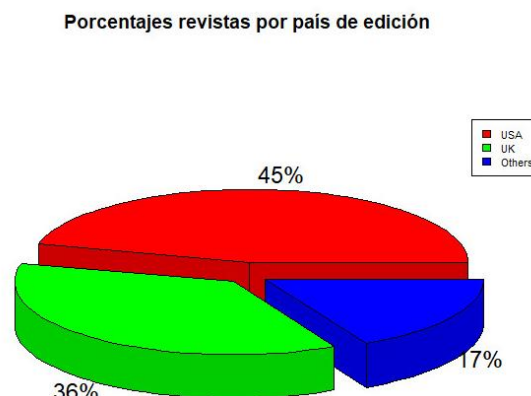


Figura 9: Porcentajes de revistas visitadas según el país de edición
(Fuente: elaboración propia R-project)

Por último, se clasificaron los artículos en función del cuartil al que pertenecía la revista en la que fueron publicados. Es destacable que la mayoría de los artículos utilizados fueron publicados en revistas Q1 (Figura 10).

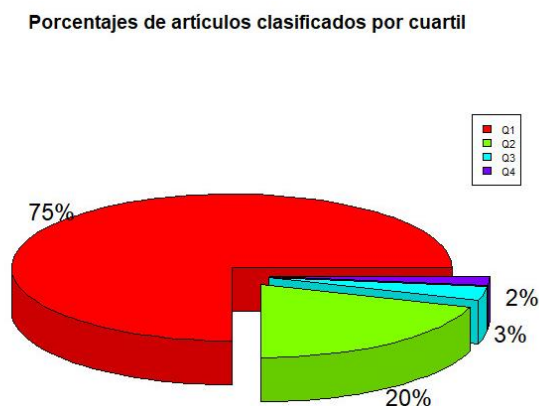


Figura 10: Clasificación de los artículos seleccionados según cuartil edición
(Fuente: elaboración propia R-project)

4.2 Discusión del contenido de los documentos seleccionados

4.2.1 Técnicas de generación de animales modificados genéticamente

En relación con la edición genética animal; el sistema CRISPR-Cas9 permite realizar las siguientes operaciones genómicas:

- Knockear: consiste en interrumpir permanentemente la función del gen en un tipo de célula u organismo en particular sin una mutación específica (Zuo et al., 2017).
- Editar: generar un cambio de secuencia específico definido por el usuario en un gen en particular, como generar una mutación puntual o insertar una etiqueta (Y. Wu et al., 2015).
- Reprimir o interferir (CRISPRi). Reducir la expresión de un gen en particular sin modificar permanentemente el genoma (Kampmann, 2018).
- Activar (CRISPRa): aumentar la expresión de uno o más genes endógenos sin modificar permanentemente el genoma (Kampmann, 2018).

Según el objetivo de la edición, habrá parámetros que cambien de la siguiente manera (Tabla 1):

Tabla 1: Enzima Cas9 y ARN guía necesarios según el objetivo de la edición genética (elaboración propia).

	Knockear	Editar	Reprimir	Activar
Enzima Cas9	Cas9 general.	Cas9 general o Cas9 nickase ² (de la Fuente-Núñez & Lu, 2017).	dCas9-represor ³ (Hilton et al., 2015).	dCas9- activador.
ARN guía	Dirigido sobre el gen que se pretende bloquear.	Dirigido sobre la región que se pretende editar.	Dirigido sobre los elementos reguladores de los genes.	Dirigido sobre los elementos reguladores de genes.

Los elementos reguladores sobre los que se actúa cuando se pretende modificar la expresión de un gen son secuencias asociadas a regiones codificantes de los genes que determinan cuándo y dónde deben activarse o inactivarse los genes (Visel et al., 2009).

A continuación, se ofrece una descripción breve de los pasos a seguir para realizar experimentos de edición genómica y regulación de la expresión utilizando el sistema CRISPR-Cas9 (Robb, 2019).

1. Determinar la región del genoma sobre la que se va a dirigir CRISPR-Cas (exones o regiones reguladoras). Próximo a la región donde se pretende generar el corte, hay que detectar PAMs. Esta señal será la que determinará que la Cas9 ejecute el corte (Gasiunas et al., 2012).
2. A continuación, debe diseñarse un sgRNA adecuado, que hibride con la secuencia diana. El desarrollo de sgRNA eficientes reducirá en gran medida uno de los principales problemas asociados con la técnica: los cortes en regiones similares a la diana pero no iguales o actividad off -target. Existen herramientas bioinformáticas que permiten obtener sgRNAs eficientes y específicos.
3. Posteriormente, es necesario seleccionar un sistema de expresión y liberación que permita ingresar, en la célula u organismo, los componentes básicos de la maquinaria CRISPR-Cas9.

² Cas9 nickase: Enzima Cas9 mutada que solo puede generar corte en una hebra de ADN.

³ dCas: Enzima Cas9 mutada incapaz de generar cortes en el ADN. Si se unen a proteínas activadoras de la transcripción se aumentará la expresión de dicho gen; si por el contrario se une a proteínas represoras, se reducirá la transcripción y por tanto expresión del gen.

Como viene ilustrado en la Figura 11, las principales formas en las que se puede suministrar el sistema en una célula son (Foss et al., 2019):

- En forma de plásmido de ADN que codifica el gen para la proteína Cas9 y el ARN guía (sgARN).
- En forma de molécula de ARN que al ser traducido genere Cas9(mRNA) junto con el ARN guía (sgARN).
- Como complejo proteína-ARN preformado (RNP): producto de laboratorio que consiste en la proteína Cas9 generada *in vitro* asociada al sgARN.

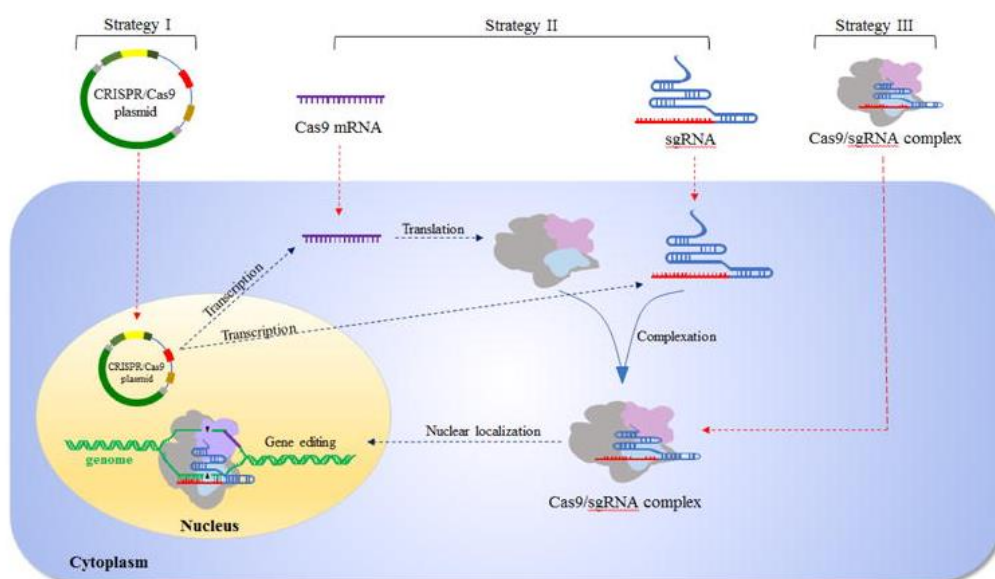


Figura 11: Diferentes formas de expresión del sistema CRISPR-Cas (C. Liu et al., 2017).

Los medios por los cuales se entregan las formas de CRISPR mencionadas anteriormente pueden dividirse en dos grupos según si hay uso de virus como vectores o no de la siguiente manera:

- Transporte mediado por virus (Gupta et al., 2019).
 - Adenovirus.
 - Virus adenoasociados (AAV).
 - Lentivirus.
- Transporte no mediado por virus.
 - Métodos químicos.
 - Transfección de sistema CRISPR-Cas9, vehiculizado por liposomas o nanopartículas lipídicas (Zuris et al., 2015).
 - Transfección mediada por moléculas de fosfato cálcico.

- Métodos físicos.
 - Microinyección (Yan et al., 2014).
 - Electroporación (Hashimoto & Takemoto, 2015).

Generalmente en las técnicas de edición genética *ex vivo* (las modificaciones celulares se realizan en cultivos laboratoriales) se usan ambas técnicas de entrega de reactivos CRISPR-Cas9; tanto mediadas por virus, como no mediadas por virus; mientras que, en las técnicas *in vivo* (consiste en la introducción del sistema CRISPR en el paciente para ejercer la función de restaurar genes en el propio organismo) los principales métodos son aquellos que involucran la acción viral (Gupta et al., 2019).

4. Por último, se debe comprobar que los cortes realizados han sido los apropiados en las células diana. Para ello, se usan métodos de secuenciación; ya sea, de regiones concretas del genoma o del genoma completo (opción más viable para detectar posibles cortes en regiones alejadas de la zona diana) (Robb, 2019).

4.2.1.1 Problemas asociados a la técnica

Las principales limitaciones asociados con la edición genética mediante CRISPR-Cas9 son los siguientes (Tabla 2):

Tabla 2: Principales problemas del sistema CRISPR-Cas (elaboración propia).

Problemas internos relacionados con el propio sistema de edición.	Problemas externos relacionados con los sistemas de reparación de las células.
<ul style="list-style-type: none"> - Actividad inespecífica o efectos <i>off-target</i>. - Riesgo de reacción inmune causada por proteína Cas9 propia de bacterias cercanas al humano. - Poca especificidad y eficiencia de los sistemas de liberación (Moreno & Mali, 2017). - Mosaicismo genético (Ryczek et al., 2021). 	<ul style="list-style-type: none"> - Bajas tasas de HDR (Savić & Schwank, 2016).

El sistema CRISPR-Cas, como se ha comentado anteriormente, es el sistema inmune de organismos procariontas. Una de las propiedades que tiene como tal, es la capacidad de reconocer moléculas víricas que en esencia sean iguales a las que se introdujeron en el momento de la primera infección, pero no idénticas; teniendo en cuenta, por tanto, la variabilidad vírica.

Desde el punto de vista de la edición genética esta es una de las grandes limitaciones del sistema. Las nucleasas cortan en primer lugar en las regiones más similares al sgRNA pero también son capaces de generar cortes en regiones con una homología con el sgRNA inferior al 100% pero manteniéndose en porcentajes altos (Cong et al., 2013). Esto lleva a la generación de mutaciones en regiones no deseadas y por tanto alteraciones genómicas que pueden llegar a ser incompatibles con la vida (Foss et al., 2019).

Entre las medidas que se han tomado para reducir este problema se encuentran:

- Reducción del tiempo y la cantidad de proteína Cas9 funcional. Por ello, el uso de RNPs, con vida funcional limitada y degradación rápida, es el enfoque más aceptado para obtener una edición precisa y específica, con minimización de la actividad off-target (Kim et al., 2014).
- Selección de guías de ARN homólogas a secuencias únicas en el genoma y con un número reducido de secuencias en el ADN diana similares (Tycko et al., 2016).
- Generar enzimas Cas9 mutadas como las nicasas con una función distinta a la Cas9. Las nicasas por separado solo son capaces de generar cortes en una hebra de ADN (Ran et al., 2013).
- Uso de enzimas Cas9 “mejoradas”, con más especificidad hacia las cadenas de ADN diana: eSpCas9 o eSaCas9 (Tycko et al., 2016).
- Uso de proteínas Cas9 ortólogas⁴ a SpCas9 (Esvelt et al., 2013): *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9) (Friedland et al., 2015), *Neisseria meningitidis* (NmCas9) y *Streptococcus thermophilus* (StCas9) (Tycko et al., 2016).

Por otro lado, en 2018, se detectaron anticuerpos anti la enzima Cas de *S. aureus* y *S. pyogenes* en células humanas (Charlesworth et al., 2019). Estas bacterias causan infecciones en humanos con relativa frecuencia con lo que la posibilidad de haber desarrollado anticuerpos ante ellas es alta; aun así, no todos los individuos humanos los presentan (Crudele & Chamberlain, 2018). La presencia de anticuerpos puede desencadenar la activación inmunológica, la inflamación y la posible muerte de las células editadas (Wagner et al., 2019). Ante este hecho, se proponen soluciones como el uso de enzimas Cas9 de bacterias más alejadas del humano o la terapia inmunosupresora entre otras (Crudele & Chamberlain, 2018; Foss et al., 2019; Toral et al., 2022).

Otra de las importantes limitaciones del sistema CRISPR-Cas en modelos de animales grandes es la aparición de mosaicismo genético. El mosaicismo genético es la aparición de

⁴ Ortólogas: con la misma función, pero propias de organismos distintos.

individuos con más de dos alelos para un gen objetivo como resultado de la edición en diferentes etapas del desarrollo del embrión. Esto se da a menudo cuando se realiza microinyección de CRISPR-Cas9 en cigotos (Ryczek et al., 2021).

4.2.2 Aplicación del CRISPR en animales

Los usos de CRISPR-Cas9 para la ingeniería del genoma animal incluyen varias aplicaciones específicas representadas en la Figura 12 (Shrock & Güell, 2017):

- La inactivación o alteración de genes en animales modelo para dilucidar las funciones de estos genes.
- La producción de modelos animales de enfermedades humanas para estudiar la progresión de la enfermedad de manera controlada y evaluar terapias potenciales.
- Mejora animal centrada en aumentar la productividad: mejor resistencia a enfermedades y mejores índices productivos.
- Desarrollo de órganos para trasplantes a humanos.
- Erradicación de enfermedades parasitarias mediante impulso genético.
- Desextinción de especies.

A continuación, se desarrollarán las principales aplicaciones en animales, tanto domésticos como de ganadería. También se incidirá en las investigaciones en relación con los xenotrasplantes y otra técnica incipiente relacionada con la creación de órganos. Por último, se comentarán aquellos estudios menos destacables en el ámbito veterinario.

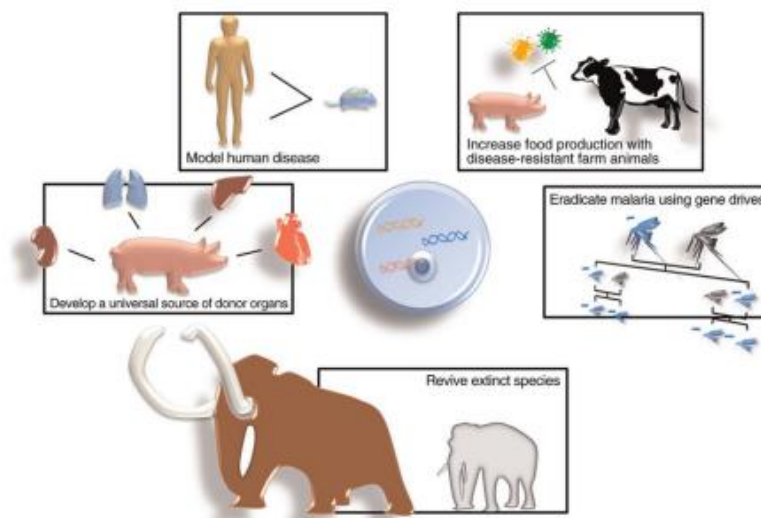


Figura 12: Representación gráfica de las principales aplicaciones del CRISPR- Cas en animales (Shrock & Güell, 2017).

4.2.2.1 Generación de modelos animales mediante edición genética para estudio de enfermedades en humana.

Los editores de genes ahora permiten la ingeniería precisa de modelos animales. Si una mutación ocurre en la naturaleza, puede replicarse en dichos modelos para su estudio. Por lo tanto, las mutaciones en el genoma humano que se sabe que son causantes o están asociadas con una patología humana pueden replicarse en el genoma de un animal (Whitelaw et al., 2016).

El mamífero más utilizado como modelo de enfermedades humanas es el ratón de laboratorio. El motivo por el cual se usan principalmente ratones es la facilidad de manejo, la alta tasa de reproducción y la gran similitud que presenta su genoma con el genoma humano (Chinwalla et al., 2002). Se ha demostrado que, además de los genes en sí, los patrones de expresión génica en modelos de ratón son similares en humanos (Takao & Miyakawa, 2015).

Las principales enfermedades humanas para las cuales se han creado modelos de roedores son:

- Albinismo: modelos de ratón para el tipo más común (en países occidentales) de albinismo no sindrómico (OCA1), asociado con mutaciones en el gen Tyr (Fernández et al., 2021). También se han creado modelos de otros tipos de albinismo oculocutáneo para el estudio de los problemas oculares asociados (Fernández et al., 2021; Tingaud-Sequeira et al., 2022).
- Obesidad y diabetes, mediante las mutaciones de genes de la leptina (Roh et al., 2018).
- Síndrome del corazón izquierdo hipoplásico (HLHS) mediante la edición de genes asociados (X. Liu et al., 2017).
- Distintos tipos de cánceres: cáncer de pulmón (Sánchez-Rivera et al., 2014), cáncer de hígado (Xue et al., 2014), leucemia mieloide (Heckl et al., 2014), tumores cerebrales (Zuckermann et al., 2015), etc.
- Aneurosis congénita de Leber: enfermedad propiciada por mutaciones en un gen determinado que genera ceguera de aparición temprana (Zhong et al., 2015).
- Inmunodeficiencias (J. Zhou et al., 2014).

Las diferencias significativas entre el ratón y el hombre, incluido el tamaño físico o los aspectos farmacéuticos, limitan al ratón como modelo de enfermedad humana. Por lo tanto, existe la necesidad de generar modelos animales grandes que puedan imitar mejor la condición de enfermedad humana.

El uso de cerdos como modelo de enfermedades humanas han aumentado gradualmente debido a las semejanzas en características anatómicas y fisiológicas, dietas y

genoma; además de las ventajas de tasa de crecimiento rápida, intervalos generacionales cortos, camadas grandes y técnicas de reproducción estandarizadas (Hou et al., 2022). Entre los modelos de enfermedades más comunes se encuentran:

- Fenilcetonuria (Koppes et al., 2020).
- Inmunodeficiencia combinada grave (SCID). SCID es un grupo de síndromes congénitos raros causados por mutaciones en genes responsables del desarrollo de células T y B. La similitud entre el sistema inmunológico porcino y el humano, determinan la idoneidad de esta especie para generar modelos de enfermedades inmunológicas (Iqbal et al., 2019).
- Distrofia muscular de Duchenne (DMD) (Yu et al., 2016).
- Esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (H. Yang et al., 2014).
- Enfermedad de Huntington (EH) (Baxa et al., 2013).

Los primates no humanos (NHP) tiene una superioridad innata en comparación con otros modelos animales debido a las similitudes con los humanos en genética, fisiología, biología del desarrollo, comportamiento social y cognición. Se consideran los animales más cercanos a los humanos y, por lo tanto, podrían considerarse el modelo de enfermedades humanas más preciso (Guo & Li, 2015).

En 2014, se consiguió obtener el primero mono modificado genéticamente por técnica CRISPR (Niu et al., 2014). A partir de este momento se han desarrollado modelos de enfermedades humanas en primates no humanos como la distrofia muscular de Duchenne (DMD) mediante generación de mutaciones en el gen de la distrofina del mono (Chen et al., 2015) o la hipoplasia suprarrenal congénita ligada al cromosoma X e hipogonadismo hipogonadotrópico (AHC-HH humano) mediado por la inactivación del gen *dax1* en el mono (Kang et al., 2015).

La manipulación genética de dichos animales es complicada. El desarrollo de las técnicas de edición genética como es el sistema CRISPR-Cas acelerará potencialmente las investigaciones con modelos de NHP (Chen et al., 2016; Whitelaw et al., 2016). Algunos estudios proponen que en un futuro los NHP serán modelos animales de laboratorio de rutina en el estudio de la terapia génica, la detección de fármacos y la terapia de reemplazo celular (Hou et al., 2022).

A parte de las especies nombradas anteriormente, también se han generado modelos de enfermedades humanas en perros (Zou et al., 2015), ovejas y cabras (Kalds et al., 2019), peces (Hwang et al., 2013) y conejos entre otras (Li et al., 2019).

En conclusión, la técnica CRISPR ha permitido generar modelos animales homólogos a pacientes con enfermedades genéticas, avanzando, por tanto, hacia una medicina específica y precisa de pacientes determinados.

4.2.2.2 Aplicación del CRISPR en animales de ganadería

El descubrimiento de la técnica CRISPR como sistema de edición genética fácil y asequible ha revolucionado el campo de la mejora genética al ser capaces de introducir mutaciones que, hasta ahora, habían tenido que ir seleccionándose mediante cruces de animales. Este proceso clásico de mejora genética es tedioso y necesita de muchas generaciones para observar resultados, influyendo además la heredabilidad del carácter a mejorar (Navarro-Serna et al., 2020).

La principal ventaja que ha aportado el sistema CRISPR es la capacidad de generar, de una forma simple, las mutaciones mejorantes en animales en una única generación; desde relacionadas con mejorar perfiles de resistencias a enfermedades, hasta mutaciones en genes para aumentos de producción de carne u otras características productivas. Además, los animales de ganadería también se han usado como modelos de enfermedades humanas. En este apartado nos centraremos en las mejoras a animales de producción en parámetros productivos o asociados al manejo en granjas.

4.2.2.2.1 Características productivas: aumento de la producción de masa muscular en cerdos, ovejas y cabras.

El aumento de peso de las canales de animales y, por tanto, la mayor generación de carne es uno de los grandes objetivos de la ganadería. El gen MSTN (codificante de la miostatina) es un regulador negativo del desarrollo del músculo esquelético y su supresión da como resultado un mayor crecimiento muscular. En ganado vacuno, la selección animal clásica dirigida a hacer cruces entre animales mejorantes con mayores áreas musculares ha llevado a la selección indirecta de mutaciones que generan la inactivación de MSTN. La supresión, por tanto, de este gen explica el fenotipo de doble musculatura exhibido en las razas de ganado vacuno azul belga y piamontés (Kambadur et al., 1997).

Mediante la edición genética es posible generar estas mutaciones en especies en las que no se ha generado de manera espontánea. Hay diversos artículos que demuestran la capacidad de generar esta mutación en animales como cerdos, ovejas o cabras. Tanto en cerdos como ovejas la técnica consiste en la modificación de fibroblastos embrionarios primarios cuyos núcleos serían donantes para la transferencia nuclear generando lechones o corderos clonados editados (Bi et al., 2016; Y. Zhang et al., 2019); sin embargo, en cabras, la introducción de los

reactivos CRISPR se lleva a cabo en embriones mediante microinyección de ARNm de Cas9 y ARNsg dirigidos a *MSTN* (Wang et al., 2018). En el último estudio mencionado, también se modificó el gen *FGF5* del que se hablará a continuación (Figura 13).

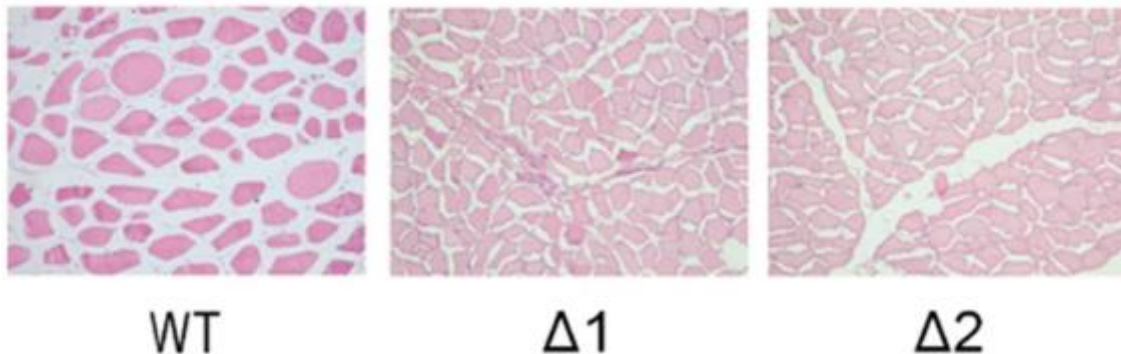


Figura13: Imágenes representativas (aumento de 100x) de secciones de músculo teñidas de lechones no mutados (WT) y mutados *MSTN* KO ($\Delta 1$, $\Delta 2$) para comparar la cantidad y el tamaño de la miofibra en una unidad de área idéntica (Bi et al., 2016).

Siguiendo con el objetivo de una mayor generación de masa muscular; en ganado ovino, se han desarrollado sistemas CRISPR-Cas modificados y mejorados para generar otras mutaciones con el mismo fin. Entre ellas destaca, la inactivación del gen *SOCS2* mediante el cambio de una sola base. El gen *SOCS2* es un regulador negativo de los procesos biológicos mediados por varias citoquinas, una de las funciones principales es la regulación de la señalización de GH (hormona del crecimiento) durante el crecimiento y el desarrollo; afectando, por tanto, al metabolismo, el desarrollo del músculo esquelético y la respuesta a la infección. La mutación en una sola base de este gen anula por completo la afinidad de unión de *SOCS2* y el receptor de la hormona del crecimiento (GHR). Evitando la regulación negativa, se permite el desarrollo de ovejas fenotípicamente más pesadas y de mayor estatura. El experimento confirmó este hecho. Aun así, ninguno de los tres corderos nacidos estuvo exentos de efectos secundarios de la técnica como mosaicismo y efectos *off target* (S. Zhou et al., 2019).

4.2.2.2 Características productivas: mejora de la lana

Tanto las ovejas como las cabras (raza cachemira), constituyen la fuente principal de lana. Como parámetro económico, es de interés la mejora animal en este ámbito enfocada a aportar una mayor valía económica. Hay genes que determinan factores relacionados con la cantidad y la calidad de lana producida. Es de esperar, por tanto, que ya se hayan desarrollado experimentos en este sector.

El gen *FGF5* es un inhibidor dominante de la longitud y el crecimiento de la fibra. Se ha comprobado que, tanto en ovejas como en cabras cachemira (especial interés económico), la inactivación de este gen lleva a una mayores cantidades y fibras de lana más largas. Además, es

probable que los fenotipos de animales modificados genómicamente puedan transmitirse a las siguientes generaciones. En este caso, el método de entrega de reactivos CRISPR fue a través de microinyección de mRNA Cas9 y sgRNAs dirigidos al gen FGF5 en embriones de cabra (Wang et al., 2016).

Hay otros genes sobre los que también se han realizado pruebas de edición genética ya que regulan las características de la lana. Entre ellos se encuentra el gen ASIP, involucrado en el color de la lana (X. Zhang et al., 2017) o el gen EDAR, cuya expresión influye en el fenotipo, el crecimiento y el desarrollo del folículo piloso (Hao et al., 2018).

4.2.2.2.3 Características productivas: mejora de la leche

La leche de vaca es un alimento completo que contiene proteínas, grasas, carbohidratos y minerales. La leche de cabra tiene una composición nutricional similar, con altos porcentajes de grasas y proteínas. CRISPR-Cas9 se ha aplicado en vacas, ovejas y cabras para alterar las características de la leche mediante la inhibición de la expresión de proteínas no deseadas o mediante la aplicación de estrategias de desactivación de genes para enriquecer la leche con nuevos productos de expresión deseados (Kalds et al., 2019).

Entre las proteínas principales, se encuentra la beta-lactoglobulina (BLG) que constituye un importante alérgeno presente en el suero en la leche. La hidrólisis y el calor no suprimen la alergenicidad de BLG. Por tanto, puede generar reacciones alérgicas que afectan gravemente a la absorción y utilización de los nutrientes de los productos lácteos.

El uso del sistema CRISPR-Cas está enfocado a conseguir leche hipoalérgica, es decir, leche sin BLG. Para ello, es necesario la inactivación del gen codificante de dicha proteína.

En cabras la inactivación de dicho gen se ha llevado a cabo por dos métodos: inyección citoplasmática del sistema CRISPR-Cas9 en embriones en etapa de una célula de cabra (W. Zhou et al., 2017) y transferencia nuclear de fibroblastos modificados con Cas9/ARNg dando lugar a cabras modificadas genéticamente (Ni et al., 2014). Ambas técnicas han conseguido generar cabras con una producción baja o nula de proteína BLG.

En ganado bovino, el gen de la beta-lactoglobulina está duplicado y representado por dos genes estrechamente relacionados, el propio BLG (PAEP) y el gen similar a BLG (LOC100848610). En 2021, se obtuvo, por primera vez, una línea de fibroblastos embrionarios con knockout de los genes PAEP y LOC100848610 mediante el sistema CRISPR-Cas9 (Singina et al., 2021).

Por otro lado, la melatonina es una hormona reguladora del ritmo circadiano presente en la leche de mamíferos además de en otros fluidos y tejidos. Es un potente antioxidante; los niveles bajos de melatonina se asocian con insomnio, hipertensión, problemas cardíacos y enfermedades neurodegenerativas (Acuña-Castroviejo et al., 2014). La posibilidad de crear animales que produzcan leche con altos niveles de melatonina puede resultar interesante para los consumidores.

Tanto la enzima Arylalkylamine N-acetyltransferase [(AANAT or serotonin N-acetyltransferase (SANT)] como la enzima acetylserotonin methyltransferase (ASMT) se consideran limitantes de la producción de melatonina. La sobreexpresión de estas enzimas se relaciona con altos niveles de melatonina según estudios en plantas. Estos datos se han corroborado en cabras mediante la inyección de mRNA de Cas9, el sgRNA y los vectores linealizados pBC1-AANAT y pBC1 - ASMT en el citoplasma de embriones pronucleares. El resultado fue, la creación de animales editados capaces de producir niveles significativamente altos de melatonina en la leche en comparación animales control no modificados. Previo al experimento en animales, se comprobó *in vitro* que AANAT y ASMT se transfirieron con éxito a las líneas celulares epiteliales mamarias y aumentaron significativamente la producción de melatonina en el medio de cultivo (Ma et al., 2017).

4.2.2.2.4 Características productivas: mejora de resistencia a enfermedades

Según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2018), la tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad bacteriana crónica de los animales causada por el complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, principalmente por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). Es una importante enfermedad infecciosa del ganado bovino que produce un estado general de neumonía, pérdida de peso y, a la larga, la muerte. El gen de la proteína de macrófagos 1 asociada a la resistencia natural (NRAMP1) está asociado con la resistencia innata a patógenos intracelulares, como *Mycobacterium*, *Leishmania*, *Salmonella*, y *Brucella*. La sobreexpresión de NRAMP1 bovino puede reducir la multiplicación de *M. bovis* en líneas concretas de macrófagos (Barthel et al., 2001). Una de las aplicaciones del CRISPR en este campo, es la inserción de gen NRAMP1 inducida por un proceso de HDR después de generar una sola rotura de una sola hebra inducida por Cas9 en fibroblastos fetales bovinos. La posterior transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) permite generar embriones que teóricamente expresarán este gen en mayor medida. Este hecho se comprobó experimentalmente; demostrando que, la inserción de NRAMP1 mediada por Cas9 proporcionó al ganado una mayor resistencia a la

tuberculosis. Aun así, los efectos *off-target* sigue siendo un problema en este sistema (Y. Gao et al., 2017).

El síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) es la enfermedad porcina de mayor importancia económica en América del Norte, Europa y Asia. El agente causal, el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV). Se ha sugerido que CD163 es el receptor para la entrada de PRRSV en las células (Whitworth et al., 2016). La aplicación de CRISPR-Cas se ha enfocado a generar una inactivación de este gen que evite el reconocimiento vírico celular y por tanto la infección. En un primer estudio, se consiguió generar cerdos que carecían de funciones CD163 a través de la inyección de cigotos *in vitro* y la modificación de células somáticas seguida de SCNT (Whitworth et al., 2014). Posteriormente, en 2016, se comprobó que estos animales son resistentes al aislado de PRRSV NVSL 97-7895 (cepa del virus productor del PRRS). Al exponerlos a dicha cepa, no experimentaron viremia ni signos clínicos (Whitworth et al., 2016).

En relación con el PRRS, se han desarrollado estrategias de diagnóstico visual, sensible y específico basadas en la detección de ácidos nucleicos mediante la aplicación de técnicas CRISPR-Cas modificadas (Chang et al., 2020).

Recientemente también se han producido experimentalmente cerdos editados en el gen CD163 mediante la introducción de reactivos CRISPR-Cas a través de electroporación en cigotos fertilizados *in vitro* (Tanihara et al., 2021).

4.2.2.2.5 Mejora de manejo: vacas sin cuernos y mejora del mantenimiento térmico porcino

En la ganadería moderna, el ganado con cuernos presenta un mayor riesgo de lesiones entre sí y para los ganaderos. El manejo cada vez más intensivo del ganado lechero (altas concentraciones de animales y gran manejo reproductivo) hace que el descornado sea imprescindible. Esta práctica está asociada con estrés y dolor en los terneros y plantea preocupaciones sobre el bienestar animal (McConnachie et al., 2019). De forma natural, la mayoría de los bovinos de carnes no desarrollan cuernos. Esto es debido a una inserción-delección de 202 pares de bases (variante Polled Celtic).

La imitación de esta mutación en ganado lechero podría ser una gran ventaja. En 2020 se realizó un experimento con la finalidad de generar crías sin cuernos de un toro Holstein-Friesian. Para ello, se aisló la variante celta sin cuernos del genoma de una vaca Angus y se integró en el genoma de fibroblastos tomados del toro con cuernos de raza Holstein-Friesian usando el sistema CRISPR-Cas. Los fibroblastos modificados sirvieron como células donantes para la transferencia nuclear de células somáticas y los embriones reconstruidos se transfirieron

a receptores sincronizados. El resultado fue exitoso; se consiguió la preñez de dos receptoras; uno de los fetos se abortó para realizar un análisis macroscópico e histológico y otro de los fetos nació mostrando fenotipo sin cuernos (Schuster et al., 2020). A continuación, en la Figura 14 se plasman dichos resultados.

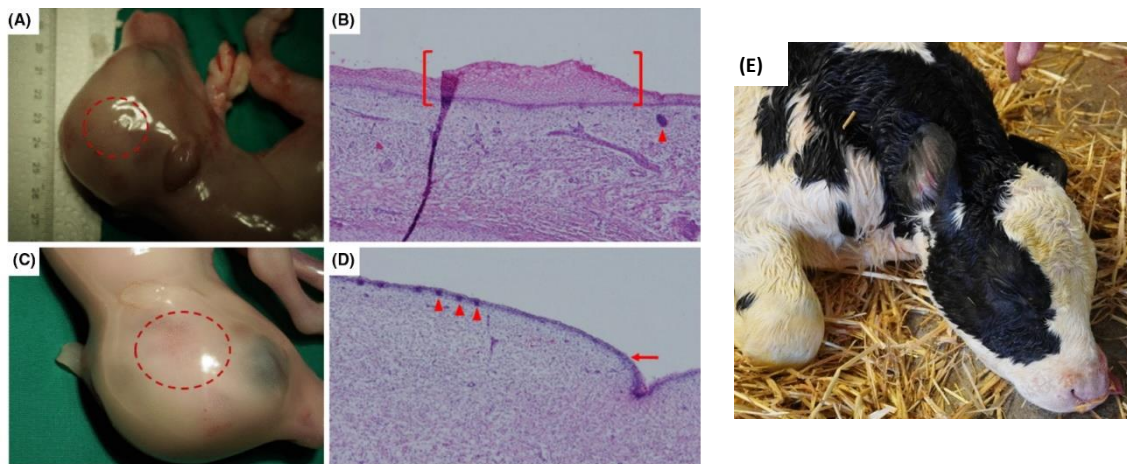


Figura14: (A) y (B) Análisis fenotípico de feto no mutado. (C) y (D) Análisis fenotípico de feto mutado. (E) Ternero mutado sin cuernos nacido por cesárea. (A) La yema del cuerno fetal está encerrada en un círculo rojo. (B) El análisis histológico de la piel frontal con una epidermis engrosada con 11 a 13 capas de queratinocitos vacuolados (corchete rojo). No se detectaron folículos pilosos fetales (triángulo rojo) en las capas dérmicas debajo de la yema del cuerno fetal. (C) Piel frontal fenotípicamente lisa. (D) Al análisis histológico no hay capa epidérmica engrosa, solo se aprecia de una a tres capas de queratinocitos (flecha roja). No se detectaron folículos pilosos fetales (triángulos rojos) en las capas dérmicas debajo de esta área (Schuster et al., 2020).

En el sector porcino intensivo, una de las aplicaciones del CRISPR-Cas relacionadas con la mejora del bienestar animal, consiste en la introducción del gen codificante de la proteína de desacoplamiento 1 (UCP1). Dicha proteína, es responsable de la termogénesis mediada por tejido adiposo marrón y desempeña un papel fundamental en la protección contra el frío y la regulación de la homeostasis energética. Los cerdos con la UPC1 insertada (UCP1 knock-in o UCP1 KI) mostraron una capacidad mejorada para mantener la temperatura corporal, una disminución de la deposición de grasa y un mayor porcentaje de carne magra. Dichos animales son un recurso potencialmente valioso para la industria porcina que puede mejorar el bienestar de los cerdos y reducir las pérdidas económicas (Q. Zheng et al., 2017).

4.2.2.2.6 Edición genética relacionada con parámetros reproductivos

El trasplante de células madre espermatogoniales (SSC) es una técnica experimental para la transferencia de la línea germinal entre machos donantes y receptores. Es interesante desde el punto de vista productivo para aumentar el número de gametos de machos mejorantes.

Un aspecto clave para el éxito del trasplante de SSC es el requisito de que los receptores masculinos tengan túbulos seminíferos intactos y poblaciones de células de soporte somáticas, pero que carezcan de SSC y otras células germinales. El gen NANOS2, interviene en el mantenimiento de la línea germinal masculina, sin embargo, su inactivación no influye en el correcto desarrollo de los túbulos seminíferos y tejido intersticial testicular.

En 2019, mediante la tecnología CRISPR-Cas9 se consiguió producir mutaciones inactivadoras del gen NANOS2 en cerdos domésticos (Park et al., 2017). Posteriormente, se amplió el estudio a otras especies como cabras. Además, se demostró que los testículos de cerdos y cabras machos con deficiencia de gen NANOS2 y, por tanto, con ablación completa de la línea germinal, pueden ser huésped para la regeneración de la espermatogénesis a partir de SSC trasplantadas de animales no modificados (Ciccarelli et al., 2020).

4.2.2.3 Aplicación del CRISPR en animales domésticos: perro, gato y caballo

El CRISPR en animales domésticos es un área en desarrollo. Las técnicas de edición genética están ampliamente aplicadas en el sector de animales de ganadería y en animales de experimentación, es decir, a día de hoy se está aplicando en el mundo animal. Sin embargo, los objetivos son distintos a los de la clínica o curación de enfermedades veterinarias.

La importancia creciente de las mascotas en sociedades desarrolladas así como la mayor concienciación en bienestar animal hace que la aplicación de la edición genética en animales de compañía con finalidad terapéutica sea un área de investigación muy interesante. Se espera que haya una transferencia de conocimientos desde la medicina humana y se usen los conocimientos adquiridos en edición genética animal en la medicina animal. Esto podría suponer una revolución en el tratamiento del cáncer animal, tratamiento de mutaciones genéticas resultado de selección genética racial, etc.

Uno de los principales estudios realizados, reveló una aplicación puramente terapéutica de CRISPR-Cas en animales de compañía. Fue en un semental equino de raza Quarter Horse en 2020. El experimento consistió en la corrección de una mutación del gen GEB1 en fibroblastos. Dicha mutación genera una enfermedad autosómica recesiva conocida como Deficiencia de la enzima ramificadora de glucógeno (GBED). Esta enfermedad altera gravemente el metabolismo del glucógeno y es mortal en animales con la mutación en homocigosis. Además, causa abortos. La enfermedad, está asociada a la raza American Quarter Horse como resultado de la selección fenotípica de la raza (Pinzon-Arteaga et al., 2020).

4.2.2.4 Xenotrasplantes y nuevas técnicas para creación de órganos.

Los avances en medicina, la reducción de accidentes de tráfico y el aumento de la esperanza de vida entre otros, hace que la donación de órganos no sea suficiente para tratar todos los pacientes que se encuentran en listas de esperas. Este hecho hace muy interesante la investigación y el desarrollo de los xenotrasplantes, es decir, trasplantes de órganos entre especies, en concreto de animales a humanos.

La especie porcina es la especie de elección para este tipo de trasplantes tanto por su parecido fisiológico y anatómico como por sus características reproductivas: tamaño relativamente grande de la camada y el corto período de espera hasta la madurez sexual (Rydzek et al., 2021).

La técnica de CRISPR también ha sido y está siendo de gran importancia para el perfeccionamiento y evolución de los xenotrasplantes. Los fines principales a los que se dirige la técnica son: eliminar proteínas o sustancias propias del cerdo que generen reacciones de inmunológicas fuertes en las personas hasta eliminar retrovirus endógenos insertados en el genoma de células porcinas.

En primer lugar, los fenómenos inmunes que propician los rechazos de los órganos xenotrasplantados son los siguientes: rechazo hiperagudo (HAR), mediado por anticuerpos presentes en el receptor; el rechazo agudo vascular (AHXR), dependiente de anticuerpos, macrófagos y células natural killer (NK) y el rechazo celular agudo (ACR) en conjunción con una desregulación del sistema de coagulación del receptor generado por las reacciones anteriormente mencionadas. El sistema CRISPR-Cas ha permitido la desactivación de genes específicos codificadores de los antígenos inmunocompetentes; por tanto, ha supuesto un avance en la disminución de las reacciones inmunes. En el Anexo 3 se adjunta una tabla que muestra las modificaciones llevadas a cabo en cerdos mediante el sistema CRISPR-Cas con finalidad de reducir el rechazo inmunológico.

Los cambios genéticos más completos por CRISPR-Cas9 en el genoma porcino con fines de xenotrasplante se obtuvieron en 2020. Se crearon individuos con cuádruple knock-out de cerdo GGTA1, CMAH, β 4GalNT2 y β 2M y un knock-in de cinco genes humanos: CD46, CD55, CD59, HO1 y A20 (Fischer et al., 2020).

Por otro lado, uno de los logros más prometedores en la investigación del xenotrasplante de cerdo a humano más allá de la eliminación de las barreras inmunitarias fue la inactivación de los retrovirus endógenos porcinos (PERV) y la inserción del gen RSAD2 porcino

en el locus Rosa26 porcino. Este gen codifica para la proteína RSAD2 con actividad antiviral (Xie et al., 2020; L. Yang et al., 2015).

Uno de los objetivos finales de la medicina regenerativa es la generación de órganos específicos de pacientes a partir de células madre pluripotentes (PSC). Tanto las ovejas como los cerdos son huéspedes potenciales para el crecimiento de órganos humanos a través de la técnica de complementación de blastocistos. Esta técnica consiste en inyectar células madre pluripotentes de un donante en un embrión huésped con organogénesis deshabilitada, lo que permite que las células del donante compensen los órganos o tejidos faltantes (C. Zheng et al., 2021). Aunque es una técnica complicada en especies alejadas evolutivamente; ya se ha llevado a cabo el primer paso, consiguiendo crear tanto ovejas como cerdos con pancreatogénesis discapacitada.

La inactivación del gen PDX1, un gen crítico para el desarrollo del páncreas, resultó en el desarrollo de fetos PDX1^{-/-} tanto de ovejas como de cerdos. La técnica de inactivación de PDX1 en ovejas se realizó por dos métodos, dando mejores resultados la microinyección con ARNm de Cas9 y ARNsg de PDX1 en ovocitos en metafase II (Vilarino et al., 2017a). Por otra parte, la inactivación en cerdo se dio mediante una coinyección intracitoplasmática de mRNA de Cas9 y sgRNA1 de PDX1 en cigotos (J. Wu et al., 2017)

En el futuro, combinar la edición de genes con CRISPR-Cas9 y la complementación de PSC podría resultar en un enfoque poderoso para la generación de órganos humanos (Vilarino et al., 2017b).

4.2.2.5 Edición genética parasitaria y reacción en cadena mutagénica.

Las mutaciones generadas por el sistema CRISPR en genoma de células/individuos, solo cambiará su fenotipo si son mutaciones incorporadas en los dos alelos. Es decir, los individuos/células con un solo alelo recesivo mutado (individuo con la mutación en heterocigosis) no expresarán fenotipo de mutante; mientras que, si poseen los dos alelos con la misma mutación sí que lo expresarán (individuos con mutación en homocigosis) (Montoliu, 2019).

Suponiendo la teoría anterior, la edición genética parasitaria o de organismos menores, resulta muy complicada. Mediante inyección de reactivos CRISPR podemos generar un individuo con la mutación incorporada en los dos alelos, pero, esta mutación, se diluiría en pocos días al reproducirse con otros parásitos no mutantes. La novedad descrita a continuación propone un método para conseguir que una mutación se expanda en una población autónomamente, sin necesidad de inyectar reactivos CRISPR en cada organismo.

La reacción en cadena mutagénica (MCR) o impulso genético es un método que usa los reactivos CRISPR para generar individuos homocigotos para una mutación a partir de un genotipo heterocigótico para esa misma mutación. Consiste en la introducción en el genoma de una construcción que incorpora las siguientes secuencias génicas (Gantz & Bier, 2015; Montoliu, 2019):

- Gen codificante de la proteína Cas9.
- Guías de ARN homólogas a una secuencia del genoma del organismo objetivo.
- Secuencias laterales homólogas a la zona donde va a hacer el corte la proteína Cas9.

Esta construcción se introduce en el ADN celular. Lo que se busca es que el fragmento se transcriba para dar lugar a Cas9 que generarán cortes en sitios determinados por las guías de ADN. La reparación se espera que sea por homología de secuencias al estar disponible en la célula el fragmento con las secuencias laterales homólogas a la zona de corte (Gantz & Bier, 2015).

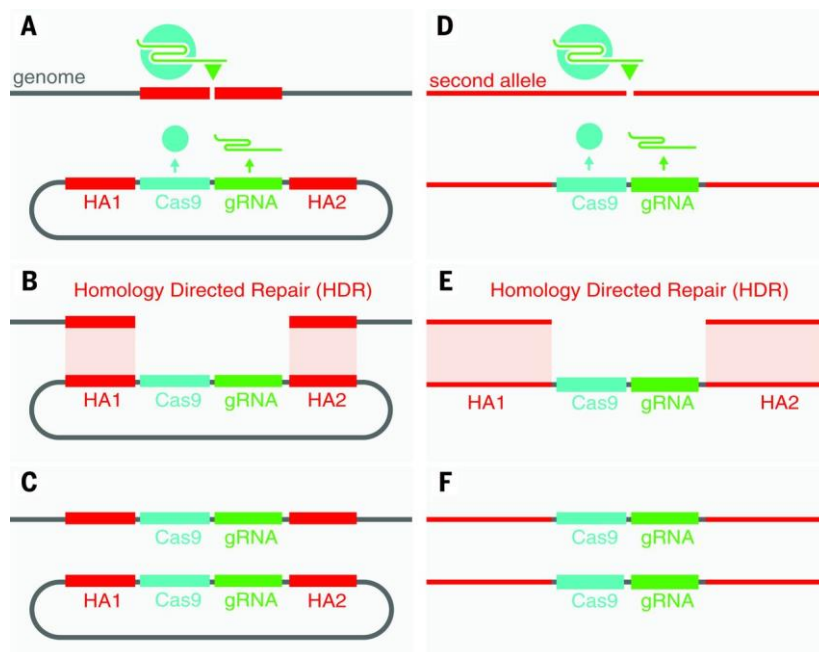


Figura 15: Representación gráfica del mecanismo de acción de la reacción en cadena mutagénica (Gantz & Bier, 2015).

Si se da el proceso como se espera, al incorporarse la construcción en el genoma de la célula, el procedimiento de corte y reparación por introducción de fragmento de ADN disponible se repetiría de forma infinita generando individuos homocigóticos para ese gen. De esta manera, individuos heterocigóticos para el gen mutante acabarían siendo homocigóticos por

funcionamiento de la construcción (Figura 15). Entonces, trasladarían al menos una copia del alelo mutante a la descendencia, que por el mismo proceso también acabarían siendo homocigótico, así sucesivamente (Gantz & Bier, 2015).

Como se puede apreciar en la Figura 16, la importancia de esta construcción viene de la posibilidad de alterar las leyes mendelianas por las cuales los hijos de individuos homocigóticos para distintos caracteres serían heterocigóticos para dichos caracteres mostrando el fenotipo del dominante, pero rescatándose el carácter recesivo en generaciones posteriores (Lau, 2015).

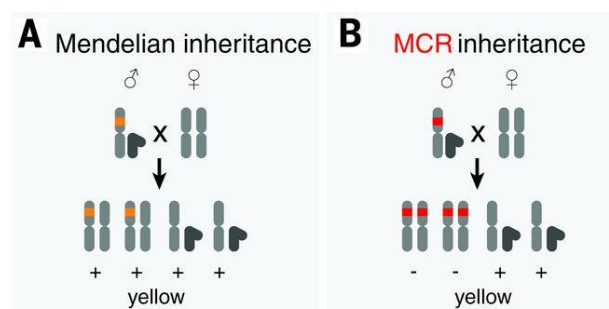


Figura 16: Herencia mendeliana de un rasgo ligado al cromosoma X vs herencia teórica basada en MCR de un gen mutante ligado al cromosoma X (Gantz & Bier, 2015).

La aplicación del impulso genético podría ser, a priori, muy útil para la eliminación de mosquitos transmisores de enfermedades o control de plagas entre otros, aun así, esto son campos que aún están en investigación por la enorme problemática que podría generar el mal uso de sistemas tan potentes (Gantz et al., 2015; Unckless, Messer, & Clark, 2015; Unckless, Messer, Connallon, et al., 2015).

4.2.2.6 Desextinción de especies.

La “desextinción” es el proceso de creación de un organismo que es, o se parece mucho, a un miembro de una especie extinta (Martinelli et al., 2014).

Este término surgió en 2012 y, a día de hoy, está ganando cada vez más popularidad en parte gracias a que las tecnologías emergentes de la ingeniería genética están abriendo un amplio abanico de nuevas posibilidades en el campo. Las estrategias más prometedoras para lograr la eliminación de la extinción son la reproducción cruzada, la clonación entre especies y la ingeniería genética (Sherkow & Greely, 2013)

Respecto a las técnicas de ingeniería genética, en concreto el sistema CRISPR-Cas, permite emplear secuencias de ADN incompleto obtenidas de la especie extinta como molde para cambiar fragmentos en el ADN del genoma de sus parientes vivos más cercanos y de este

modo emular el ADN antiguo. La posterior transferencia nuclear de células somáticas permitiría crear embriones de la especie extinta (Shrock & Güell, 2017).

La ventaja que ofrece esta herramienta es que no necesita que el ADN extinto se encuentre perfectamente conservado como sucede en la clonación (Sherkow & Greely, 2013).

La dificultad es que, cuanto mayor sea la distancia evolutiva entre el individuo extinto y el actual, menos fiable será la secuenciación del genoma o incluso puede suceder que la especie extinta no tenga parientes vivos cercanos (Shapiro, 2015).

Uno de los proyectos más ambiciosos propuestos en relación con la desextinción de especies es el diseñado por George Church. El objetivo es desextinguir el mamut lanudo a partir del elefante asiático mediante el uso de la técnica CRISPR-Cas (Callaway, 2015).

4.2.3 Implicaciones éticas

Los avances en tecnologías de edición del genoma han propiciado cambios fundamentales en genética. Entre ellas, destaca especialmente la tecnología CRISPR-Cas por sus ventajas como su fácil manejo, alta precisión y bajo coste (Ayanoglu et al., 2020). El gran alcance de esta técnica, el potencial cambio que puede generar en los genomas y la importancia que esto acarrea determinan la necesidad de que haya una regulación bioética que monitoree el uso de la técnica en beneficio de las sociedades; actuando en base a principios morales y éticos y respetando los derechos fundamentales (Shinwari et al., 2018).

Los principales dilemas éticos que acarrea el descubrimiento de esta potente herramienta genética son los siguientes:

- Discusión acerca de si es posible la edición del genoma humano en la línea germinal; ya sea en óvulos fertilizados, gametos o embrión en primeras divisiones. La edición del genoma de la línea germinal conduce a problemas bioéticos como:
 - Aparición de cambios indeseables en el genoma y su potencial transmisión a generaciones posteriores.
 - De quién y cómo se obtiene el consentimiento informado.
 - Posible diferencia social que esto puede suponer si los costes solo permitiesen a ciertas esferas de la población la edición génica en su línea de descendientes generando posibles ventajas en inteligencia o salud (Ayanoglu et al., 2020; Baltimore et al., 2015).
- Edición del genoma de células somáticas con finalidades no terapéuticas; para la mejora de habilidades humanas (transhumanismo). Socialmente, no sería ética la existencia de

clases de humanos con habilidades mejoradas según poder de realizarse edición genética o no (Rodríguez, 2016).

- Identidad y derechos de animales quimeras (animales con células nerviosas y germinales humanas para el desarrollo de órganos humanos). Los dos temas principales se pueden resumir en la disrupción del orden de la naturaleza y la forma en la que se debería tratar según se acepte como humano o como animal (Degrazia, 2019; Gonzalez-Avila et al., 2021).
- Bienestar animal en el desarrollo todo tipo de experimentos relacionados con la técnica. Siendo aquellos en los que el objetivo es generar “individuos enfermos” los más controvertidos (Eriksson et al., 2018).
- Riesgos de la liberación accidental de organismos modificados mediante impulso genético. Posibilidad de transferencia de mutaciones por errores de la técnica en una gran población afectando a la integridad medio ambiental (Esvelt et al., 2014; Shinwari et al., 2018).

En conclusión, estos y otros temas relacionados con las nuevas aplicaciones de sistema CRISPR-Cas que de seguro aparecerán; requieren debates multidisciplinarios, cuidadosos y completos para evaluar los riesgos, incluir medidas de seguridad y proteger contra posibles usos indebidos.

5. CONCLUSIONES

Como conclusión, el CRISPR-Cas es una técnica de edición genética usada en gran medida sobre animales.

Se han descrito múltiples aplicaciones en el ámbito veterinario: desde su uso en animales de ganadería para la mejora de parámetros productivos o de resistencia a enfermedades, la creación de modelos experimentales en medicina humana, xenotrasplantes, impulso genético o en la desextinción de especies.

Aunque esta técnica es muy novedosa y utilizada en muchos laboratorios por su facilidad de uso y asequibilidad económica, no hay que descuidar las desventajas que también presenta, así como posibles problemas éticos y filosóficos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M. E., Lima-Cabello, E., López, L. C., Rosales-Corral, S., Tan, D.-X., & Reiter, R. J. (2014). Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *71*(16), 2997–3025. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1579-2>
- Ayanoğlu, F. B., Elçin, A. E., & Elçin, Y. M. (2020). Bioethical issues in genome editing by CRISPR-Cas9 technology. *Turkish Journal of Biology = Turk Biyoloji Dergisi*, *44*(2), 110–120. <https://doi.org/10.3906/biy-1912-52>
- Baltimore, D., Berg, P., Botchan, M., Carroll, D., Charo, R. A., Church, G., Corn, J. E., Daley, G. Q., Doudna, J. A., Fenner, M., Greely, H. T., Jinek, M., Martin, G. S., Penhoet, E., Puck, J., Sternberg, S. H., Weissman, J. S., & Yamamoto, K. R. (2015). Biotechnology. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science (New York, N.Y.)*, *348*(6230), 36–38. <https://doi.org/10.1126/science.aab1028>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, *315*(5819), 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Barthel, R., Feng, J., Piedrahita, J. A., McMurray, D. N., Templeton, J. W., & Adams, L. G. (2001). Stable transfection of the bovine NRAMP1 gene into murine RAW264.7 cells: effect on *Brucella abortus* survival. *Infection and Immunity*, *69*(5), 3110–3119. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.3110-3119.2001>
- Baxa, M., Hruska-Plochan, M., Juhas, S., Vodicka, P., Pavlok, A., Juhasova, J., Miyanochara, A., Nejime, T., Klima, J., & Macakova, M. (2013). A transgenic minipig model of Huntington's Disease. *Journal of Huntington's Disease*, *2*(1), 47–68.
- Bedell, V. M., Wang, Y., Campbell, J. M., Poshusta, T. L., Starker, C. G., Krug II, R. G., Tan, W., Penheiter, S. G., Ma, A. C., Leung, A. Y. H., Fahrenkrug, S. C., Carlson, D. F., Voytas, D. F., Clark, K. J., Essner, J. J., & Ekker, S. C. (2012). In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*, *491*(7422), 114–118. <https://doi.org/10.1038/nature11537>
- Bi, Y., Hua, Z., Liu, X., Hua, W., Ren, H., Xiao, H., Zhang, L., Li, L., Wang, Z., Laible, G., Wang, Y., Dong, F., & Zheng, X. (2016). Isozygous and selectable marker-free MSTN knockout cloned pigs generated by the combined use of CRISPR/Cas9 and Cre/LoxP. *Scientific Reports*, *6*(1), 31729. <https://doi.org/10.1038/srep31729>
- Brinster, R. L., Braun, R. E., Lo, D., Avarbock, M. R., Oram, F., & Palmiter, R. D. (1989). Targeted correction of a major histocompatibility class II E alpha gene by DNA microinjected into mouse eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(18), 7087–7091. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.18.7087>
- Callaway, E. (2015). Mammoth genomes hold recipe for Arctic elephants. *Nature*, *521*(7550), 18.
- Carroll, D. (2008). Progress and prospects: Zinc-finger nucleases as gene therapy agents. *Gene Therapy*, *15*(22), 1463–1468. <https://doi.org/10.1038/gt.2008.145>

- Carroll, D. (2011). Genome Engineering With Zinc-Finger Nucleases. *Genetics*, *188*(4), 773–782. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.131433>
- Cathomen, T., & Keith Joung, J. (2008). Zinc-finger Nucleases: The Next Generation Emerges. *Molecular Therapy*, *16*(7), 1200–1207. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/mt.2008.114>
- Chang, Y., Deng, Y., Li, T., Wang, J., Wang, T., Tan, F., Li, X., & Tian, K. (2020). Visual detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using CRISPR-Cas13a. *Transboundary and Emerging Diseases*, *67*(2), 564–571. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tbed.13368>
- Charlesworth, C. T., Deshpande, P. S., Dever, D. P., Camarena, J., Lemgart, V. T., Cromer, M. K., Vakulskas, C. A., Collingwood, M. A., Zhang, L., Bode, N. M., Behlke, M. A., Dejene, B., Cieniewicz, B., Romano, R., Lesch, B. J., Gomez-Ospina, N., Mantri, S., Pavel-Dinu, M., Weinberg, K. I., & Porteus, M. H. (2019). Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nature Medicine*, *25*(2), 249–254. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0326-x>
- Chen, Y., Niu, Y., & Ji, W. (2016). Genome editing in nonhuman primates: approach to generating human disease models. *Journal of Internal Medicine*, *280*(3), 246–251. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/joim.12469>
- Chen, Y., Zheng, Y., Kang, Y., Yang, W., Niu, Y., Guo, X., Tu, Z., Si, C., Wang, H., Xing, R., Pu, X., Yang, S.-H., Li, S., Ji, W., & Li, X.-J. (2015). Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9. *Human Molecular Genetics*, *24*(13), 3764–3774. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv120>
- Chinwalla, A. T., Cook, L. L., Delehaunty, K. D., Fewell, G. A., Fulton, L. A., Fulton, R. S., Graves, T. A., Hillier, L. W., Mardis, E. R., McPherson, J. D., Miner, T. L., Nash, W. E., Nelson, J. O., Nhan, M. N., Pepin, K. H., Pohl, C. S., Ponce, T. C., Schultz, B., Thompson, J., ... Group, M. of the M. G. A. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, *420*(6915), 520–562. <https://doi.org/10.1038/nature01262>
- Ciccarelli, M., Giassetto, M. I., Miao, D., Oatley, M. J., Robbins, C., Lopez-Biladeau, B., Waqas, M. S., Tibary, A., Whitelaw, B., Lillico, S., Park, C.-H., Park, K.-E., Telugu, B., Fan, Z., Liu, Y., Regouski, M., Polejaeva, I. A., & Oatley, J. M. (2020). Donor-derived spermatogenesis following stem cell transplantation in sterile NANOS2 knockout males. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(39), 24195–24204. <https://doi.org/10.1073/pnas.2010102117>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*, *339*(6121), 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Crudele, J. M., & Chamberlain, J. S. (2018). Cas9 immunity creates challenges for CRISPR gene editing therapies. *Nature Communications*, *9*(1), 3497. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05843-9>

- de la Fuente-Núñez, C., & Lu, T. K. (2017). CRISPR-Cas9 technology: applications in genome engineering, development of sequence-specific antimicrobials, and future prospects. *Integrative Biology*, *9*(2), 109–122. <https://doi.org/10.1039/c6ib00140h>
- Degrazia, D. (2019). Human-Animal Chimeras, “Human” Cognitive Capacities, and Moral Status. *Hastings Center Report*, *49*(5), 33–34.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, *471*(7340), 602–607. <https://doi.org/10.1038/nature09886>
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J. E., Labonté, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Romero, D. A., Horvath, P., & Moineau, S. (2008). Phage Response to CRISPR-Encoded Resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, *190*(4), 1390–1400. <https://doi.org/10.1128/JB.01412-07>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, *346*(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Eriksson, S., Jonas, E., Rydhmer, L., & Röcklinsberg, H. (2018). Invited review: Breeding and ethical perspectives on genetically modified and genome edited cattle. *Journal of Dairy Science*, *101*(1), 1–17.
- Esvelt, K. M., Mali, P., Braff, J. L., Moosburner, M., Yaung, S. J., & Church, G. M. (2013). Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. *Nature Methods*, *10*(11), 1116–1121. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2681>
- Esvelt, K. M., Smidler, A. L., Catteruccia, F., & Church, G. M. (2014). Emerging technology: concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. *Elife*, *3*, e03401.
- Fattah, F. J., Lichter, N. F., Fattah, K. R., Oh, S., & Hendrickson, E. A. (2008). Ku70, an essential gene, modulates the frequency of rAAV-mediated gene targeting in human somatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(25), 8703–8708. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712060105>
- Fernández, A., Hayashi, M., Garrido, G., Montero, A., Guardia, A., Suzuki, T., & Montoliu, L. (2021). Genetics of non-syndromic and syndromic oculocutaneous albinism in human and mouse. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *34*(4), 786–799. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/pcmr.12982>
- Fischer, K., Rieblinger, B., Hein, R., Sfriso, R., Zuber, J., Fischer, A., Klinger, B., Liang, W., Flisikowski, K., & Kurome, M. (2020). Viable pigs after simultaneous inactivation of porcine MHC class I and three xenoreactive antigen genes GGTA1, CMAH and B4GALNT2. *Xenotransplantation*, *27*(1), e12560.
- Foss, D. v, Hochstrasser, M. L., & Wilson, R. C. (2019). Clinical applications of CRISPR-based genome editing and diagnostics. *Transfusion*, 1389–1399. <https://doi.org/10.1111/trf.15126>
- Friedland, A. E., Baral, R., Singhal, P., Loveluck, K., Shen, S., Sanchez, M., Marco, E., Gotta, G. M., Maeder, M. L., Kennedy, E. M., Kornepati, A. V. R., Sousa, A., Collins, M. A., Jayaram, H.,

- Cullen, B. R., & Bumcrot, D. (2015). Characterization of *Staphylococcus aureus* Cas9: a smaller Cas9 for all-in-one adeno-associated virus delivery and paired nickase applications. *Genome Biology*, *16*(1), 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0817-8>
- Fu, R., Fang, M., Xu, K., Ren, J., Zou, J., Su, L., Chen, X., An, P., Yu, D., & Ka, M. (2020). Generation of GGTA1^{-/-} β2M^{-/-} CIITA^{-/-} pigs using CRISPR/Cas9 technology to alleviate xenogeneic immune reactions. *Transplantation*, *104*(8), 1566–1573.
- Gaj, T., Gersbach, C. A., & Barbas, C. F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, *31*(7), 397–405. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.004>
- Gantz, V. M., & Bier, E. (2015). The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science*, *348*(6233), 442–444.
- Gantz, V. M., Jasinskiene, N., Tatarenkova, O., Fazekas, A., Macias, V. M., Bier, E., & James, A. A. (2015). Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(49), E6736–E6743. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521077112>
- Gao, P., Yang, H., Rajashankar, K. R., Huang, Z., & Patel, D. J. (2016). Type V CRISPR-Cas Cpf1 endonuclease employs a unique mechanism for crRNA-mediated target DNA recognition. *Cell Research*, *26*(8), 901–913. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.88>
- Gao, Y., Wu, H., Wang, Y., Liu, X., Chen, L., Li, Q., Cui, C., Liu, X., Zhang, J., & Zhang, Y. (2017). Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome Biology*, *18*(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1144-4>
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(39), E2579–E2586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
- Gonzalez-Avila, L. U., Vega-López, J. M., Pelcastre-Rodríguez, L. I., Cabrero-Martínez, O. A., Hernández-Cortez, C., & Castro-Escarpulli, G. (2021). The Challenge of CRISPR-Cas toward bioethics. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 1344.
- Guo, X., & Li, X.-J. (2015). Targeted genome editing in primate embryos. *Cell Research*, *25*(7), 767–768. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.64>
- Gupta, D., Bhattacharjee, O., Mandal, D., Sen, K., Dey, D., & Dasgupta, A. (2019). CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. *Life Science*. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116636>
- Hao, F., Yan, W., Li, X., Wang, H., Wang, Y., Hu, X., Liu, X., Liang, H., & Liu, D. (2018). Generation of Cashmere Goats Carrying an EDAR Gene Mutant Using CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing. *International Journal of Biological Sciences*, *14*(4), 427–436. <https://doi.org/10.7150/ijbs.23890>
- Hashimoto, M., & Takemoto, T. (2015). Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Scientific Reports*, *5*, 11315. <https://doi.org/10.1038/srep11315>

- Heckl, D., Kowalczyk, M. S., Yudovich, D., Belizaire, R., Puram, R. v, McConkey, M. E., Thielke, A., Aster, J. C., Regev, A., & Ebert, B. L. (2014). Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nature Biotechnology*, *32*(9), 941–946.
- Hilton, I. B., D’Ippolito, A. M., Vockley, C. M., Thakore, P. I., Crawford, G. E., Reddy, T. E., & Gersbach, C. A. (2015). Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature Biotechnology*, *33*(5), 510–517. <https://doi.org/10.1038/nbt.3199>
- Hou, N., Du, X., & Wu, S. (2022). Advances in pig models of human diseases. *Animal Models and Experimental Medicine*, *5*(2), 141–152. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ame2.12223>
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Peterson, R. T., Yeh, J. R. J., & Joung, J. K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, *31*(3), 227–229.
- Iqbal, M. A., Hong, K., & Choi, J. H. K. & Y. (2019). Erratum to: Severe combined immunodeficiency pig as an emerging animal model for human diseases and regenerative medicines. *BMB Reports*, *52*(12), 718–727. <https://www.bmbreports.org/journal/view.html?doi=>
- 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*(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Joanna, Z., Magdalena, H., Agnieszka, N.-T., Jacek, J., Ryszard, S., Zdzisław, S., Barbara, G., & Daniel, L. (2018). The production of UL16-binding protein 1 targeted pigs using CRISPR technology. *3 Biotech*, *8*(1), 1–8.
- Johnson, R. D., & Jasin, M. (2001). Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Biochemical Society Transactions*, *29*(Pt 2), 196–201. <https://doi.org/10.1042/0300-5127:0290196>
- Kalds, P., Zhou, S., Cai, B., Liu, J., Wang, Y., Petersen, B., Sonstegard, T., Wang, X., & Chen, Y. (2019). Sheep and Goat Genome Engineering: From Random Transgenesis to the CRISPR Era. *Frontiers in Genetics*, *10*, 750. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00750>
- Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T. P. L., & Bass, J. J. (1997). Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Research*, *7*(9), 910–915.
- Kampmann, M. (2018). CRISPRi and CRISPRa Screens in Mammalian Cells for Precision Biology and Medicine. *ACS Chemical Biology*, *13*(2), 406–416. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00657>
- Kang, Y., Zheng, B., Shen, B., Chen, Y., Wang, L., Wang, J., Niu, Y., Cui, Y., Zhou, J., & Wang, H. (2015). CRISPR/Cas9-mediated Dax1 knockout in the monkey recapitulates human AHC-HH. *Human Molecular Genetics*, *24*(25), 7255–7264.

- Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J., & Kim, J.-S. (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Research*, 24(6), 1012–1019. <https://doi.org/10.1101/gr.171322.113>
- Koppes, E. A., Redel, B. K., Johnson, M. A., Skvorak, K. J., Ghaloul-Gonzalez, L., Yates, M. E., Lewis, D. W., Gollin, S. M., Wu, Y. L., Christ, S. E., Yerle, M., Leshinski, A., Spate, L. D., Benne, J. A., Murphy, S. L., Samuel, M. S., Walters, E. M., Hansen, S. A., Wells, K. D., ... Nicholls, R. D. (2020). A porcine model of phenylketonuria generated by CRISPR/Cas9 genome editing. *JCI Insight*, 5(20), e141523. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.141523>
- Kuijpers, N. G. A., Chroumpi, S., Vos, T., Solis-Escalante, D., Bosman, L., Pronk, J. T., Daran, J.-M., & Daran-Lapujade, P. (2013). One-step assembly and targeted integration of multigene constructs assisted by the I-SceI meganuclease in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 13(8), 769–781. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12087>
- Lacadena, J.-R. (2016, December 21). Edición genómica: ciencia y ética. *Revista Iberoamericana de Bioética*, 1–14.
- Lau, E. (2015). Breaking Mendelian inheritance with CRISPR–Cas. *Nature Reviews Genetics*, 16(5), 258–259.
- Li, Q., Qin, Z., Wang, Q., Xu, T., Yang, Y., & He, Z. (2019). Applications of Genome Editing Technology in Animal Disease Modeling and Gene Therapy. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 689–698. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.05.006>
- Lieber, M. R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 181–211. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>
- Liu, C., Zhang, L., Liu, H., & Cheng, K. (2017). Delivery strategies of the CRISPR–Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *Journal of Controlled Release*, 266, 17–26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.012>
- Liu, X., Yagi, H., Saeed, S., Bais, A. S., Gabriel, G. C., Chen, Z., Peterson, K. A., Li, Y., Schwartz, M. C., Reynolds, W. T., Saydmohammed, M., Gibbs, B., Wu, Y., Devine, W., Chatterjee, B., Klena, N. T., Kostka, D., de Mesy Bentley, K. L., Ganapathiraju, M. K., ... Lo, C. W. (2017). The complex genetics of hypoplastic left heart syndrome. *Nature Genetics*, 49(7), 1152–1159. <https://doi.org/10.1038/ng.3870>
- Liu, Z., Dong, H., Cui, Y., Cong, L., & Zhang, D. (2020). Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 172. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01431-z>
- Ma, T., Tao, J., Yang, M., He, C., Tian, X., Zhang, X., Zhang, J., Deng, S., Feng, J., Zhang, Z., Wang, J., Ji, P., Song, Y., He, P., Han, H., Fu, J., Lian, Z., & Liu, G. (2017). An AANAT/ASMT transgenic animal model constructed with CRISPR/Cas9 system serving as the mammary gland bioreactor to produce melatonin-enriched milk in sheep. *Journal of Pineal Research*, 63(1), e12406. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jpi.12406>
- Madariaga-Perpiñán, I., Duque-Restrepo, J. C., Ayala-Ramírez, P., & García-Robles, R. (2020). DNA Edition: ad portas of a revolution in genetic manipulation. *Iatreia*, 33(3), 262–272.

- Maestre, A., & Patiño, P. J. (2016). Daño y reparación del ADN. *Fondo Editorial Biogénesis*, 133–143.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Scott, D., Shah, S. A., Siksny, V., Terns, M. P., Venclovas, Č., White, M. F., Yakunin, A. F., ... Koonin, E. v. (2020). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, 18(2), 67–83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>
- Martinelli, L., Oksanen, M., & Siipi, H. (2014). De-extinction: a novel and remarkable case of bio-objectification. *Croatian Medical Journal*, 55(4), 423–427. <https://doi.org/10.3325/cmj.2014.55.423>
- McConnachie, E., Hötzel, M. J., Robbins, J. A., Shriver, A., Weary, D. M., & von Keyserlingk, M. A. G. (2019). Public attitudes towards genetically modified polled cattle. *PloS One*, 14(5), e0216542.
- Montoliu, L. (2021). *Editando genes: recorta, pega y colorea*. Next-door.
- Moreno, A. M., & Mali, P. (2017). Therapeutic genome engineering via CRISPR-Cas systems. *WIREs Systems Biology and Medicine*, 9(4), e1380. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/wsbm.1380>
- Navarro-Serna, S., Vilarino, M., Park, I., Gadea, J., & Ross, P. J. (2020). Livestock Gene Editing by One-step Embryo Manipulation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 89, 103025. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103025>
- Ni, W., Qiao, J., Hu, S., Zhao, X., Regouski, M., Yang, M., Polejaeva, I. A., & Chen, C. (2014). Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PloS One*, 9(9), e106718–e106718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106718>
- Nidhi, S., Anand, U., Oleksak, P., Tripathi, P., Lal, J. A., Thomas, G., Kuca, K., & Tripathi, V. (2021). Novel CRISPR–Cas Systems: An Updated Review of the Current Achievements, Applications, and Future Research Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073327>
- Niu, Y., Shen, B., Cui, Y., Chen, Y., Wang, J., Wang, L., Kang, Y., Zhao, X., Si, W., & Li, W. (2014). Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 156(4), 836–843.
- Paques, F., & Duchateau, P. (2007). Meganucleases and DNA Double-Strand Break-Induced Recombination: Perspectives for Gene Therapy. *Current Gene Therapy*, 7(1), 49–66. <https://doi.org/10.2174/156652307779940216>
- Park, K.-E., Kaucher, A. v, Powell, A., Waqas, M. S., Sandmaier, S. E. S., Oatley, M. J., Park, C.-H., Tibary, A., Donovan, D. M., Blomberg, L. A., Lillico, S. G., Whitelaw, C. B. A., Mileham, A., Telugu, B. P., & Oatley, J. M. (2017). Generation of germline ablated male pigs by CRISPR/Cas9 editing of the NANOS2 gene. *Scientific Reports*, 7, 40176. <https://doi.org/10.1038/srep40176>

- Pinzon-Arteaga, C., Snyder, M. D., Lazzarotto, C. R., Moreno, N. F., Juras, R., Raudsepp, T., Golding, M. C., Varner, D. D., & Long, C. R. (2020). Efficient correction of a deleterious point mutation in primary horse fibroblasts with CRISPR-Cas9. *Scientific Reports*, *10*(1), 7411. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62723-3>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C.-Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., Scott, D. A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., & Zhang, F. (2013). Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell*, *154*(6), 1380–1389. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>
- Reyes, L. M., Estrada, J. L., Wang, Z. Y., Blosser, R. J., Smith, R. F., Sidner, R. A., Paris, L. L., Blankenship, R. L., Ray, C. N., & Miner, A. C. (2014). Creating class I MHC–null pigs using guide RNA and the Cas9 endonuclease. *The Journal of Immunology*, *193*(11), 5751–5757.
- Robb, G. B. (2019). Genome Editing with CRISPR-Cas: An Overview. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, *19*(1), e36. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cpet.36>
- Rodriguez, E. (2016). Ethical issues in genome editing using Crispr/Cas9 system. *Journal of Clinical Research and Bioethics*, *7*(2).
- Roh, J., Lee, J., Park, S. U., Kang, Y.-S., Lee, J., Oh, A.-R., Choi, D. J., Cha, J.-Y., & Lee, H.-W. (2018). CRISPR-Cas9-mediated generation of obese and diabetic mouse models. *Experimental Animals*, 17–123.
- Rydzek, N., Hryhorowicz, M., Zeyland, J., Lipiński, D., & Słomski, R. (2021). CRISPR/Cas technology in pig-to-human xenotransplantation research. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(6), 3196.
- Sampson, T. R., & Weiss, D. S. (2014). Exploiting CRISPR/C as systems for biotechnology. *Bioessays*, *36*(1), 34–38.
- Sánchez-Rivera, F. J., Papagiannakopoulos, T., Romero, R., Tammela, T., Bauer, M. R., Bhutkar, A., Joshi, N. S., Subbaraj, L., Bronson, R. T., & Xue, W. (2014). Rapid modelling of cooperating genetic events in cancer through somatic genome editing. *Nature*, *516*(7531), 428–431.
- Savić, N., & Schwank, G. (2016). Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Translational Research*, *168*, 15–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.09.008>
- Schuster, F., Aldag, P., Frenzel, A., Hädeler, K.-G., Lucas-Hahn, A., Niemann, H., & Petersen, B. (2020). CRISPR/Cas12a mediated knock-in of the Polled Celtic variant to produce a polled genotype in dairy cattle. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–9.
- Shao, S., Ren, C., Liu, Z., Bai, Y., Chen, Z., Wei, Z., Wang, X., Zhang, Z., & Xu, K. (2017). Enhancing CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair in mammalian cells by expressing *Saccharomyces cerevisiae* Rad52. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *92*, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.09.012>
- Shapiro, B. (2015). Mammoth 2.0: will genome engineering resurrect extinct species? *Genome Biology*, *16*(1), 228. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0800-4>

- Sherkow, J. S., & Greely, H. T. (2013). What if extinction is not forever? *Science*, *340*(6128), 32–33.
- Shinwari, Z. K., Tanveer, F., & Khalil, A. T. (2018). Ethical issues regarding CRISPR mediated genome editing. *Current Issues in Molecular Biology*, *26*(1), 103–110.
- Shrock, E., & Güell, M. (2017). CRISPR in animals and animal models. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *152*, 95–114.
- Singina, G. N., Sergiev, P. v, Lopukhov, A. v, Rubtsova, M. P., Taradajnic, N. P., Ravin, N. v, Shedova, E. N., Taradajnic, T. E., Polejaeva, I. A., Dozev, A. v, Brem, G., Dontsova, O. A., & Zinovieva, N. A. (2021). Production of a Cloned Offspring and CRISPR/Cas9 Genome Editing of Embryonic Fibroblasts in Cattle. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, *496*(1), 48–51. <https://doi.org/10.1134/S1607672921010099>
- Smithies, O., Gregg, R. G., Boggs, S. S., Koralewski, M. A., & Kucherlapati, R. S. (1985). Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination. *Nature*, *317*(6034), 230–234. <https://doi.org/10.1038/317230a0>
- Takao, K., & Miyakawa, T. (2015). Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(4), 1167–1172. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401965111>
- Tanihara, F., Hirata, M., Nguyen, N. T., Le, Q. A., Wittayarat, M., Fahrudin, M., Hirano, T., & Otoi, T. (2021). Generation of CD163-edited pig via electroporation of the CRISPR/Cas9 system into porcine in vitro-fertilized zygotes. *Animal Biotechnology*, *32*(2), 147–154.
- Thomas, K. R., & Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, *51*(3), 503–512. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90646-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90646-5)
- Tingaud-Sequeira, A., Mercier, E., Michaud, V., Pinson, B., Gazova, I., Gontier, E., Decoeur, F., McKie, L., Jackson, I. J., & Arveiler, B. (2022). The Dct^{-/-} mouse model to unravel retinogenesis misregulation in patients with albinism. *BioRxiv*.
- Toral, M. A., Charlesworth, C. T., Ng, B., Chemudupati, T., Homma, S., Nakauchi, H., Bassuk, A. G., Porteus, M. H., & Mahajan, V. B. (2022). Investigation of Cas9 antibodies in the human eye. *Nature Communications*, *13*(1), 1053. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28674-1>
- Tycko, J., Myer, V. E., & Hsu, P. D. (2016). Methods for Optimizing CRISPR-Cas9 Genome Editing Specificity. *Molecular Cell*, *63*(3), 355–370. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.07.004>
- Unckless, R. L., Messer, P. W., & Clark, A. G. (2015). Theoretical consequences of the Mutagenic Chain Reaction for manipulating natural populations. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/018986>
- Unckless, R. L., Messer, P. W., Connallon, T., & Clark, A. G. (2015). Modeling the Manipulation of Natural Populations by the Mutagenic Chain Reaction. *Genetics*, *201*(2), 425–431. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.177592>
- van der Oost, J., Jore, M. M., Westra, E. R., Lundgren, M., & Brouns, S. J. J. (2009). CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, *34*(8), 401–407. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.05.002>

- Vilarino, M., Rashid, S. T., Suchy, F. P., McNabb, B. R., van der Meulen, T., Fine, E. J., Ahsan, S. D., Mursaliyev, N., Sebastiano, V., Diab, S. S., Huising, M. O., Nakauchi, H., & Ross, P. J. (2017a). CRISPR/Cas9 microinjection in oocytes disables pancreas development in sheep. *Scientific Reports*, 7(1), 17472. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17805-0>
- Vilarino, M., Rashid, S. T., Suchy, F. P., McNabb, B. R., van der Meulen, T., Fine, E. J., Ahsan, S. D., Mursaliyev, N., Sebastiano, V., Diab, S. S., Huising, M. O., Nakauchi, H., & Ross, P. J. (2017b). CRISPR/Cas9 microinjection in oocytes disables pancreas development in sheep. *Scientific Reports*, 7(1), 17472. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17805-0>
- Visel, A., Rubin, E. M., & Pennacchio, L. A. (2009). Genomic views of distant-acting enhancers. *Nature*, 461(7261), 199–205. <https://doi.org/10.1038/nature08451>
- Wagner, D. L., Amini, L., Wendering, D. J., Burkhardt, L.-M., Akyüz, L., Reinke, P., Volk, H.-D., & Schmueck-Henneresse, M. (2019). High prevalence of *Streptococcus pyogenes* Cas9-reactive T cells within the adult human population. *Nature Medicine*, 25(2), 242–248. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0204-6>
- Wang, X., Cai, B., Zhou, J., Zhu, H., Niu, Y., Ma, B., Yu, H., Lei, A., Yan, H., Shen, Q., Shi, L., Zhao, X., Hua, J., Huang, X., Qu, L., & Chen, Y. (2016). Disruption of FGF5 in Cashmere Goats Using CRISPR/Cas9 Results in More Secondary Hair Follicles and Longer Fibers. *PLoS One*, 11(10), e0164640–e0164640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164640>
- Wang, X., Niu, Y., Zhou, J., Zhu, H., Ma, B., Yu, H., Yan, H., Hua, J., Huang, X., Qu, L., & Chen, Y. (2018). CRISPR/Cas9-mediated MSTN disruption and heritable mutagenesis in goats causes increased body mass. *Animal Genetics*, 49(1), 43–51. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/age.12626>
- Whitelaw, C. B. A., Sheets, T. P., Lillico, S. G., & Telugu, B. P. (2016). Engineering large animal models of human disease. *The Journal of Pathology*, 238(2), 247–256. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/path.4648>
- Whitworth, K. M., Lee, K., Benne, J. A., Beaton, B. P., Spate, L. D., Murphy, S. L., Samuel, M. S., Mao, J., O’Gorman, C., Walters, E. M., Murphy, C. N., Driver, J., Mileham, A., McLaren, D., Wells, K. D., & Prather, R. S. (2014). Use of the CRISPR/Cas9 System to Produce Genetically Engineered Pigs from In Vitro-Derived Oocytes and Embryos¹. *Biology of Reproduction*, 91(3), 78, 1–13. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121723>
- Whitworth, K. M., Rowland, R. R. R., Ewen, C. L., Tribble, B. R., Kerrigan, M. A., Cino-Ozuna, A. G., Samuel, M. S., Lightner, J. E., McLaren, D. G., Mileham, A. J., Wells, K. D., & Prather, R. S. (2016). Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nature Biotechnology*, 34(1), 20–22. <https://doi.org/10.1038/nbt.3434>
- Wiedenheft, B., Sternberg, S. H., & Doudna, J. A. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 482(7385), 331–338. <https://doi.org/10.1038/nature10886>
- Wright, D. A., Li, T., Yang, B., & Spalding, M. H. (2014). TALEN-mediated genome editing: prospects and perspectives. *Biochemical Journal*, 462(1), 15–24. <https://doi.org/10.1042/BJ20140295>

- Wu, J., Vilarino, M., Suzuki, K., Okamura, D., Bogliotti, Y. S., Park, I., Rowe, J., McNabb, B., Ross, P. J., & Belmonte, J. C. I. (2017). CRISPR-Cas9 mediated one-step disabling of pancreatogenesis in pigs. *Scientific Reports*, 7(1), 10487. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08596-5>
- Wu, Y., Zhou, H., Fan, X., Zhang, Y., Zhang, M., Wang, Y., Xie, Z., Bai, M., Yin, Q., Liang, D., Tang, W., Liao, J., Zhou, C., Liu, W., Zhu, P., Guo, H., Pan, H., Wu, C., Shi, H., ... Li, J. (2015). Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell Research*, 25(1), 67–79. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.160>
- Wyman, C., & Kanaar, R. (2006). DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annual Review of Genetics*, 40, 363–383. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090451>
- Xie, Z., Jiao, H., Xiao, H., Jiang, Y., Liu, Z., Qi, C., Zhao, D., Jiao, S., Yu, T., & Tang, X. (2020). Generation of pRSAD2 gene knock-in pig via CRISPR/Cas9 technology. *Antiviral Research*, 174, 104696.
- Xue, W., Chen, S., Yin, H., Tammela, T., Papagiannakopoulos, T., Joshi, N. S., Cai, W., Yang, G., Bronson, R., & Crowley, D. G. (2014). CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*, 514(7522), 380–384.
- Yan, Q., Zhang, Q., Yang, H., Zou, Q., Tang, C., Fan, N., & Lai, L. (2014). Generation of multi-gene knockout rabbits using the Cas9/gRNA system. *Cell Regeneration (London, England)*, 3(1), 12. <https://doi.org/10.1186/2045-9769-3-12>
- Yang, H., Wang, G., Sun, H., Shu, R., Liu, T., Wang, C.-E., Liu, Z., Zhao, Y., Zhao, B., & Ouyang, Z. (2014). Species-dependent neuropathology in transgenic SOD1 pigs. *Cell Research*, 24(4), 464–481.
- Yang, L., Güell, M., Niu, D., George, H., Lesha, E., Grishin, D., Aach, J., Shrock, E., Xu, W., & Poci, J. (2015). Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science*, 350(6264), 1101–1104.
- Yosef, I., Goren, M. G., & Qimron, U. (2012). Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in Escherichia coli. *Nucleic Acids Research*, 40(12), 5569–5576. <https://doi.org/10.1093/nar/gks216>
- Yu, H.-H., Zhao, H., Qing, Y.-B., Pan, W.-R., Jia, B.-Y., Zhao, H.-Y., Huang, X.-X., & Wei, H.-J. (2016). Porcine Zygote Injection with Cas9/sgRNA Results in DMD-Modified Pig with Muscle Dystrophy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/ijms17101668>
- Yue, Y., Xu, W., Kan, Y., Zhao, H.-Y., Zhou, Y., Song, X., Wu, J., Xiong, J., Goswami, D., Yang, M., Lamriben, L., Xu, M., Zhang, Q., Luo, Y., Guo, J., Mao, S., Jiao, D., Nguyen, T. D., Li, Z., ... Yang, L. (2021). Extensive germline genome engineering in pigs. *Nature Biomedical Engineering*, 5(2), 134–143. <https://doi.org/10.1038/s41551-020-00613-9>
- Zhang, X., Li, W., Liu, C., Peng, X., Lin, J., He, S., Li, X., Han, B., Zhang, N., Wu, Y., Chen, L., Wang, L., MaYila, Huang, J., & Liu, M. (2017). Alteration of sheep coat color pattern by disruption

- of ASIP gene via CRISPR Cas9. *Scientific Reports*, 7(1), 8149. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08636-0>
- Zhang, Y., Wang, Y., Yulin, B., Tang, B., Wang, M., Zhang, C., Zhang, W., Jin, J., Li, T., & Zhao, R. (2019). CRISPR/Cas9-mediated sheep MSTN gene knockout and promote sMSCs differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(2), 1794–1806.
- Zheng, C., Ballard, E. B., & Wu, J. (2021). The road to generating transplantable organs: from blastocyst complementation to interspecies chimeras. *Development*, 148(12), dev195792. <https://doi.org/10.1242/dev.195792>
- Zheng, J., Li, H., Zhang, Q., Sun, L., Liu, X., & Luo, C. (2018). Homologous recombination occurs frequently at innate GT microsatellites in normal somatic and germ cells in vivo. *BMC Genomics*, 19(1), 359. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4758-y>
- Zheng, Q., Lin, J., Huang, J., Zhang, H., Zhang, R., Zhang, X., Cao, C., Hambly, C., Qin, G., Yao, J., Song, R., Jia, Q., Wang, X., Li, Y., Zhang, N., Piao, Z., Ye, R., Speakman, J. R., Wang, H., ... Zhao, J. (2017). Reconstitution of UCP1 using CRISPR/Cas9 in the white adipose tissue of pigs decreases fat deposition and improves thermogenic capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(45), E9474–E9482. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707853114>
- Zhong, H., Chen, Y., Li, Y., Chen, R., & Mardon, G. (2015). CRISPR-engineered mosaicism rapidly reveals that loss of Kcnj13 function in mice mimics human disease phenotypes. *Scientific Reports*, 5(1), 1–9.
- Zhou, J., Shen, B., Zhang, W., Wang, J., Yang, J., Chen, L., Zhang, N., Zhu, K., Xu, J., & Hu, B. (2014). One-step generation of different immunodeficient mice with multiple gene modifications by CRISPR/Cas9 mediated genome engineering. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 46, 49–55.
- Zhou, S., Cai, B., He, C., Wang, Y., Ding, Q., Liu, J., Liu, Y., Ding, Y., Zhao, X., Li, G., Li, C., Yu, H., Kou, Q., Niu, W., Petersen, B., Sonstegard, T., Ma, B., Chen, Y., & Wang, X. (2019). Programmable Base Editing of the Sheep Genome Revealed No Genome-Wide Off-Target Mutations. *Frontiers in Genetics*, 10, 215. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00215>
- Zhou, W., Wan, Y., Guo, R., Deng, M., Deng, K., Wang, Z., Zhang, Y., & Wang, F. (2017). Generation of beta-lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9. *PloS One*, 12(10), e0186056–e0186056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186056>
- Zou, Q., Wang, X., Liu, Y., Ouyang, Z., Long, H., Wei, S., Xin, J., Zhao, B., Lai, S., Shen, J., Ni, Q., Yang, H., Zhong, H., Li, L., Hu, M., Zhang, Q., Zhou, Z., He, J., Yan, Q., ... Gao, X. (2015). Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system. *Journal of Molecular Cell Biology*, 7(6), 580–583. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv061>
- Zuckermann, M., Hovestadt, V., Knobbe-Thomsen, C. B., Zapatka, M., Northcott, P. A., Schramm, K., Belic, J., Jones, D. T. W., Tschida, B., & Moriarity, B. (2015). Somatic CRISPR/Cas9-mediated tumour suppressor disruption enables versatile brain tumour modelling. *Nature Communications*, 6(1), 1–9.
- Zuo, E., Cai, Y.-J., Li, K., Wei, Y., Wang, B.-A., Sun, Y., Liu, Z., Liu, J., Hu, X., Wei, W., Huo, X., Shi, L., Tang, C., Liang, D., Wang, Y., Nie, Y.-H., Zhang, C.-C., Yao, X., Wang, X., ... Yang, H. (2017).

One-step generation of complete gene knockout mice and monkeys by CRISPR/Cas9-mediated gene editing with multiple sgRNAs. *Cell Research*, 27(7), 933–945. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.81>

Zuris, J. A., Thompson, D. B., Shu, Y., Guilinger, J. P., Bessen, J. L., Hu, J. H., Maeder, M. L., Joung, J. K., Chen, Z.-Y., & Liu, D. R. (2015). Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nature Biotechnology*, 33(1), 73–80. <https://doi.org/10.1038/nbt.3081>

7. ANEXOS

Anexo 1.- Tabla comparativa entre los principales modelos de edición genética (elaboración propia).

Características	Meganucleasa	ZFN	TALEN	CRISPR-Cas9
Componente que genera rotura del ADN.	Meganucleasa.	Enzima de restricción bacteriana Fok1.	Enzima de restricción bacteriana Fok1.	Proteína Cas9.
Componente que reconoce la secuencia de ADN donde efectuar corte.	Meganucleasa.	Zinc Finger Protein.	Transcription-activator-like-effector.	ARN guía.
Patrón de reconocimiento.	Detecta secuencias específicas de alrededor de 20 bases.	Código que relaciona tres aminoácidos determinados con 3 letras de ADN en un determinado orden.	Cada dos aminoácidos se unen con una letra del ADN.	Secuencias homólogas al ARN guía.
Especificidad de corte.	Media.	Alta, formada por dos subunidades, solo genera corte cuando las dos subunidades detectan el ADN diana.	Media.	Media.
Cortes fuera del lugar diana.		Variable.	Baja.	Moderado.
Coste.	Caro.	Muy caro.	Caro.	Barato.
Consideraciones.	Muy poco versátiles, solo detectan determinadas secuencias.	Especificidad de cada proteína para identificar zonas concretas de ADN. Para generar cortes distintos hay que diseñar una nueva proteína. Estructura patentada.	Especificidad de cada proteína para identificar zonas concretas de ADN. Para generar distintos hay que diseñar una nueva proteína. Libre acceso, posible fabricación propia. Elaboración costosa.	Simplicidad Facilidad Eficacia

Anexo 2.- Clasificación en base a rasgos principales de los dos tipos generales de sistemas CRISPR-Cas (Liu et al., 2020; Makarova et al., 2020; Nidhi et al., 2021; Sampson & Weiss, 2014).

Clase I	Clase II
<p>Todos cortan ADN.</p> <p>Algunos como prerequisite han de cortar ARN.</p>	<p>Principalmente cortan ADN.</p> <p>*Algunos tipos cortan ARN.</p>
<p>Necesitan muchos tipos de proteína Cas.</p>	<p>Solo 1 proteína: Cas9 (prototípica) aunque también: Cas12 y Cas 13.</p>
<p>Necesitan una guía de ARN.</p>	<p>Pequeñas moléculas de ARN actúan como guía.</p>
<p>Son sistemas endógenos de bacterias, se han desarrollado por la toxicidad que genera las enzimas Cas 9 y Cas 12 (clase 2) en algunas bacterias.</p> <p>Ha permitido una investigación más amplia del funcionamiento del sistema CRISPR-Cas en bacterias.</p>	<p>Son sistemas muy simplificados que permiten un gran avance y una amplia variedad de usos en modificación genética de células eucariotas.</p>
<p>Pertenece el tipo I, III y IV.</p>	<p>Pertenece el tipo II, V y VI.</p>

Anexo 3.- Principales genes modificados por el sistema CRISPR/Cas en el genoma porcino con fines de xenotrasplante (elaboración propia).

GGTA1-KO	Gen porcino que codifica para la enzima alfa-1,3-galactosiltransferasa (GGTA1) la cual sintetiza el epítipo galactosa- α 1,3-galactosa (α -Gal). Dicho epítipo es el principal xenoantígeno implicado en HAR. Esta enzima se encuentra en la mayoría de los mamíferos, incluidos los cerdos, pero no en los humanos ni en otros primates. En la sangre humana hay anticuerpos IgG dirigidos contra los epítipos α -Gal formados durante el período neonatal humano en respuesta a la presencia de bacterias intestinales que expresan el gen <i>GGTA1</i> .	(Yue et al., 2021)
CMAH-KO	Gen codificante de la enzima que produce el compuesto Neu5Gc. Este compuesto está presente en la membrana de células porcinas. Se han detectado anticuerpos contra este antígeno en suero humano. Este antígeno influye en gran medida en la aparición de HAR.	(Yue et al., 2021)
β4GalINT2-KO	Gen codificante de la enzima que participa en la síntesis del antígeno Sd (a). La mayoría de personas tienen niveles bajos de anticuerpos anti SD(a). También tiene implicación en el desarrollo de HAR.	(Yue et al., 2021)
SLA tipo I KO	Gen que codifica para los antígenos de leucocitos porcinos (SLA). Los SLA también son conocidos como complejo principal de histocompatibilidad de tipo 1 (MHC-1). El MHC es fundamental para la función del sistema inmunológico en la salud y la enfermedad, y es particularmente importante en la infección y el rechazo de trasplantes. Participa en gran medida como causante del AHXR.	(Joanna et al., 2018; Reyes et al., 2014)
ULBP1-KO	Gen que codifica para la proteína ULBP1 porcina. Se ha demostrado que la unión de la proteína ULBP1 porcina al receptor NKG2D humano da como resultado la liberación de los gránulos líticos por las células NK que median en la destrucción de las células del xenoinjerto. Este gen está relacionado con los mecanismos de activación de las células NK y por tanto con el rechazo de tipo AHXR	(Fu et al., 2020; Joanna et al., 2018)
CIITA-KO	Es el gen codificante de la molécula MHC-II, complejo de histocompatibilidad II o SLA-II. Estas moléculas están relacionadas con los rechazos mediados por células T CD4 humanas.	(Fu et al., 2020)
β2M-KO	Gen que codifica para la enzima participante de la formación del complejo de histocompatibilidad I (MHC-I o SLA-I). Estas moléculas están relacionadas con los rechazos mediados por células T CD8 humanas.	(Fu et al., 2020)

